Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, 2024, p. 159-170

The Response of Boxwood Accesstions from Hyrcanian Forest Areas of Northern Iran to Blight Disease (Agent: *Calonectria pseudonaviculata*)

S.M. Zamani[1*], M.R. Arefipour[2], R. Gholami Ghavam abad[2], S. Ghanaei[3]

1- Assistant Professor, Research Institute of Forests and Rangeland, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: mzamani@rifr-ac.ir)
2- Research Expert, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
3- Senior Research Expert, Payame Noor University, Shahrood, Iran

Received: 27-08-2023
Revised: 20-02-2024
Accepted: 16-04-2024
Available Online: 21-07-2024

How to cite this article:
Zamani, S.M., Arefipour, M.R., Gholami Ghavam abad, R., & Ghanaei, S. (2024). The response of boxwood accesstions from Hyrcanian forest areas of Northern Iran to blight disease (Agent: *Calonectria pseudonaviculata*). *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *38*(2), 159-170. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2024.84112.1161

Introduction

The Caspian boxwood (*Buxus sempervirens* subsp. *hyrcana*) trees are endangered, evergreen and endemic species in the Hyrcanian forests areas of northern Iran growing in Guilan, Mazandaran and Golestan provinces. This protected evergreen trees species is considered a unique and genetically valuable forest resource for Iran. The habitats of this valuable species, which is located in the lowlands, like other similar trees, always faced with overharvesting problems. But in addition to excessive harvesting, box tree moth *Cydalima perspectalis* and boxwood blight disease caused by the pathogen *Calonectria pseudonaviculata* (also known as box blight or buxus blight), as growing problems, are additional causes of boxwood habitats degradation. the outbreak of caspian buxus die-back due to boxwood blight disease was first reported in the summer of 2012 in the buxus forests located in the north of Iran and quickly infected more than 70% of the boxwood forests in the northern part of the country. Since then, there was intense concern that this disease might be the end of boxwood plants, and due to the importance of the subject, various research projects were implemented in research centers and universities in Iran, like other countries in the world. Currently, processes related to biodiversity protection of Hyrcanian boxwood are performed by Natural Resources and Watershed Management Organization as the best protection strategies, in which there are two protection strategies (in situ/ex situ) with different techniques. As the current approach to disease management in the world largely depends on the use of tolerant cultivars, research into boxwood blight resistance continues, so new resistant cultivars continue to be introduced worldwide. However, despite the importance of Caspian boxwood trees, there are no such studies in Iran. The objective of this study was to fill this knowledge gap by evaluating possible hyrcanian buxus accessions resistant to boxwood blight as a further step in improving the effectiveness and efficiency of this species protection management in the conditions of re-facing with the disease. Results of this study will enable growers and landscapers to better manage box blight disease.

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
https://doi.org/10.22067/jpp.2024.84112.1161

Materials and Methods

In order to investigate the resistance of boxwood accessions from hyrcanian Forest areas of northern Iran to blight disease, infected boxwood habitats were visited in Golestan, Mazandaran and Gilan provinces, and to find boxwood plants with natural resistance, healthy buxux seedlings were collected from these habitats. Because in these types of studies, the process of resistance assessment begins by searching in natural forests for trees that remain healthy relative to their counterparts after exposure to an interest pathogen. In order to ensure buxus seedlings health, the seedlings that were collected from 12 boxwood forest habitats were kept for six months in the Alborz Research Complex (affiliated to the Research Institute of Forests and Rangelands of Iran) and their health was monitored. Finally, from the seedlings of each habitat, the freshest and most equal-sized seedlings were selected and used for greenhouse evaluations. In order to prepare the inoculum from the disease-causing fungus, the combination of four isolates of *C. pseudonaviculata* species, which had appropriate genetic diversity based on previous studies, was used. Seedlings were inoculated through foliar spraying of fungal spores (1×10^5 spores/ml). Three weeks after inoculation, the average number of spots created on the stem and leaves of each boxwood plant as well as the average diameter of the largest leaf spot for each boxwood accession were recorded and analyzed.

Results and Discussion

The results of inoculation of blight pathogen on boxwood accessions showed that there were similar results in measuring the diameter of the leaf spot with the number of blight spots in each accession, so that, in plants with a higher number of blight spots, there was also a larger diameter of the leaf spot. Also, the results showed that although no accession is completely resistant to this disease and the disease appeared with different degrees in all accession; but a number of accessions are less sensitive to boxwood blight and the disease occurred in them with a lower severity. These results suggest to breeders to find natural resistance or create resistance in boxwood plants against blight disease through breeding programs.

Conclusion

In this study, for the first time, the resistance of different accessions of *Buxus sempervirens* subsp. *hyrcana* from boxwood habitats in the north of the country (as the only native and endangered boxwood species of Iran) to blight disease was evaluated. Based on the obtained results, it was determined that some degrees of disease tolerance can be found among different Hyrkani boxwood accessions. These results show that there is potential for plant breeders to select and recommend less susceptible boxwoods or to develop cultivars with improved resistance to boxwood blight.

Keywords: Boxwood, Blight, Pathogenicity, Screening, Tolerable

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸ شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۱۷۰-۱۵۹

واکنش جمعیت‌های شمشاد جنگلی هیرکانی ایران به بیماری بلایت (*Calonectria pseudonaviculata*)

سیده معصومه زمانی[۱*]- محمدرضا عارفی پور[۲]- ریحانه غلامی قوام آباد[۲]- صدیقه غنایی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۲۸

چکیده

بیماری بلایت شمشاد جنگلی (*Buxus sempervirens* sub sp. *hyrcana*) با عامل *Calonectria pseudonaviculata* در جنگل‌های خزری واقع در شمال ایران به سرعت بیش از دو سوم جنگل‌های شمشاد شمال کشور را آلوده نموده است. از آنجاکه راهبرد اصلی مدیریت بیماری در دنیا تا حد زیادی به استفاده از ارقام متحمل متکی است، تحقیق حاضر با هدف یافتن جمعیت‌های احتمالی مقاوم به بلایت شمشاد به‌عنوان یک قدم فراتر در بهبود اثربخشی و کارآیی مدیریت حفاظت از گونه در شرایط مواجه مجدد با بیماری پایه‌ریزی شد. برای این منظور از رویشگاه‌های آلوده شمشاد در استان‌های گلستان، مازندران و گیلان بازدید صورت گرفت و بمنظور ردیابی مقاومت طبیعی شمشادهای جنگلی ایران نهال‌های سالم شمشاد از این رویشگاه‌ها جمع‌آوری شدند. نهال‌های بدست آمده از ۱۲ رویشگاه شمشاد جنگلی به‌منظور اطمینان از سلامت آنها به‌مدت شش ماه نگهداری شدند و وضعیت سلامتی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت از نهال‌های مربوط به هر رویشگاه نهال‌های سالم و هم‌اندازه برای ارزیابی‌های گلخانه‌ای انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. به‌منظور تهیه زادمایه قارچ عامل بیماری، ترکیب چهار جدایه از قارچ *C. pseudonaviculata* که از تنوع ژنتیکی مناسبی برخوردار بودند مورد استفاده قرار گرفت و مایه‌زنی از طریق محلول‌پاشی اسپور قارچی با غلظت ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر روی برگ‌های شمشاد و از چهار جهت گیاه برای آغشته‌سازی کامل آنها با قارچ بیمارگر انجام شد. سه هفته پس از مایه‌زنی، میانگین تعداد لکه‌های ایجاد شده روی ساقه و برگ‌های هر یک از گیاهان شمشاد و نیز متوسط قطر بزرگترین لکه‌برگی برای هر گیاه ثبت و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصل از مایه‌زنی قارچ عامل بلایت نشان داد اولا نتایج مشابهی در ارزیابی‌های قطر لکه‌برگی با تعداد لکه‌های بلایت در هر گیاه وجود دارد، بطوری‌که در گیاهان دارای تعداد بیشتری از لکه‌های بلایت، قطر بیشتری از لکه‌برگی نیز وجود داشت. همچنین نتایج نشان داد اگرچه هیچ جمعیتی به‌طور کامل در برابر این بیماری مقاوم نیست و بیماری با درجات متفاوتی در تمام گیاهان ظاهر شد؛ اما تعدادی از گیاهان کمتر به سوختگی شمشاد حساس هستند و بیماری در آنها شدت پایین‌تری دارد. این نتایج به متخصصین یافتن مقاومت طبیعی یا ایجاد مقاومت در گیاهان شمشاد در برابر بیماری بلایت را پیشنهاد می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: بلایت، بیماری‌زایی، شمشاد، غربالگری، متحمل

