مقاله مروری

کاربرد عوامل کنترل زیستی در مدیریت بیماری گال باکتریایی طوقه

فهیمه نظری

مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: فهیه نظری، ایمیل: Fahimehnazari236@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۵ ۸(۲)۹۳-۱۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰

چکیده

بیماری گال باکتریایی طوقه و ریشه، یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی در بسیاری از گونه‌های گیاهی است که توسط باکتری *Agrobacterium radiobacter* ایجاد می‌شود. مهم‌ترین نشانه این بیماری رشد اضافه به شکل غده در طوقه گیاهان و گاه تنه نهال‌ها و درختان، همچنین کاهش رشد و ضعف گیاهان آلوده است. این بیماری یکی از خسارت‌زاترین بیماری‌های باکتریایی است که حداقل در ۴۰ گونه گیاهی اعم از درختان مثمر و غیرمثمر، گیاهان زراعی و زینتی اهمیت اقتصادی دارد. عدم موفقیت سموم شیمیایی درکنترل این بیماری، ضرورت کنترل یا پیشگیری از این بیماری را به روش کنترل بیولوژیک نشان می‌دهد. این امر موجب شده که امروزه محققین به دنبال استفاده از راه‌های کنترل بیولوژیک به‌عنوان کم خطرترین روش از نظر زیست محیطی برای کنترل بیماری‌ها باشند. این مقاله خلاصه‌ای جامع از اکتشافات و پیشرفت‌های جدید در درک ما از کاربرد عوامل زیستی در کنترل بیماری گال باکتریایی طوقه است.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، گال طوقه، بیوکنترل، مکانیسم اثر

مقدمه

بیماری گال طوقه به‌عنوان خسارت‌زاترین بیماری باکتریایی قرن بیستم شناخته شده است (Kennedy & Alcorn, 1980). عامل بیماری باکتری (*A. tumefaciens*) *Agrobacterium radiobacter* است که در میان باکتری‌ها، گسترده‌ترین دامنه میزبانی را درگیاهان به خود اختصاص داده و به ۶۳۴ گونه از ۳۳۱ جنس و ۹۳ خانواده گیاهی، اعم از چوبی (مثمر یا غیر مثمر) تا زراعی مانند چغندرقند حمله می‌کند. میزبان اصلی این باکتری گیاهان دولپه‌ای‌اند و فقط ۳ ٪گیاهان تک لپه به آن حساس هستند. خسارت این باکتری در حداقل ۴۰ گونه گیاهی از گیاهان رز، تبریزی، میخک، شمشاد، فیکوس، کاج، درختان میوه هسته‌دار، دانه‌دار و دانه‌ریز (انگور و انجیر) و خشکباری اهمیت اقتصادی دارد (Kennedy & Alcorn, 1980; Sobiczewski *et al*., 1991; Aeini *et al*., 2014; Rouhrazi & Rahimian, 2014; Mafakheri *et al*., 2017; Mafakheri *et al*., 2019; Basavand *et al*., 2020; Ganjeh *et al*., 2020; Mafakheri *et al*., 2021). بیماری گال طوقه در باغ و به‌خصوص در خزانه اهمیت اقتصادی بالایی دارد (Krimi *et al*., 2002). در طی سال‌های گذشته، طبقه‌بندی جنس اگروباکتریوم دستخوش تغییرات زیادی شده است. این جنس در ابتدا بر اساس خصوصیات میزبانی و بیماریزایی به پنج گونه شامل *A. tumifaciens* (مولد گال طوقه)، *A.rhizogenes* (مولد ریشه مویی)، *A.rubi* (مولد گال طوقه تمشک)، *A. radiobacter* (غیر بیماریزا) (Allen & Holding, 1974) و *A. vitis* (مولد گال طوقه انگور) تقسیم شد (Ophel & Kerr, 1990). در سال ۲۰۰۱، Young و همکاران، گونه‌های بیماریزای جنس اگروباکتریوم را براساس توالی ژن 16S rRNA به جنس *Rhizobium* انتقال دادند (Young, *et al*., 2001)، همچنین پیشنهاد تغییر گونه *A. tumefaciens* به *R.*

radiobacter نیز توسط آن‌ها ارائه شد (Young *et al.*, 2003 & 2004) که مورد قبول واقع نشد. بعدها، *A. tumefaciens* به‌عنوان یک گونه کمپلکس با ۱۱ گونه ژنومی شناخته شد که به‌تدریج براساس مطالعات مولکولی اسم گونه به آن‌ها تعلق گرفت (Lindstrom & Young, 2011; Lassalle *et al.*, 2011; Panday *et al.*, 2011; Puławska *et al.*, 2012; Mousavi *et al.*, 2014). گونه ژنومی ۴ این گونه کمپلکس شامل جدایه‌های *A. radiobacter* و *A. tumefaciens* بود لذا *A. tumefaciens* تحت نام *A. radiobacter* نامگذاری شد (Lindstrom & Young, 2011). در سال ۲۰۱۵، Mousavi و همکاران سه گونه جدید *A. nepotum* comb. nov، *A. pusense* comb. nov و *A. skierniewicense* comb. nov را نیز در این جنس معرفی کردند (Mousavi *et al.*, 2015). در حال حاضر، با توجه به اختلاف نظرهای موجود، نام آگروباکتریوم متداول بوده و در بین بیماری‌شناسان گیاهی و بسیاری از محققین دیگر بکار گرفته می‌شود.

بهترین روش برای ممانعت از گسترش بیماری گال طوقه، استفاده از مواد گیاهی سالم و ممانعت از آلودگی خاک به باکتری است (Kuzmanovic *et al.*, 2018). تاکنون روش‌های موثر و مطمئنی برای مبارزه شیمیایی با عامل بیماری گال طوقه پیدا نشده است. اگرچه از ترکیبات شیمیایی مختلف مانند ترکیبات مسی استفاده شده است ولی استفاده از سموم مسی و درصد موفقیت کنترل عامل بیماری امیدوارکننده نبوده است (Kado, 2002). کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی به‌عنوان یک روش جایگزین مبارزه شیمیایی به‌دلیل آسیب‌های ناشی از مصرف سموم شیمیایی امروزه جایگاه ویژه‌ای دارد.

با توجه به تنوع دامنه میزبانی و خسارت اقتصادی این بیماری یافتن راهکارهای مدیریتی می‌تواند منجربه کاهش خسارات اقتصادی در نهالستان‌ها، باغ‌ها و مزارع شود. این مقاله خلاصه‌ای جامع از اکتشافات و پیشرفت‌های جدید در درک ما از کاربرد عوامل زیستی در کنترل بیماری گال باکتریایی طوقه، نحوه عمل و جنبه‌های مفقود شده‌ای است که باید در مدیریت کشاورزی پایدار برای تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد.

عامل بیماری

عامل بیماری گال طوقه، باکتری *A. radiobacter* است که یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، هوازی، فاقد اسپور، دارای قابلیت تحرک با ۶–۱ تاژک محیطی و به ابعاد ۳–۱/۵ × ۱–۰/۶ میکرومتراست که به‌صورت منفرد یا جفت دیده می‌شوند. دمای رشد بهینه آنها ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس می‌باشد. کلنی‌ها معمولا محدب، گرد با سطح یکنواخت، سفید لعابدار و براق در محیط‌های قندی، کاتالاز مثبت و معمولا اکسیداز و اوره آز مثبت می‌باشند. بررسی‌های تاکسونومیکی و فیلوژنتیکی گونه‌های اگروباکتریوم اختلاف قابل توجهی را بین سویه‌های آن نشان می‌دهند. باکتری فوق از خانواده رایزوبیاسه است و به همراه باکتری‌های *Allorhizobium vitis* و *Rhizobium rhizogenes* جزو باکتری‌های بیمارگر گیاهی می‌باشد.

علائم بیماری

در گیاهان آلوده، سویه‌های بیماریزای آگروباکتریوم به تکثیر و افزایش حجم غیرطبیعی سلول منجر می‌شوند که این تغییرات در فیزیولوژی سلول‌ها به تشکیل گال منجر می‌شود (Burr *et al.*, 1991). گال در ابتدا به‌صورت توده‌هایی در ریشه یا ساقه نزدیک سطح خاک ظاهر شده و گاهی در قسمت‌های هوایی گیاه دیده می‌شود. تومورهای جوان که اغلب شبیه بافت کالوس هستند، که نرم و تا حدی کروی، سفید تا کرم رنگ هستند که با مسن‌تر شدن تومورها شکل آن‌ها نیز غیرمنظم شده و به رنگ قهوه ای تا سیاه در می‌آیند (Bobeu, *et al.*, 1972). تومورها ممکن است توسط یک بافت نازک به سطح میزبان متصل باشند یا به‌صورت یک قسمت متورم در ساقه که از نظر ظاهری از ساقه جدا نیست، دیده شوند. گال می‌تواند به‌صورت اسفنجی یا دارای یک بافت از هم گسسته یا چوبی و گره‌مانند باشد. گال‌های متعددی ممکن است روی یک گیاه تشکیل شود و از فصلی به فصل دیگر گسترش یابد. علاوه بر رشد اضافه به شکل

گال، کاهش توسعه سیستم ریشه، اختلال در جریان آوندی و ضعف گیاهان آلوده از دیگر علائم این بیماری است. در خزانه‌های پرورش نهال، نهال‌های آلوده به گال، رشدشان متوقف شده (کوتولگی) و برگ‌های آن‌ها حالت کلروز پیدا می‌کند (Gheorghie & Cristea, 2002; Kazempour *et al*., 2007; Parvu *et al*., 2010).