۱- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: mzamani@rifr-ac.ir)
۲- پژوهشگر، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۳- مربی، دانشگاه پیام نور، شاهرود، ایران

https://doi.org/10.22067/jpp.2024.84112.1161

مقدمه

شمشاد جنگلی (با نام علمی *Buxus sempervirens* subsp. *hyrcana* (Pojark.) Takht.) از مهم‌ترین گونه‌های گیاهی همیشه سبز از خانواده شمشاد (Buxaceae) و از مهمترین گونه‌های گیاهی پهن‌برگ و بومی جنگل‌های هیرکانی در شمال ایران است که از لحاظ قدمت، به‌عنوان یکی از درختان بازمانده اقلیمی مربوط به دوران سوم زمین‌شناسی (مزوزوئیک) برمی‌گردد و از اهمیت خاصی بین ذخایر جنگلی جهان برخوردار است (Akhani *et al.*, 2010).

در ایران بنا بر ماده یک قانون حفاظت و حمایت از منابع طبیعی و ذخایر جنگلی کشور، شمشاد ممنوع‌القطع بوده و از ذخایر جنگلی با ارزش ژنتیکی و بوتانیکی خاص و در حقیقت از گونه‌های در حال انقراض محسوب می‌شود که خطر نابودی آن در آینده محتمل است (Shamekhi, 2011).

اگرچه ارشاد چندین عامل بیماری‌زا از جمله قارچ‌های مولد سفیدک و زنگ را از گیاهان شمشاد در ایران گزارش نموده است (Ershad, 2009)؛ اما بطور کلی در دنیا گیاهان شمشاد بعنوان گیاهانی مقاوم به بسیاری از بیماری‌ها و آفات شناخته می‌شدند (Henricot *et al.*, 2008). تا اینکه در اواسط دهه ۹۰ میلادی شیوع نوعی بیماری قارچی با نام بلایت شمشاد (Boxwood blight) در سراسر اروپا گسترش یافت. این بیماری در نوامبر ۲۰۱۱ به ایالت متحده (کارولینای شمالی) و در دسامبر ۲۰۱۱ به کانادا (انتاریو) رسید (Ivors *et al.*, 2012; Henricot, 2006). با توجه به سرعت گسترش سریع این بیماری و خسارت‌زایی قابل توجه، این بیماری از سال ۲۰۰۴ به بعد، بلایت شمشاد در فهرست بیماری‌های گیاهی تحت مراقبت سازمان حفظ نباتات اروپا (The European and Mediterranean Plant Protection Organization=EPPO) قرار گرفت.

آلودگی ناشی از این بیمارگر قارچی در شرایط آب و هوایی ۲۰ تا ۲۵ درجه سیلیسیوس و رطوبت بالای ۸۰ درصد بسیار سریع رخ می دهد. این در حالی است که قارچ بیمارگر می‌تواند حداقل دمای ۵ و حداکثر دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس را تحمل کند. اسپورهایی که با قطرات آب پراکنده می‌شوند و یا از طریق حشرات، پرندگان و یا قطعات گیاهی منتقل می‌شوند، منبع آلودگی اولیه این بیماری هستند. نفوذ بیمارگر قارچی از محل روزنه‌های هوایی موجود در سطح تحتانی برگ‌ها و یا مستقیماً از محل کوتیکول موجود در سطح فوقانی برگ رخ می‌دهد. بیمارگر می‌تواند به شکل بین سلولی در بافت‌های درونی برگ رشد کند. ظهور دوباره قارچ دو تا سه روز پس از آلودگی از محل روزنه‌های هوایی انجام می‌شود. هفت روز پس از آلودگی، در شرایط مساعد رطوبتی و دمایی، سطح تحتانی برگ با لایه‌ای از کنیدیوفورهای قارچ که قادر به تولید کنیدی‌ها (اسپورهای غیرجنسی) هستند، پوشیده می‌شود (Henricot *et al.*, 2008). عامل این بیماری قارچی هوا زاد است و طی فصل می‌تواند تعداد زیادی چرخه ثانویه با اسپورهای خود تشکیل دهد. هر چرخه ثانویه در حدود یک هفته تکمیل می‌شود و در طی آن به سرعت باعث ایجاد بیماری و در نهایت از بین رفتن برگ گیاه می‌شود (Henricot *et al.*, 2008).

در اروپا عامل بیماری با عنوان گونه *Cylindrocladium buxicola* (Henricot *et al.*, Henricot & Culham, 2002; Henricot *et al.*, 2008) و در نیوزلند با عنوان گونه *Cylindrocladium pseudonaviculata* توصیف گردید (Crous *et al.*, 2002). چند سال بعد، عامل بیماری *Calonectria pseudonaviculata* نام گذاری شد (Lombard *et al.*, 2010).

هنری کات و کالهام (Henricot & Culham, 2002) جدایه‌های مختلفی از انگلستان و نیوزلند را بررسی و توصیف نموده و گزارش کردند که آنها از نظر ژنتیکی همگن بوده و احتمالاً کلونال هستند. بعدتر، گهسکوایر و همکاران (Gehesquière *et al.*, 2016) تنوع ژنتیکی را در مجموعه‌ای از ۲۳۴ جدایه *Calonectria* بدست آمده از ۱۵ کشور از سراسر دنیا بررسی نموده و یک گونه خواهری فیلوژنتیک به نام *Calonectria henricotiae* را شناسایی و معرفی نمودند. هیچ تفاوتی در بیماری‌زایی بین دو گونه عامل بلایت (*Calonectria henricotiae* و *Calonectria pseudonaviculata*) در آزمون بیماری‌زایی روی مجموعه‌ای از ۳۷ رقم و گونه شمشاد مشاهده نشده است (Gehesquière, 2014).