همه‌گیری بیماری

باکتری *Agrobacterium* یک باکتری خاکزاد بوده و از راه زخم وارد گیاه می شود. این زخم‌ها معمولاً از طریق انجام هرس، بیل‌زنی، صدمات ناشی از سرمازدگی، زخم نماتد و غیره به وجود می آیند. قلمه یا اندام آلوده‌ای که از آن برای کشت و احداث تاکستان ها و نهالستان ها استفاده می‌شود می‌تواند منبع دیگر آلودگی باشد. باکتری پس از ورود به گیاه با استفاده از پلازمید بیمارگر خود (Ti) ایجاد گال در گیاه را تحریک می‌کند. این پلازمید حاوی ژن بیمارگری به نام T–DNA (=Transferred DNA) بوده که ژن‌های تولید هورمون رشد گیاهی (اکسین و سیتوکینین) را رمز می‌کند. باکتری با استفاده از ناحیه دیگری به نام Virulenceدر همان پلازمید، ژن را به داخل سلول گیاهی انتقال می‌دهد و سپس این ژن در ژنوم سلول گیاه جای گرفته و سلول گیاه به وسیله این ژن خارجی، تولید هورمون محرک رشد نموده و سلول‌ها دچار تقسیم بیش از اندازه یا رشد بیش از اندازه می‌شوند و گال ایجاد می‌گردد (Miranda *et al*., 1992). عامل بیماری در داخل گال‌ها، تاک‌ها و نیز درون خاک زمستانگذرانی می‌کند و در تاکستان ها و نهالستان ها باقی می‌ماند و در سال‌های بعد موجب ایجاد آلودگی‌های جدید وگسترش بیماری می‌شود. باکتری می‌تواند سال‌های متمادی به‌صورت نهفته و غیرفعال در خاک باقی بماند یا در محل قلمه ایجاد گال نماید. طول دوره انکوباسیون برای سلول‌های باکتریایی در بافت‌های گیاهی بسته به سن گیاه و شرایط محیطی متفاوت است. طول دوره کمون در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس ۱۴–۱۳ روز است. در حالی‌که در دمای پایین‌تر از ۱۵–۱۰ درجه سلسیوس، ۲۸–۲۷ روز زمان لازم است تا علائم بیماری آشکار شوند. پتانسیل بیماریزایی با افزایش رطوبت نسبی به میزان ۹۰–۸۰ درصد زیاد می‌شود و با افزایش نور کم می‌شود. شرایط مناسب بیماری شامل شرایط خاک متراکم و مرطوب، گیاهان آسیب دیده از یخ‌زدگی، کودهای نیتروژنی، سازگاری اندک پایه و پیوندک، زخم‌های ایجاد شده با تگرگ یا حمله نماتد می‌باشند (Severin & Dejeu, 1994). سلول‌های باکتریایی*A. radiobacter* به‌صورت طبیعی در ریزوسفر گیاهان چوبی و نیز بسیاری از علف‌های هرز وجود دارد. بنابراین این بیمارگر طی عملیات شخم و کاشت به راحتی منتشر شده و به‌عنوان مواد گیاهی آلوده با خاک یا ابزار کشت و کار منتشر می‌شود (Severin & Dejeu, 1994).

مدیریت بیماری

بهترین روش مدیریت بیماری گال طوقه استفاده از مواد گیاهی سالم و ممانعت از آلودگی خاک بوسیله باکتری است (Kuzmanovic *et al*., 2018). تاکنون روش‌های موثر و مطمئنی برای مبارزه شیمیایی با عامل بیماری گال طوقه پیدا نشده است. اگرچه از ترکیبات شیمیایی مختلف مانند ترکیبات مسی استفاده شده است، ولی استفاده از سموم مسی و درصد موفقیت کنترل عامل بیماری امیدوار کننده نبوده است. استفاده از مخلوط متیل بروماید با یکی از ترکیبات ۱و ۳ دی کلروپیکرین، کلروپیکرین و متام سدیم، همچنین استفاده از آکرولین (۲–پروپنال) که برای استفاده به صورت یک علف‌کش آبی در سیستم آبیاری فرموله و ثبت شده است، می‌تواند اثر کارآمدی در کنترل *A. tumefaciens* در خاک داشته باشد (Gerik *et al*., 2008a & 2008b). به‌طور کلی با توجه به موقتی و گذرا بودن اثرکنترل شیمیایی در کنترل آگروباکتریوم، این ترکیبات به‌ندرت مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kado, 2002). کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی به عنوان یک روش جایگزین مبارزه شیمیایی، به دلیل عدم موفقیت و خطرات زیست محیطی سموم شیمیایی، امروزه جایگاه ویژه‌ای دارد.