بیماری سوختگی شمشاد برای اولین بار در سال ۲۰۱۰ در ایران مشاهده شد و عامل بیماری آن در سال ۲۰۱۲ از جنگل‌های مازندران و گیلان معرفی گردید (Mirabolfathy *et* Mirabolfathy, 2013; Rezaee *et al.*, 2013). این بیماری به شرق جنگل‌های هیرکانی سرایت کرد و از استان گلستان نیز گزارش شد (Khazaeli *et al.*, 2015). در دهه اخیر عامل بیماری با دارا بودن درجات متفاوتی از شدت بیماری‌زایی با سرعت بسیار زیادی توده‌های شمشاد جنگل‌های هیرکانی به خصوص سطح وسیعی از جنگل‌های گیلان و مازندران را آلوده و این توده‌ها را در شرایط نامناسبی قرار داده است (Khazaeli *et al.*, 2016).

در ایران بر اساس مجموع نتایج مطالعات ریخت‌شناسی و مولکولی جمعیت‌های ایرانی قارچ عامل خشکیدگی شمشاد خزری مشخص شد تمام جدایه‌های بدست آمده از استان‌های شمالی کشور خصوصیات تیپ اصلی گونه *Calonectria pseudonaviculta* را داشتند (Zamani & Mojerlou, 2020).

به نظر می‌رسد که فقدان تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های ایرانی احتمالاً به‌دلیل معرفی اخیر این پاتوژن در جنگل‌های هیرکانی و

برهمکنش بین پاتوژن و میزبان خاص آن است که محدود به یک زیرگونه *B. sempervirens* sub sp. *hyrcana*، بومی جنگل‌های هیرکانی است (Khazaeli *et al.*, 2018).

گونه قارچی *Calonectria pseudonaviculata* (syn. *Cylindrocladium pseudonaviculatum* = *Cylindrocladium buxicola*) تک میزبانه از شاخه آسکومیست‌ها و خانواده Nectriacea بوده که تاکنون فرم جنسی (مرحله تلومورف) آن مشاهده نشده و تنها بر اساس بررسی‌های مولکولی جایگاه آن در جنس *Calonectria* از گروه قارچ‌های آسکومیست تعیین شده است. بیماری در مرحله تلومورف رخ نمیدهد و تا کنون این بیماری از مرحله آنامورف (فرم غیرجنسی) قارچ عامل بیماری مشاهده و گزارش گردیده است (Lombard *et al.*, 2010).

گسترش سریع این بیماری و خطر انقراض گونه شمشاد ضرورت برنامه‌ریزی و تدوین راهبردهای مناسب برای مبارزه با این بیماری را ایجاب می‌نمود.

تاکنون مناسب‌ترین شیوه‌های مدیریت بیماری بلایت شمشاد در دنیا شامل استفاده از ارقام و پایه‌های مقاوم به بیماری (Ganci *et al.*, 2013; LaMondia, 2015; Shishkoff *et al.*, 2015)، استفاده از قارچ‌کش‌ها (Henricot & Wedgwood, 2013; LaMondia, 2014; Baudoin *et al.*, 2015; Fakhredin *et al.*, 2016)، عملیات بهداشتی از طریق حذف شاخه‌های آلوده، حذف بافت‌های گیاهی ریخته، اجتناب از آبیاری بارانی در نهالستان‌ها (Dart *et al.*, 2015; Shishkoff, 2016) و استفاده از عوامل بیوکنترل مانند قارچ *Trichoderma koningiopsis* (Kong & Hong, 2017) بوده است.

رویکردهای مدیریت بلندمدت مستلزم شناسایی یا توسعه شمشاد مقاوم یا نسبتاً مقاوم است. جنس *Buxus* با داشتن ۹۱ گونه (Batdorf, 2004) و تعداد زیادی هیبرید و اکسشن‌های (جمعیت) متنوع در دنیا شناخته شده است. اعتقاد بر این است که این تنوع می تواند ظرفیت بی‌بدیلی برای یافتن منبع مقاومت در برابر *C. pseudonaviculata* باشد.

در کشور ما نیز با توجه به وجود درختان شمشاد در اکوسیستم‌های طبیعی جنگل و نیز در فضای سبز و مناطق شهری و نتیجتاً لزوم استفاده از روش‌های ایمن و دوست‌دار محیط‌زیست در جهت کنترل بیماری؛ مناسب‌ترین و پایدارترین روش، یافتن ارقام مقاوم شمشاد و استفاده از آنها در کشت و کارهای جدید است. همانطور که ذکر شد، جمعیت *Calonectria pseudonaviculata* موجود در کشور ایران برخلاف آنچه که در برخی مناطق دنیا گزارش شده است، قابل تفکیک به گروه‌های متمایز تاکسونومیک (گونه‌های مختلف، زیرگونه و یا واریته) نمی‌باشد (Zamani & Mojerlou, 2020). نظر به نرخ پایین تنوع میان جدایه‌ها، به نظر می‌رسد در کنترل این بیماری، استفاده از ارقام متحمل مهمترین راهکار است.

تاکنون تحقیقاتی متعددی با استفاده از روش‌ها و جدایه‌های مختلف عامل بیماری‌زا در دنیا برای شناسایی ارقام شمشادِ با مقاومتِ طبیعی در برابر بیماری صورت گرفته و گزارش‌های بدست آمده از این مطالعات نشان می‌دهند میان گونه‌های مختلف شمشاد و نیز واریته‌های مختلف یک گونه از نظر حساسیت به بیماری بلایت اختلاف وجود دارد (Gehesquière, 2014; Ganci *et al.*, 2013; Gehesquière *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2016; Henricot *et al.*, 2008; LaMondia, 2015; LaMondia & Shishkoff, 2017). علاوه بر این، یک متاآنالیز توسط کرامر و همکاران (Kramer *et al.*, 2020) انجام شد که به‌طور سیستماتیک رتبه‌بندی بلایت را در میان چندین مطالعه از سراسر دنیا ارزیابی و وجود درجات متفاوتی از تحمل‌پذیری بیماری را میان گونه‌ها و واریته‌های مختلف شمشاد در دنیا گزارش نمود.

به‌طور کلی، غربالگری‌های حساسیت میزبانی نشان داده‌اند که گونه‌های *B. sempervirens* نسبت به گونه‌های آسیایی *B. microphylla* و *B. harlandii* به *Calonectria* حساس‌تر هستند (Guo *et al.*, 2016; LaMondia & Gehesquière, 2014; Shishkoff, 2017).

همچنین، در گونه *B. sempervirens*، درجات مختلفی از حساسیت در بین ارقام مختلف آن در دنیا گزارش شده است (Avenot *et al.*, 2017).

در ایران تحقیقات گسترده‌ای روی مقاومت پایه‌های شمشاد به بیماری صورت نگرفته است. از آنجا که حفظ ژنوم گونه شمشاد از طریق راهبردهای حفاظتی در شرایط درونجا و برونجا توسط سازمان منابع طبیعی و آبخیزداری کشور در دست انجام است (Naseri *et al.*, 2022)؛ تحقیق حاضر با هدف ردیابی مقاومت طبیعی در شمشادهای جنگلی ایران به بیماری بلایت بمنظور بهبود اثربخشی و کارآیی مدیریت حفاظت از گونه در شرایط مواجه مجدد با بیماری پایه ریزی شد. استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل می‌تواند به بخشی از شیوه های مدیریت تلفیقی بیماری برای نهالستان‌ها، فضاهای سبز شهری و جنگل‌کاری‌ها تبدیل شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی قارچ بیمارگر

ضمن بازدید از مناطق رویشگاهی شمشاد جنگلی در استان‌های گیلان، مازندران و گلستان، نمونه‌برداری از شاخه‌های سبز دارای علائم شانکر و سوختگی صورت گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، جهت جداسازی عامل بیماری، شاخه‌ها به قطعات حدوداً ده سانتی‌متری تقسیم و به‌مدت یک ساعت تحت جریان آب معمولی

پیش‌سترون‌سازی شدند. سپس، شاخه‌ها به قطعات حدوداً سه سانتی‌متری برش داده شده و به اتاقک کشت استریل منتقل شدند. در اتاقک کشت نمونه‌ها در محلول سترون‌کننده هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی و از آنها قطعاتی دارای علائم بیماری جداسازی و در محیط‌کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت گردید. کشت‌ها دمای ۲±۲۴ درجه سیلیسیوس تا زمان ایجاد و رشد کلنی قارچی نگهداری شدند.