مکانیسم‌های بیوکنترلی عوامل زیستی

کنترل بیولوژیک از جمله روش‌های بهینه در کنترل بیماری‌های گیاهی و سازگار با محیط زیست است و خطراستفاده از سموم شیمیایی را کاهش می‌دهد. از جمله این عوامل می‌توان قارچ‌های *Trichoderma* spp. و سویه‌های باکتریایی *Pseudomonas* sp. و *Bacillus* sp. را نام برد. در این بین باکتری‌ها به‌دلیل استفاده از مکانیسم‌های مختلف بیوکنترلی، نامزدهایی ایده‌آل جهت افزایش رشد گیاه و جلوگیری از بیمارگرهای گیاهی تحت شرایط گلخانه و مزرعه به‌شمار می‌آیند (Siameto *et al*., 2011). سازوکارهای مختلفی که عوامل بیوکنترلی (زیستی) برای مقابله با بیمارگرهای گیاهی استفاده می‌کنند به دو گروه مکانیسم‌های مستقیم و غیر مستقیم تقسیم می‌شوند. مکانیسم‌های مستقیم شامل تثبیت نیتروژن خاک، انحلال فسفات، تولید سیدروفور به منظور کسب آهن، تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه (سیتوکنین، اکسین و اتیلن)، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده (کیتیناز، گلوکوناز، پروتئازو...)، پارازیتیسم، رقابت برای کسب غذا و مکان می باشند. آنتی‌بیوزیس و القا مقاومت در گیاه از جمله مکانیسم‌های بیوکنترلی غیرمستقیم به شمار می روند (شکل ۱) (Ahn, *et al*., 2004; Baker, *et al*., 1974; Jetiyanon *et al*., 2003; Mirzaei *et al*., 2015; Nejad *et al*., 2000; Sun *et al*., 2010; Hervas *et al*., 1998; Manafi *et al*., 2012; Sharma *et al*., 2011).

سویه‌های تریکودرما به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک علیه دامنه بسیار وسیعی از سایر موجودات زنده بیمارگر مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها، پروتوزوآها، نماتدها و حتی ویروس‌ها شناخته می‌شوند (Hervas *et al*., 1998). در حال حاضر فرمولاسیون تعدادی از گونه‌های تریکودرما به‌عنوان آفت‌کش‌های بیولوژیک و همچنین تقویت‌کننده‌ی رشد محصولات کشاورزی در بسیاری از کشورها در دسترس کشاورزان است که این امر باعث کاهش میزان استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی شده است (Vacheron *et al*., 2013). گونه‌های تریکودرما از مکانیسم‌های مختلفی برای مقابله با بیمارگرهای گیاهی استفاده می‌کنند، مانند افزایش مقاومت گیاه و فعال کردن واکنش‌های دفاعی، مایکوپارازیتیسم، آنتی‌بیوز، رقابت، تحریک رشد گیاه، تنظیم و القای فاکتورهای رشدی گیاه شامل اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و اتیلن (Manafi *et al*., 2012). از جمله مهمترین مکانیسم بیوکنترل تریکودرما، تحریک سیستم دفاعی گیاه است که به مقاومت سیستمیک میزبان در مقابل عوامل بیماری‌زا منجر می‌شود (Manafi *et al*., 2012). گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما به دلیل دارا بودن توان ترشح ترکیبات آنتی‌بیوتیک نظیر هارزیانیک اسید، تریکودرمین، تریکوتوکسین، گلیوتوکسین و ویریدین و آنزیم‌های مختلف خارج سلولی در خاک نظیر سلولاز، کیتیناز، لامیناریناز و بتا ۱و ۳ گلوکاناز، توان بالای کلونیزاسیون رایزوسفر، توان اسپورزایی فراوان در محیط خاک، قدرت همزیستی بالا در سطح ریشه، تحمل بالا نسبت به عناصر سنگین خاک، شوری و سایر ترکیبات موجود در محیط خاک و ریشه، رقابت تغذیه‌ای بالا نسبت به عوامل بیماری‌زا و به‌خصوص غیرقابل جذب کردن آهن از طریق تولید سیدروفور و از همه مهمتر توان ایجاد القاء مقاومت و تحریک گیاه به تولید ترکیبات فیتوتوکسینی جایگاه ویژه‌ای دارد (Howell, 2003; Sharma *et al*., 2011). سویه‌های تریکودرما همچنین سبب افزایش حلالیت فسفر و عناصر میکرو شده، قابلیت دسترسی این عناصر را برای گیاه افزایش می‌دهد (Sindhu *et al*., 2009).