شناسایی قارچ‌های بدست آمده، با توجه به خصوصیات ماکروسکوپی (ریخت‌شناسی، الگوی رویشی و رنگ پرگنه) و میکروسکوپی (خصوصیات کنیدیوم‌ها) و مطابقت این ویژگی‌های ریخت‌شناسی با منابع معتبر (Crous *et* Crous *et al.*, 1993a, b , *al.*, 2002) و نیز با عنایت به توصیف مجدد گونه توسط هنریکات و کالهام (Henricot & Culham, 2000) انجام شد.

خالص‌سازی جدایه‌ها با روش تک اسپور صورت گرفت. بعنوان مایه تلقیح قارچ عامل بلایت، ترکیبی از چهار جدایه قارچی *C. pseudonaviculata* که بر اساس مطالعات قبلی بالاترین تنوع ژنتیکی را داشتند (Zamani & Mojerlou, 2020) انتخاب و بکار گرفته شدند (جدول ۱).

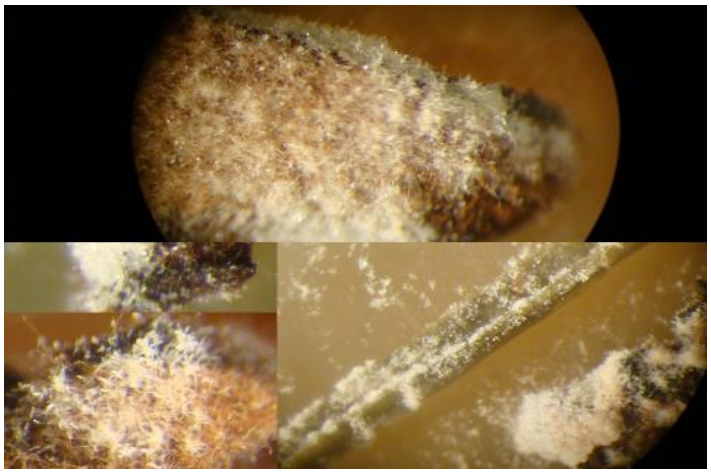
جدول ۱- مشخصات جدایه‌های قارچی بلایت شمشاد (*Calonectria pseudonaviculata*) مورد استفاده در آزمون گلخانه‌ای تحقیق حاضر

Table 1- Characterization of boxwood blight isolates (*Calonectria pseudonaviculata*) used in the greenhouse experiment

شماره No.	کد جدایه Isolate code	میزبان Host	منطقه جمع‌آوری Area/sample collection site
1	MCB-4	شمشاد خزری Hyrcanian box tree	مازندران، نوشهر Noshahr, Mazandaran
2	GICB-3	شمشاد خزری Hyrcanian box tree	گیلان، ذخیره گاه جنگلی دکتر درستکار Dr. Dorostkar forest park, Guilan
3	GOCB-8	شمشاد خزری Hyrcanian box tree	گلستان، بندرگز Bandar-e Gaz, Golestan
4	GICB-7	شمشاد خزری Hyrcanian box tree	گیلان، شفارود Shafaroud, Guilan

تهیه سوسپانسیون اسپوری قارچ عامل بلایت به عنوان مایه تلقیح

با هدف تولید اسپورهای رویشی قارچ *C. pseudonaviculata* بعنوان مایه تلقیح نهال‌های شمشاد در گلخانه، از کشت قارچها در محیط آب آگار ۲ درصد به همراه برگ میخک و قرار دادن کشت‌ها در تناوب ۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی تحت نور نزدیک فرابنفش (طول موج ۳۸۰–۲۰۰ نانومتر) جهت اسپورزایی استفاده شد. در این روش برای تکثیر اسپور قارچی، علاوه بر رعایت فاکتور فقر غذایی، از افزوده برگ میخک و نیز قرار دادن نمونه‌ها در نور نزدیک فرابنفش بعنوان محرک اسپوردهی قارچ در محیط‌کشت استفاده گردید و بدین ترتیب جمعیت زیادی از اسپور تولید شد (شکل ۱).



شکل ۱- اسپورهای قارچ عامل بیماری بلایت شمشاد (*Calonectria pseudonaviculata*) تشکیل شده در محیط‌کشت آب-آگار به همراه برگ میخک

Figure 1- Spores boxwood blight (*Calonectria pseudonaviculata*)spores, produced on water agar with clove leaf

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 جمع آوری شدند. جهت تسهیل در جدا شدن اسپورها، ظروف پتری بمدت نیم ساعت روی شیکر قرار داده شدند تا جمعیت بالایی از اسپورها جدا شده و در محلول آب و توئین قرار گیرند.

تعداد اسپور موجود در حجم یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپوری با استفاده از لام هماسیتومتر شمارش و اندازه‌گیری گردید.

غلظت اسپورها به میزان ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد و پس از ترکیب حجم‌های برابر از سوسپانسیون اسپوری چهار جدایه منتخب در غلظت ذکر شده، استوک بدست آمده جهت آزمون بررسی مقاومت/حساسیت اکسشن‌های شمشاد جنگلی در برابر قارچ عامل بلایت در آزمایشات گلخانه‌ای بکار گرفته شد.

آماده‌سازی گیاهان شمشاد از مناطق مختلف استان‌های شمالی

با شروع فصل کشت و نهال‌کاری، به تهیه نهال‌های شمشاد از مناطق مختلف رویشگاهی اقدام شد. جمعیت‌های مختلف شمشاد از ۱۲ رویشگاه‌ها طبیعی آن در استان‌های گلستان، مازندران و گیلان تهیه شد. لیست این جمعیت‌ها در جدول ۱ آمده است. نهال‌های بدست آمده به مجتمع تحقیقات البرز (زیر مجموعه مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور) منتقل، در گلدان‌های پلاستیکی غرس گردیدند و به‌منظور اطمینان از سلامت آنها به‌مدت شش ماه در مجتمع نگهداری شدند و وضعیت سلامتی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت از نهال‌های مربوط به هر رویشگاه نهال‌های سالم و هم‌اندازه برای ارزیابی‌های گلخانه‌ای انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی میزان حساسیت/مقاومت جمعیت‌ها به بیماری بلایت

پس از آماده‌سازی سوسپانسیون اسپور قارچی و نهال گیاه میزبان، در گلخانه‌ایی با دما و رطوبت کنترل شده ۲۲ تا ۲۵ درجه سیلیسیوس و رطوبت ۹۰٪ و دوره نوری ۱۶ ساعت نور (۵۰۰۰ –۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی، مایه‌زنی گیاهان از طریق محلول‌پاشی سوسپانسیون اسپوری قارچ بیمارگر *C. pseudonaviculata* با غلظت ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر روی برگ‌های شمشاد و از چهار جهت گیاه برای آغشته‌سازی کامل آنها با قارچ بیمارگر انجام گردید. در گیاهان شاهد از آب برای پاشش روی گیاهان استفاده شد.

میزان حساسیت پایه‌ها بر اساس شدت ظهور علائم بیماری، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور سه هفته پس از تلقیح (LaMondia & Shishkoff, 2017)، میانگین تعداد لکه‌های ایجاد شده روی ساقه و برگ‌های هر یک از گیاهان شمشاد مورد شمارش و ثبت قرار گرفت. جهت محاسبه این میانگین در هر گیاه انفرادی، هر ده سانتی‌متر از ارتفاع گیاه بعنوان یک واحد در نظر گرفته شد و تعداد لکه‌های برگی و شاخه‌ای تمام واحدها در گیاه شمارش شد، سپس میانگین تعداد لکه‌های گیاه به ازای هر ده سانتی‌متر از ارتفاع گیاه محاسبه گردید (LaMondia & Shishkoff, 2017). همچنین متوسط قطر بزرگترین لکه برگی برای هر گیاه تعیین شد (Van Laere *et al.*, 2019). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون ناپارامتریک Square-Chi و کروسکال والیس (Kruskal-wallis) نرم‌افزار spss نسخه ۲۱ انجام شد.

نتایج

ارزیابی میزان حساسیت/مقاومت جمعیت‌ها به بیماری بلایت

نتایج نشان داد در کلیه جمعیت‌های شمشاد مایه‌زنی شده، علائم لکه‌برگی ایجاد شده و دچار ریزش برگ شدند (شکل ۲).

اگرچه کلیه جمعیت‌های شمشاد جنگلی *B. sempervirens* در برابر هجوم قارچ عامل بلایت، حساس بوده و در واقع هیچ پایه کاملا مقاومی نسبت به این بیماری در میان آنها وجود نداشت؛ اما میان تعداد لکه‌های بلایت در هر گیاه که پس از مایه‌زنی قارچ عامل بلایت روی گیاهان ایجاد شده بود اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲).

همچنین در بین ویژگی متوسط قطر بزرگترین لکه برگی بلایت که روی گیاهان ایجاد شده بود اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۳).

در واقع تعدادی از جمعیت‌ها کمتر به سوختگی شمشاد حساس بودند و بیماری در آنها شدت پایین‌تری داشت (جدول ۴).

دو اکسشن از مازندران با داشتن میانگین تعداد لکه‌های کمتر از ۵ عدد در هر ده سانتی‌متر از ارتفاع گیاه، اکسشن‌های با حساسیت پایین‌تر شناخته شدند. در حالی‌که اکسشن‌های مربوط به استان گلستان با داشتن میانگین تعداد لکه‌های بیشتر از ۱۵ عدد در هر ده سانتی‌متر از ارتفاع گیاه، بعنوان حساس‌ترین اکسشن‌ها شناخته شدند.

نتایج مشابهی هنگام مقایسه نمرات قطر لکه برگی و تعداد لکه های بلایت در هر گیاه وجود داشت. در واقع در گیاهان دارای تعداد بالاتری از لکه‌های بلایت، قطر بالاتری از لکه برگی نیز وجود داشت (جدول ۴).

بحث

تعیین میزان حساسیت گونه‌ها، کولتیوارها و اکسشن‌های مختلف شمشاد به بیماری بلایت به‌دلایل متعددی حائز اهمیت است. داشتن اطلاعات از حساسیت نسبی به بیماری بلایت در انتخاب گیاهان شمشاد برای احیاء رویشگاه‌های جنگلی امری ضروری است چراکه پایدارترین راه حل درازمدت در کنترل بیماری بلایت، یافتن ارقام با مقاومت طبیعی و یا توسعه ارقام شمشاد مقاوم به بیماری است. بطور کلی، زمانی که آسیب اقتصادی بیمارگر بالا باشد، مانند مورد *Calonectria* در شمشاد، نه تنها یافتن مقاومت طبیعی، بلکه ایجاد مقاومت به بیماری در برنامه‌های اصلاحی نیز اولویت بالایی دارد (Van Laere, 2019).

شکل ۲- ظهور نشانه‌های آلودگی (لکه‌برگی و کلنی قارچی) بعد از مایه‌زنی قارچ بلایت شمشاد (*Calonectria pseudonaviculata*)، روی برگ‌های شمشاد جنگلی (راست) و گسترش آلودگی و شروع ریزش برگ‌ها (چپ)

Figure 2- Disease symptoms (Leaf spot and fungal colony) following inoculation with boxwood blight (*Calonectria pseudonaviculata*), on the leaves of the Hyrcanian box tree (right), the spread of contamination and falling leaves (left)

جدول ۲- نتایج شاخص‌های آزمون کروسکال والیس جهت مقایسه میانگین تعداد لکه در هر گیاه

Table 2- The results of Kruskal-Wallis test for comparison of the average number of spots per plant

میانگین تعداد لکه‌ها در هر ده سانتی‌متر از ارتفاع گیاه The average number of spots per ten centimeters of plant height	تعداد Number	میانگین رتبه Mean rank	مقدار شاخص کای اسکور Chi-square T value	درجه آزادی Degrees of freedom	سطح معناداری Significance level
1-5	3	2			
6-10	4	5.5			
11-15	3	9			
16-20	1	11			
21-25	1	12			
Total	12		10.30	4	0.036

جدول ۳- نتایج شاخص‌های آزمون کروسکال والیس جهت مقایسه متوسط قطر بزرگترین لکه برگی

Table 3- The results of Kruskal-Wallis test for comparison of the average diameter of the largest leaf spot (mm)

متوسط قطر بزرگترین لکه برگی Average diameter of the largest leaf spot (mm)	تعداد Number	میانگین رتبه Mean rank	مقدار شاخص کای اسکور Chi-square T value	درجه آزادی Degrees of freedom	سطح معناداری Significance level
1-5	2	1.5			
6-10	4	4.5			
11-15	2	7.5			
16-20	3	10			
21-25	1	12			
Total	12		10.56	4	0.032

جدول ٤- حساسیت جمعیت‌های مختلف شمشاد *Buxus sempervirens* جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های شمال ایران به قارچ عامل بیماری بلایت شمشاد (*Calonectria pseudonavicula*)

Table 4- Susceptibility of *Buxus sempervirens* accessions from the Habitats of northern Iran to boxwood blight (*Calonectria pseudonavicula*)

شماره No.	کد اکسشن Accession code	منطقه جمع‌آوری Area/sample collection site	میانگین تعداد لکه در هر گیاه Average number of spots per plant	متوسط قطر بزرگترین لکه برگی Average diameter of the largest leaf spot (mm)
1	*B. sempervirens* 'Noshahr'	مازندران، نوشهر Noshahr, Mazandaran	13.1	18
2	*B. sempervirens* 'Tonekabon'	مازندران، نوشهر Tonekabon, Mazandaran	4.5	5
3	*B. sempervirens* 'Chalous'	مازندران، نوشهر Chalous, Mazandaran	7.8	7
4	*B. sempervirens* 'Noor'	مازندران، نوشهر Noor, Mazandaran	11.6	9
5	*B. sempervirens* 'Neka'	مازندران، نوشهر Neka, Mazandaran	2.9	4
6	*B. sempervirens* 'Abbas abad'	مازندران، نوشهر Abbas abad, Mazandaran	6	11
7	*B. sempervirens* 'Dorostkar'	گیلان، ذخیره گاه جنگلی دکتر درستکار Dr. Dorostkar forest park, Guilan	8.2	7
8	*B. sempervirens* 'Shafarood'	گیلان، شفارود Shafaroud, Guilan	7.3	12
9	*B. sempervirens* 'Siahkal'	گیلان، سیاهکل Siahkal, Guilan	12.7	17
10	*B. sempervirens* 'Roodsar'	گیلان، رودسر Roodsar, Guilan	6.4	7
11	*B. sempervirens* 'Cheshmeh bolbol'	گلستان، چشمه بلبل Cheshmeh bolbol, Guilan	19.5	18
12	*B. sempervirens* 'Bandar Gaz'	گلستان، بندرگز Bandar Gaz, Guilan	21.7	23