باکتری‌های سودوموناس فراوان‌ترین باکتری‌های موجود در ریزوسفر هستند. این باکتری‌ها از طریق تاثیر روی رشد بیمارگر و تولید سیدروفور از اواخر دهه ۱۹۷۰ اهمیت زیادی در کنترل بیولوژیک پیدا کرده‌اند (Baker & Cook, 1974). مکانیزم‌های این گروه باکتری‌ها عبارتند از: رقابت برای کسب آهن از طریق تولید سیدروفورها (Ahn *et al*., 2004)، تولید سیانید هیدروژن (Nejad & Johnson, 2000)، ترشح آنزیم‌های خارج سلولی مانند کیتیناز، بتا ۱ و ۳ گلوکاناز (Mirzaei *et al*., 2015)، پروتئاز و لیپاز (Jetiyanon *et al*., 2003)، تولید آنتی‌بیوتیک‌ها (Ebrahimi–Kazemabad *et al*., 2013)، تولید سیدروفورهای سودوباکتین و پیووردین (Baker & Cook,

(1974) و تحریک رشد گیاه رقابت برای مواد غذایی و اشغال جایگاه‌های میکروبی در منطقه فراریشه و القای مقاومت سیستمیک گیاه است.

باکتری‌های باسیلوس دامنه وسیعی از متابولیت‌های ضد میکروبی قدرتمند نظیر ایتورین، سورفکتین، فنجایسین، باسیلین، دیفیسیدین، ماکرولاکتین را تولید می‌کنند و باعث کنترل بیمارگرهای گیاهی خاکزاد و بیماری‌های پس از برداشت می‌شوند (Pristchepa *et al*., 2006). این باکتری‌ها باعث افزایش رشد و مقاومت القایی در گیاه می‌شوند (Sun *et al*., 2010).

کنترل زیستی بیماری گال باکتریایی طوقه

کنترل زیستی بیماری گال باکتریایی طوقه یک موفقیت بزرگ در مدیریت بیماری‌های گیاهی به‌شمار می‌رود که در نتیجه کشف سویه *Agrobacterium radiobacter* K84 توسط کر (۱۹۸۰) حاصل شده است. این سویه برای اولین بار در استرالیا از هلو جداسازی شد (Kerr, 1980) و تولیدات تجاری آن به نام‌های گالترول ال ⊢ (Galltrol–A) و نوبارک (Nobark) به طور گسترده‌ای در باغ‌های تجاری و به خصوص خزانه درختان میوه هسته‌دار (گیلاس)، خشک (بادام) و رز بکار می‌رود. مکانیسم عمل سویه K84، تولید آنتی‌بیوتیک آگروسین ۸۴ است که توسط پلاسمید pAgK84 رمزگذاری می‌شود (Kim *et al*., 2006). آگروسین ۸۴ یک آنالوگ اوپین است که با اختلال در عملکرد آنزیم DNA gyrase، مانع همانندسازی DNA می‌شود (Kado, 2002). برخی سویه‌های گال‌زا، ژن مقاومت به آگروسین را از سویهK84 گرفته و به آگروسین مقاوم می‌شدند، لذا سویه K1026 به کمک مهندسی ژنتیک از سویه K84 مشتق شد (Jones *et al*., 1988). موفقیت چشمگیر K84 و K1026 در کنترل بیماری گال طوقه ولی عدم اثربخشی آن‌ها در برابر *A. vitis* روی انگور، محققین را به جستجوی سویه‌های باکتریایی کنترل‌کننده گال طوقه انگور وادار کرد. تعدادی از سویه‌های باکتریایی، توانایی مهار رشد *A. vitis* و تشکیل تومور را نشان دادند. از جمله، سویه‌های *A. vitis* E26 (Yang, *et al*., 2009) و VAR03– 1 و ARK–1 (Kawaguchi, *et al*., 2017; Saito, *et al*., 2018)، سویه *Agrobacterium* biovar 1 HLB21 (Pu & Goodman, 1993) و سویه *R. rhizogenes* J73 (Webster *et al*., 1986). علاوه براین، پتانسیل سویه‌های متعلق به سایر جنس‌های باکتریایی برای کنترل گال طوقه انگور نیز آزمایش شد. این تحقیقات شامل سویه‌های مختلف اندوفیت جدا شده از انگور (Bell *et al*., 1995; Ferrigo *et al*. 2017)، سویه‌های مختلف *Pseudomonas* spp. از جمله *P. fluorescens* 1100–6 ، *P.fluorescens* CR330D و *P. aureofaciens* B–4117 (Khmel *et al*., 1998؛ Eastwell *et al*., 2006؛ Biondi *et al*., 2009) و سویه *Rahnella aquatilis* HX2 بود (Chen *et al*. 2007).