تنوع ژنتیکی بالا (Thammina *et al.*, 2017) و در دسترس بودن منابع مقاومت به بیماری در جنس شمشاد (Gehesquière, 2017; Henricot *et al.*, 2008; LaMondia & Shishkoff, 2014) فرصت‌هایی بی‌نظیر را برای ایجاد برنامه اصلاحی بین گونه‌ای با تمرکز بر مقاومت به بیماری ایجاد کرده‌اند (Van Laere *et al.*, 2015).

در تحقیق حاضر مشخص شد که تمام اکسشن‌های شمشاد خزری نسبت به آلودگی بیماری بلایت حساس بودند. این نتایج با مطالعات دیگر محققین دنیا روی گونه *B. sempervirens* مطابقت دارد (Ehsen, 2011; Ganci *et al.*, Henricot *et al.*, 2008; 2013; Gehesquière 2014; LaMondia & Shishkoff 2017). به‌طور کلی، چه در ارزیابی‌های صورت گرفته روی شاخه‌های بریده شمشاد (Henricot *et al.*, 2008) و چه ارزیابی روی گیاهان کامل در گلخانه یا نهالستان (Ganci *et al.*, 2013)، مشخص شده است که کولتیوارهای *B. sempervirens* حساس می‌باشند؛ درحالی‌که حساسیت در کولتیوارهای گونه شمشاد *B. microphylla* کمتر است.

هنریکات و همکاران (Henricot *et al.*, 2008) از روش برگ‌های جدا شده برای ارزیابی مقاومت استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که حساس‌ترین گیاهان (بر اساس درصد لکه برگی) شامل *B. sempervirens* 'Suffruticosa'، *B. sinica* var. *insularis* و *B. harlandii* بودند و *B. microphylla* کمتر مستعد ابتلا به این بیماری بود، اگرچه شدت بیماری بسته به ایزوله مورد استفاده تفاوت داشت. گنسی و همکاران (Ganci *et al.*, 2013) طیف وسیعی از حساسیت را در میان گونه‌ها و اکسشن‌های مختلف شمشاد مشاهده کردند و به این نتیجه رسیدند که ارقام *B. sempervirens* حساس‌ترین و *B. microphylla* var. *japonica*، *B. sinica* var. *insularis*، *B. harlandii* و *B. microphylla* کمترین حساسیت را داشتند.

گائو و همکاران (Guo *et al.*, 2016) تکنیک‌های مختلف

غربالگری و حساسیت هشت کولتیوار شمشاد به بیماری بلایت را ارزیابی کردند و به این نتیجه رسیدند که در غربالگری‌ها میسلیوم یا هاگ می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد؛ اما آزمایش‌های صورت گرفته روی شاخه‌های بریده شمشاد (detached leaves and stems) یا کلِ گیاه (whole plant) نتایج نامشابه را ارائه می‌دهد. مطابق با نتایج تحقیق مذکور، آنها در ارزیابی‌های صورت گرفته روی کل گیاه دریافتند که کولتیوارهایی از *B. sempervirens* وجود دارد که حساسیت آنها به بلایت در رنج متوسط قرار می‌گیرد. بر اساس نتایج تحقیق حاضر نیز، اگرچه تمام اکسشن‌های مورد بررسی *B. sempervirens* در برابر بیماری بلایت حساس بودند؛ اما میان تعداد لکه‌های بلایت و همچنین قطر بزرگترین لکه برگی بلایت که در اکسشن‌ها ایجاد شده بود اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به عبارت دیگر حساسیت تعدادی از اکسشن‌ها به بلایت شمشاد کمتر بوده و بیماری در آنها شدت پایین‌تری داشت.

این نتایج سودمندی استفاده از روش‌های شاخه‌های بریده برای غربالگری واکنش به بیماری را زیر سوال می‌برد و نشان می‌دهد که برخی از اجزای مقاومت ممکن است سیستمیک باشند (Browne *et al.*, 2005) و روش شاخه بریده نمی‌تواند بیانگر تین نوع مقاومت سیستمیک باشد. در حالی‌که در روش غربالگری مقاومت بر اساس مطالعه بیماری‌زایی روی گیاهان کامل، مانند آنچه در این تحقیق به کار گرفته شد، به‌دلیل بروز مقاومت سیستمیک القایی یا مکانیسم‌های دیگر مقاومت موجود در گیاهان کامل و همچنین منظور شدن معماری گیاه در بروز مقاومت، نتایج معتبرتر است.

سنجش‌های غربالگری روی برگ یا شاخه‌های بریده سریع‌تر و کم‌هزینه‌تر هستند و می‌توانند به‌عنوان غربال‌های اولیه مفید باشند (Zamani & Mojerlou, 2020)، اما لازم است با ارزیابی حساسیت از طریق آزمون روی کل گیاه تکمیل شوند.

بر اساس مطالعات صورت گرفته در دنیا مشخص شده است که در مورد گیاهان شمشاد حساسیت به *C. pseudonaviculata* در یک رقم معین را می‌توان بر اساس دو شاخص اساسی تخمین زد: حساسیت میزبان به آلودگی (شروع بیماری) و میزان توسعه ضایعه پس از آلودگی به *C. pseudonaviculata* (پیشرفت بیماری) (LaMondia & Shishkoff, 2017; Van Gehesquière, 2014; Laere *et al.*, 2019).

بویژه، به نظر می‌رسد که تفاوت در توسعه ضایعه (لکه برگی)، به نحو مؤثرتری اختلاف در حساسیت به بیماری را بین گونه‌ها و ارقام نشان می‌دهد. مشابه با تحقیق حاضر، وان لیر و همکاران (Van Laere *et al.*, 2019) گزارش نموده‌اند ارقام با تحمل پایین‌تر نسبت به بیماری، پس از تلقیح با *C. pseudonaviculata* لکه برگی‌های بزرگ‌تر و با رشد سریع را نشان می‌دهند. در حالی‌که ارقامی که مقاومت بالاتری نسبت به بیماری دارند، لکه برگی‌های کوچکتر را ایجاد می‌کنند. در این ارقام مقاوم، رشد لکه برگی‌ها در نهایت متوقف خواهد شد. همچنین *C. pseudonaviculata* در لکه‌های کوچک به میزان کمتری هاگ ایجاد می‌کند و به این ترتیب وجود مقاومت در گیاه بطور مؤثری از گسترش بیماری جلوگیری می‌کند. بنابراین، تعداد لکه‌های بلایت در هر گیاه و قطر لکه برگی دو پارامتر مناسب برای ارزیابی شدت *C. pseudonaviculata* شناخته شدند.