این سویه‌ها در مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای اثرات مختلفی روی رشد عامل بیماری‌زا داشتند، همچنین سطوح مختلف سرکوب بیماری را نشان می‌دادند (Habbadi *et al*., 2017). ترکیبات پورین و تومارین به‌دست آمده از سودوموناس فلوروسنت می‌تواند اثر مثبت بیوکنترلی در کنترل بیماری گال طوقه داشته باشد، به‌طوری‌که مو قبل از کشت درون محلولی از پورین و تومارین به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه خیسانده می‌شوند یا ریشه‌های آن‌ها با این ترکیبات بیولوژیکی برای ممانعت از آلودگی بیشتر اسپری می‌شوند (Lemanova, *et al*., 1990). نکته قابل توجه اثر مثبت بیوکنترلی جدایه قارچ *Acremonium* و عوامل کنترل بیولوژیک تجاری *Bacillus subtilis* SR63 و *Trichoderma asperellum* T1 در برابر *A. vitis* بود (Ferrigo *et al*., 2017). سویه غیرگالزای *A. vitis* F2/5، که در ابتدا از انگور جدا شده بود و نشان می‌داد که باعث جلوگیری از گال طوقه انگور در آفریقای جنوبی می‌شود (Staphorst *et al*., 1985)، توسط چندین محقق دیگر مورد مطالعه قرار گرفت (Burr & Reid, 1994; Bazzi *et al*., 1999; Zauner *et al*., 2006).

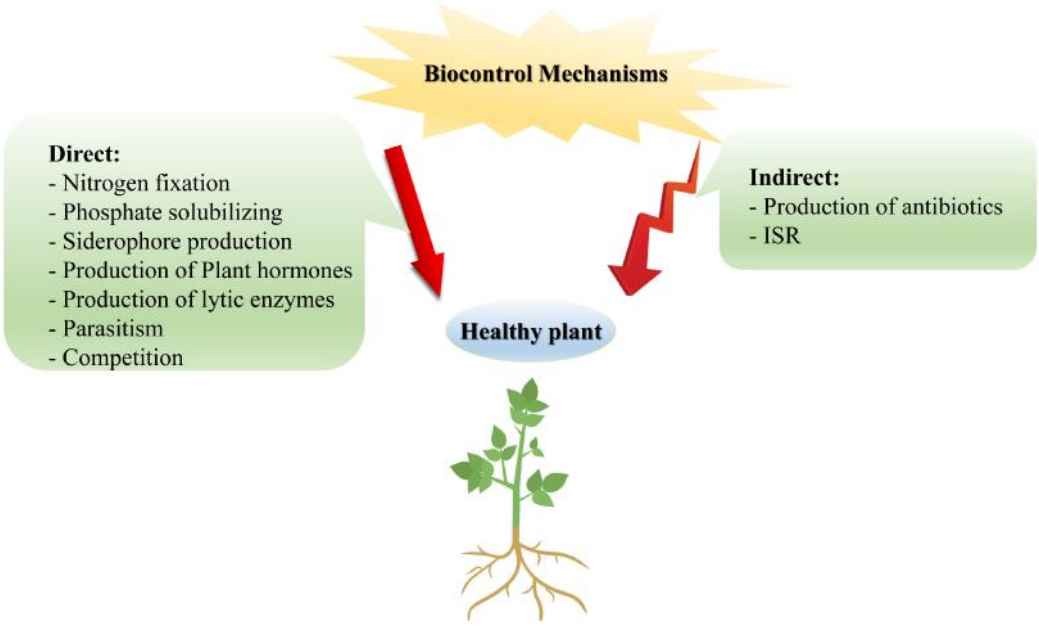
سویه F2/5 از تشکیل انواع تومورهای *A. vitis* در انواع مختلف انگور جلوگیری می‌کرد (Burr & Reid, 1994). اگرچه تشکیل تومور توسط اکثر سویه های *A. vitis* توسط F2/5 مهار می‌شد، اما به نظر می‌رسید که چند سویه تحت

تأثیر قرار نمی‌گرفتند (Staphorst *et al*., 1985)؛ Burr & Reid, 1994. سویه F2/5 همانند سایر سویه‌های *A. vitis*، باعث نکروز در ریشه‌های انگور می‌شد (Burr *et al*., 1987a) همچنین بر ترمیم زخم پیوند و رشد گیاه تأثیر منفی داشت (Hao *et al*., 2017). مکانیسم مولکولی دخیل در نکروز به طور کامل شناخته نشده است، اما در تنظیم سنجش حد نصاب (کروم سنسینگ) و سنتز پلی‌کتیدها و پپتیدهای غیر ریبوزومی دخالت می‌کند (Hao *et al*., 2017; Zheng & Burr, 2016). درک فعلی ما از مسیرهای بیوشیمیایی مرتبط با نکروز و مهار تومور توسط سویه F2/5 نشان دهنده همپوشانی‌های بین آن‌ها است، اما همچنان این دو فرآیندهای متمایزی هستند (Zheng & Burr, 2016). تحقیقات زیادی به‌منظور توصیف و شناسایی عوامل مرتبط با توانایی F2/5 در مهار گال طوقه صورت گرفته است. به‌عنوان مثال، اگرچه F2/5 از ایجاد گال در انگور جلوگیری می‌کند، اما این مهار در سایر گیاهان مانند توتون اتفاق نمی‌افتد. علاوه بر این، برای مهار تشکیل تومور توسط سویهF2/5، سویه فوق بایستی به‌طور همزمان یا قبل از سویه تومورزا روی زخم‌ها و در تعداد سلول‌های مساوی یا بیشتر استفاده شود (Burr & Reid, 1994). همچنین مطالعات نشان داده است که مهار تومور توسط سویه F2/5 در نتیجه رقابت برای ایجاد محل اتصال روی زخم‌های گیاه نیست و مکانیسم مهار آن همچنان پیچیده و ناشناخته باقی مانده است (Kaewnum *et al*., 2013). این مطالعه نشان داده است که مکانیسم ژنتیکی مهار گال با دخالت مکانیسم تنظیمی سنجش حد نصاب و نیز دخالت ژن‌های بیوسنتزی پروتئاز *clp* مرتبط است. علاوه‌براین، تحقیقات دیگر بیانگر توانایی فاژها در امر بیوکنترل گال طوقه می‌باشد. Warren و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که مهار فعالیت آنزیمی پلی گالاکتروناز باکتری آگروباکتریوم توسط فاژ، می‌تواند اثر مهار کنندگی در ایجاد گال داشته باشد. آنزیم فوق یکی از فاکتورهای مهم در بیماریزایی آگروباکتریوم به شمار می‌آید که به تجزیه ترکیبات پکتینی موجود در دیواره سلولی گیاه منجر می‌شود. لذا مهار فعالیت آنزیم فوق به کمک فاژ می‌تواند یک رویکرد امیدوار کننده در راهکار کنترل بیماری باشد (Warren *et al*., 2016). استفاده از باکتری آنتاگونیست *B. subtilis* در کنترل این بیماری توسط نظری و همکاران در سال ۲۰۱۷ پیشنهاد شد (Nazari *et al*., 2017a). باکتری باسیلوس نوعی آنتی بیوتیک به اسم سورفکتین تولید می‌کند که اولین بار توسط Arima و همکاران در سال ۱۹۶۸ از باکتری *B. subtilis* جداسازی شد و نامگذاری این ترکیب نیز به دلیل اثر سورفکتانتی استثنایی این ترکیب بوده است (Peypoux *et al*., 1999). تولید گروه‌های مختلف لیپوپپتیدهای حلقوی با خاصیت ضد میکروبی مانند سورفکتین، ایتورین و فنجایسین توسط باسیلوس‌ها منجر به برتری استرین‌های باسیلوس تولید کننده این ترکیبات در جایگاه اکولوژیکی می‌شود. به نظر می‌رسد لیپوپپتید سورفکتین و مشتقات نزدیک به آن از *B. subtilis*، *B. pumilus* و *B. licheniformis* جداسازی شده‌اند (Huszcza & Burczyk, 2006). لیپو پپتیدهای خانواده سورفکتین از طریق سنتز غیرریبوزومی تولید می‌شود. این ترکیبات دارای اثر ضد باکتری، ضد ویروسی و ضد میکروبی هستند علاوه بر این نقش مهمی در تولید بیوفیلم، کلونیزاسیون و مصون‌سازی میزبان دارد. ایزوفرم‌های C14 و C15 سورفکتین خاصیت ضد ویروسی بیشتری نسبت به C13 نشان می‌دهند (Kracht *et al*., 1999). این ترکیبات یکپارچگی غشای پلاسمایی را به واسطه دارا بودن خاصیت آمفی‌فیلیکی خود تحت تاثیر قرار داده و منجربه ایجاد کانال یا منافذی در غشا سلولی می‌شوند که در نهایت منجربه نشت الکترولیت‌ها و از دست رفتن محتویات سلول و شروع مرگ سلول می‌شوند (Sheppard *et al*., 1991). سورفکتین تولیدی باکتری *B. subtilis* نقش کنترلی خود را از طریق القا آپوپتوزیز و توقف چرخه سلولی انجام می‌دهد (Cao *et al*., 2011). مطالعات Ongena و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که سورفکتین مهمترین السیتوری است که توسط گونه‌های باسیلوس تولید شده و به القا مقاومت ISR در گیاه منجر می‌شود (Ongena *et al*., 2007; Ongena & Jacques, 2008). اثبات اثر ضد باکتریایی سورفکتین علیه آگروباکتریوم و نیز اثر مثبت کاهشی سورفکتین بر میزان کارایی ترانسفورماسیون آگرباکتریوم (Nazari *et al*.,

(Nazari *et al*., 2016; 2021، همچنین اثر مثبت آنتی بیوتیک تولیدی در القای مقاومت گیاه علیه بیماری باکتریای گال طوقه (Nazari *et al*., 2017a ; Nazari *et al*., 2018)، Nazari *et al*., 2020 از جمله خصوصیات مهم بیوکنترلی باسیلوس به شمار می‌روند. نتایج بدست آمده بیانگر اثر مثبت بیوکنترلی *B. subtilis* در کنترل بیماری گال باکتریایی طوقه است. همچنین گونه جدیدی از باسیلوس بنام *B. methylotrophicus* 39b نیز روی گال‌های طوقه گوجه فرنگی اثر کنترلی خوبی نشان داده است (Frikha–Gargouri *et al*., 2017).