در مطالعه خزائلی و همکاران (Khazaeli *et al.*, 2016) برای ارزیابی شدت بیماری در میان ۳۵ جدایه از این قارچ علاوه بر ارزیابی شاخص شدت بیماری (Disease severity index)، فاکتور ریزش برگ‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در مطالعه ایشان محاسبه ضریب همبستگی پیرسون برای یافتن همبستگی بین نتایج حاصل از این دو روش ارزیابی در برآورد و مقایسه شدت بیماری جدایه‌ها، نشان داد که از هر دو روش می‌توان برای ارزیابی شدت بیماری استفاده کرد. ایشان توصیه نمودند با توجه به اینکه خزان برگ‌ها از علائم اصلی این بیماری است و بیشتر خسارت بیماری بواسطه ریزش برگ‌ها می‌باشد، برای آزمون ارزیابی و مقایسه میزان بیماریزایی یا قدرت تهاجمی جدایه‌ها در گلخانه می‌توان از شاخص درصد برگ‌های ریزش یافته که روشی صریح‌تر و آسان‌تر است و نتایج آن همبستگی بالایی با روش شاخص برگی دارد، استفاده نمود.

تنوع ژنتیکی بسیار کمی در جمعیت‌های ایرانی قارچ *C. pseudonaviculata* وجود دارد؛ بطوری‌که در مطالعه خزائلی و همکاران (Khazaeli *et al.*, 2017) درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس ژن بتا توبولین، نشان داد که تمامی جدایه‌ها در یک گروه قرار دارند.

همچنین بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگر ژنومی rep تأیید کرد که جمعیت جدایه‌های این قارچ در ایران از تنوع ژنتیکی پایینی برخوردار هستند. بطوری‌که در سطح اختلاف ژنتیکی ۵ درصد جمعیت مورد بررسی به چهار گروه ژنتیکی مجزا تفکیک شدند (Zamani & Mojerlou, 2020). در این تحقیق از هر یک از چهار گروه ژنتیکی یک جدایه بعنوان نماینده انتخاب و با مخلوط نمودن سوسپانسیون اسپوری چهار جدایه مذکور و بکارگیری استوک حاصل در مایه‌زنی گلخانه‌ای تلاش شد شرایطی مشابه با آنچه گیاهان در رویشگاه‌های طبیعی کشور با آن مواجه هستند ایجاد گردد. بنابراین، اکسشن‌هایی از شمشاد خزری که علائم بیماری را پس از تلقیح مصنوعی با شدت بیشتری نشان می‌دهند، احتمالا در شرایط عرصه‌ای و تحت آلودگی طبیعی نیز با شدت بیشتری بیمار خواهند شد.

این مطالعه برای اولین بار روی حساسیت به بیماری بلایت در اکسشن‌های مختلف گونه *Buxus sempervirens* subsp. *hyrcana* از رویشگاه‌های شمشاد شمال کشور بعنوان تنها گونه شمشاد بومی و در حال انقراض ایران انجام شد و بر اساس نتایج گلخانه‌ای انجام شد و مشخص گردید درجاتی از تحمل به بیماری را

می‌توان در میان پایه‌های مختلف آن یافت. این نتایج نشان می‌دهد که این پتانسیل برای متخصصین اصلاح نبات وجود دارد که شمشادهای با حساسیت کمتر را انتخاب و توصیه کنند و یا ارقام با مقاومت اصلاح شده در برابر بلایت شمشاد را توسعه دهند.

References

1. Akhani, H., Djamali, M., Ghorbanalizadeh, A., & Ramezani, E. (2010). Plant biodiversity of Hyrcanian relict forests in Iran: An overview of the flora, vegetation, palaeoecology and conservation. *Pakistan Journal of Botany*, *42*(1), 231-258.
2. Avenot, H.F., King, C., Edwards, T.P., Baudoin, A., & Hong, C.X. (2017). Effects of inoculum dose, temperature, cultivar, and interrupted leaf wetness period on infection of boxwood by *Calonectria pseudonaviculata*. *Plant Disease*, *101*(6), 866-873. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0742-RE
3. Batdorf, L.R. (2004). *Boxwood: An illustrated encyclopedia*. American Boxwood Society, Boyce, VA.
4. Baudoin, A., Avenot, H.F., Edwards, T., Diallo, Y., & Lucernoni, C. (2015). Evaluation of fungicides for control of boxwood blight. *Plant Disease Management, Reports 9*, OT006.
5. Browne, R.A., Cooke, B.M., Devaney, D., Murphy, J.P., Walsh, E.J., Griffey, C.A., Hancock, J.A., Harrison, S.A., Hart, P., Kolb, F.L., McKendry, A.L., Milus, E.A., Sneller, C., & Van Sanford, D.A. (2005). Evaluation of components of *Fusarium* head blight resistance in soft red winter wheat germ plasm using a detached leaf assay. *Plant Disease*, *89*, 404-411. https://doi.org/10.1094/PD-89-0404
6. Crous, P.W., Groenewald, J.Z., & Hill, C.F. (2002). *Cylindrocladium pseudonaviculata* sp. nov. from New Zealand, and new *Cylindrocladium* records from Vietnam. *Sydowia*, *54*, 23-34.
7. Crous, P.W., Janse, B.H.J., Victor, D., Marais, G.F., & Alfenas, A.C. (1993a). Characterization of some *Cylindrocladium* species with three-septate conidia using morphology, isozyme banding patterns and DNA polymorphisms. *Systematic and Applied Microbiology*, *16*, 266-273. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80479-0
8. Crous, P.W., Wingfield, M.J., & Alfenas, A.C. (1993b). *Cylindrocladium parasiticum* sp. nov., a new name for *C. crotalariae*. *Mycological Research*, *97*, 889-896. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81168-4
9. Dart, N.L., Allen, C., & Hong, C.X. (2015). Efficacy of bleach and ethanol as sanitizers on the boxwood blight pathogen, *Calonectria pseudonaviculata*. *Virginia Nursery and Landscape Association Newsletters*, *85*, 46-47.
10. Ehsen, B. (2011). In de afächlichkeit gibt es deutliche sortenunterschiede. *Deutsche Baumschule*, *8*, 48-49.
11. Ershad, G. (2009). Fungi of Iran. Agricultural research, Education & Extension Organization (AREEO), Ministry of agriculture. Tehran.
12. Fakhredin, F., Mirabolfathy, M., & Pirnia, M. (2016). *Comparative effects of some fungicides to control boxwood blight.* Proceeding of 21th Iranian plant protection congress, Orumieh, Iran, p. 69-70.
13. Ganci, M.L., Benson, D.M., & Ivors, K.L. (2013). Susceptibility of commercial boxwood cultivars to *Cylindrocladium buxicola*, the causal agent of box blight. *Phytopathology*, *103*, 47. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1014.83
14. Gehesquière, B. (2014). *Cylindrocladium buxicola* nom. Cons; prop. (syn. *Calonectria pseudonaviculata*) on *Buxus*: molecular characterization, epidemiology, host resistance and fungicide control. Ph.D. thesis, Ghent University, Ghent, Belgium.
15. Gehesquière, B., Crouch, J.A., Marra, R.E., Van Poucke, K., Rys, F., Maes, M., & Heungens, K. (2016). Characterization and taxonomic reassessment of the box blight pathogen *Calonectria pseudonaviculata*, introducing *Calonectria henricotiae* sp. nov. *Plant Pathology*, *65*(1), 37-52. https://doi.org/10.1111/ppa.12401
16. Guo, Y., Olsen, R.T., Kramer, M., & Pooler, M. (2016). Use of mycelium and detached leaves in bioassays for assessing resistance to boxwood blight. *Plant Disease*, *100*(8), 1622-1626. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0016-RE
17. Henricot, B. (2006). *Box blight rampages onwards: The latest news on the spread and control of a devastating disease*. Plantsman London, 153 p.
18. Henricot, B., & Culham, A. (2002). *Cylindrocladium buxicola*, a new species affecting *Buxus* spp., and its phylogenetic status. *Mycologia*, *94*, 980-997. https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833155
19. Henricot, B., & Wedgwood, E. (2013). Evaluation of foliar fungicide sprays for the control of boxwood blight, caused by the fungus *Cylindrocladium buxicola*. *Plant Health Progress*. https://doi.org/10.1094/PHP-2013-1024-01-RS
20. Henricot, B., Gorton, C., Denton, G., & Denton, J. (2008). Studies on the control of *Cylindrocladium buxicola* using fungicides and host resistance. *Plant Disease*, *92*, 1273-1279. https://doi.org/10.1094/PDIS-92-9-1273
21. Ivors, K.L., Lacey, L.W., Milks, D.C., Douglas, S.M., Inman, M.K., Marra, R.E., & La-Mondia J.A. (2012). First report of boxwood blight caused by *Cylindrocladium pseudo naviculatum* in the United States. *Plant Disease*, *96*, 1070-1070. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0247-PDN
22. Khazaeli, P., Mirabolfathy, M., Zamanizadeh, H., & Kiadaliri. H. (2018). Genetic and phenotypic variation of

Calonectria pseudonaviculata isolates causing boxwood blight disease in the Hyrcanian forest of Iran. *Agricultural Research & Technology Open Access Journal*, *19*(1), 556081. https://doi.org/10.19080/artoaj.2018.19.556081

23. Khazaeli, P., Rezaee, S., Mirabolfathy, M., Zamanizadeh, H.R., & Kiadaliri, H. (2016). Distribution, specific detection and the pathogenesis variation of *Calonectria pseudonaviculata* isolates causal agent of boxwood blight disease, in Hyrcanian forest of Iran. *Iranian Applied Entomology and Phytopathology*, 78-90. https://doi.org/10.22092/jaep.2016.106536
24. Khazaeli, P., Rezaee, S., Mirabolfathy, M., Zamanizadeh, H.R., & Kiadaliri, H. (2017). Study on genetic variation of Hyrcanian *Calonectria pseudonaviculata*. *Journal of Microbial World*, *10(2)*, 164-175.
25. Khazaeli, P., Rezaeei, S., Mirabolfathy, M., Zamanizadeh, H., & Kiadaliri, H. (2015). Report of boxwood blight extension to Golestan province forests. *Applied Entomology and Phytopathology*, *83*, 85-86. https://doi.org/10.22092/jaep.2015.101701
26. Kong, P., & Hong, C. (2017). Biocontrol of boxwood blight by *Trichoderma koningiopsis* Mb2. *Crop Protection*, *98*, 124-127. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.015
27. Kramer, M., Guo, Y.H., & Pooler, M. (2020). Ranking resistance of *Buxus* cultivars to boxwood blight-an integrated approach. *Journal of Environmental Horticulture*, *38*(2), 50-55. https://doi.org/10.24266/0738-2898-38.2.50
28. LaMondia, J.A., & Shishkoff, N. (2017). Susceptibility of boxwood accessions from the national boxwood collection to boxwood blight and potential for differences between *Calonectria pseudonaviculata* and *C. henricotiae*. *HortScience*, *52*(6), 873-879. https://doi.org/10.21273/HORTSCI11756-17
29. LaMondia, J.A. (2014). Fungicide efficacy against *Calonectria pseudonaviculata*, causal agent of Boxwood Blight. *Plant Disease*, *98*, 99-102. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0373-RE
30. LaMondia, J.A. (2015). Management of *Calonectria pseudonaviculata* in boxwood with fungicides and less susceptible host species and varieties. *Journal of Plant Disease*, *99*(3), 363-369. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0217-RE
31. Lombard, L., Crous, P.W., Wingfield, B.D., & Wingfield, M.J. (2010). Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. *Studies in Mycology*, *66*, 31-69. https://doi.org/10.3114/sim.2010.66.03
32. Mirabolfathy, M. (2013). Outbreak of boxwood tree leaf drop in Guilan and Mazandaran forests. Proceeding of 1st Iranian Mycological Conference, 3-5 Sep. 2013, University of Rasht, Guilan, Iran, Pp. 8.
33. Mirabolfathy, M., Ahangaran, Y., Lombard, L., & Crous, Y.P.W. (2013). Leaf blight of *Buxus sempervirens* in northern forests of Iran caused by *Calonectria pseudonaviculata*. *Plant disease*, *97*(8), 1121-1122. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0237-PDN
34. Naseri, B., Shafizadeh, F., Nourshad, M., Ahangaran, Y., & Rezaee, G. (2022). Ex-situ conservation of Hyrcanian boxwood. *Iran Nature*, *7*(1), 53-58. (In Persian). https://doi.org/10.22092/irn.2022.357787.1447
35. Rezaee, S., Kia-daliri, H., Sharif, K., Ahangaran, Y., & Hajmansoor, S. (2013). Boxwood blight caused by *Cylindrocladium buxicola* in Tonekabon forest. *Applied Entomology and Phytopathology*, *80*(2), 197-198. (In Persian). https://doi.org/10.22092/jaep.2013.100577
36. Shamekhi, T. (2011). *Rules and Management of Natural Resources*. Tehran University Press, 287pp. (In Persian)
37. Shishkoff, N. (2016). Survival of microsclerotia of *Calonectria pseudonaviculata* and *C. henricotiae* exposed to sanitzers. *Plant Health Progress*, *17*, 13-17. https://doi.org/10.1094/PHP-RSe15e0038
38. Shishkoff, N., Daughtrey, M., Aker, S., & Olsen, R.T. (2015). Evaluating boxwood susceptibility to *Calonectria pseudonaviculata* using cuttings from the national boxwood collection. *Plant Health Progress*. https://doi.org/10.1094/PHP-RS-14-0033
39. Thammina, C.S., Olsen, R.T., Kramer, M., & Pooler, M.R. (2017). Genetic relationships of boxwood (*Buxus* L.) accessions based on genic simple sequence repeat markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *64*, 1281-1293. https://doi.org/10.1007/s10722-016-0436-6
40. Van Laere, K., Hermans, D., Leus, L., & Van Huylenbroeck, J. (2015). Interspecific hybridisation within *Buxus* spp. *Scientia Horticulturae*, *185*, 139-144. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.030
41. Van Laere, K., Heungens, K., Gehesquière, B., Leus, L., Hermans, D., & Van Huylenbroeck, J. (2019). Breeding and selection of Buxus for resistance to *Calonectria pseudonaviculata*. *Journal of Phytopathology*, 1-8. https://doi.org/10.1111/jph.12807
42. Zamani, S.M., & Mojerlou, S. (2020). Phenotypic and genotypic diversity of boxwood blight causal agent populations in Iran. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, *33*(4), 938-952. (In Persian)