مشکلات موجود در بیوکنترل بیماری گال با کتریایی طوقه

هر چند انتظار مدیریت بیماری با کمک روش‌های بیوکنترل بایستی کاملا واقع‌بینانه باشد ولی به‌نظر می‌رسد با استقرار تحقیقات منسجم و کارآمد دستیابی به روش‌های موثر مدیریت بیولوژیک بیماری هر روز بیشتر خواهد شد. گاهی کارایی این روش‌ها به‌خصوص از طرف تولیدکنندگان سموم شیمیایی مورد شک و تردید قرار می‌گیرد ولی در مواردی که استفاده مکرر از ترکیبات شیمیایی نتوانسته مدیریت مناسبی روی بیماری داشته باشد عملا از روش‌های بیولوژیک انتظار تاثیرگذاری بیشتری می‌رود. تنوع طبیعی موجود در خاک و محیط اطراف یکی از مشکلات مهم کاربرد عوامل کنترل زیستی در مزرعه می‌باشد. بسیاری از عوامل مانند استفاده بی‌رویه آفت‌کش و بقایای آنها، دما، رطوبت، نوع خاک و اسیدیته برای استقرار عوامل زیستی کنترلی در منطقه نامطلوب است (Lee *et al*., 2014). اثر کنترلی عوامل‌زیستی علیه بیمارگرهای گیاهی و به‌خصوص آگروباکتریوم در شرایط مزرعه همیشه کمتر از شرایط گلخانه بوده است، که دلیل این امر احاطه شدن عوامل زیستی کنترلی مورد نظر با سایر میکروارگانیسم‌های موجود و برهمکنش آن‌ها می‌باشد، که ممکن است واکنش‌ها و اثرات مولکولی و فنوتیپی بر روی آن‌ها و یا متابولیت‌های تولیدی آن‌ها داشته باشد (Wang *et al*., 2018). فرآیندهایی از قبیل تحرک، اسپورزایی و تشکیل بیوفیلم در باسیلوس‌ها می‌تواند تحت تاثیر سایر میکروارگانیسم‌ها و شرایط محیطی تغییر کند (Wang *et al*., 2018).



شکل ۱. مکانیسم‌های بیوکنترلی عوامل زیستی در مواجه با بیمارگرهای گیاهی.

Fig 1. Biocontrol mechanisms of biological agents against plant pathogens

جدول ۱. عوامل کنترل زیستی مورد استفاده در مدیریت بیماری گال باکتریایی طوقه و مکانیسم عمل آن‌ها.
Table 1. Biocontrol agents used in the management of crown gall and their mode of actions

Biological agents	Mode of action	References
K84 *Rh. radiobacter*	Antibiotic production	Kerr, 1980
K1026 *Rh. radiobacter*	Antibiotic production	Jones *et al*., 1988
A. vitis E26	Antibiotic production, Competition	Yang *et al*., 2009
A. vitis VAR03–1	Expression of virulence gene and the growth of Ti were suppressed	Saito *et al*., 2018
A. vitis ARK–1	(*VirD2* Suppression of virulence genes *VirE2*) and	Kawaguchi *et al*., 2017
A. vitis F2/5	QS regulation and the involvement of specific polyketide and non–ribosomal peptide synthases	Kaewnum *et al*., 2013
Agrobacterium biovar 1 HLB21	Antibiotic production	Pu & Goodman, 1993
Rh. rhizogenes J73	Antibiotic production	Webster *et al*., 1986
P. fluorescens 1100–6	Competition	Eastwell *et al*., 2006
P. aureofaciens B–4117	Competition	Khmel *et al*., 1998
P. fluorescens CR330D	Competition	Khmel *et al*., 1998
Rahnella aquatilis HX2	Competition	Chen *et al*., 2007
B. subtilis SR63	Antibiotic production	Ferrigo *et al*., 2017
T. asperellum T1	ISR	Ferrigo *et al*., 2017
B. subtilis	Antibiotic production, ISR	Nazari *et al*., 2017

Chen و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادکه ترشح لیپوپپتید به‌عنوان متابولیت‌های مهم کنترل زیستی با نوسانات دما مرتبط است. به‌طوری که در دمای بین ۲۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس، میزان تولید لیپوپپتید فنجایسین ۹۶/۶ درصد و میزان تولید سورفکتین ۵۹/۹ درصد افزایش می‌یابد (Chen *et al*., 2020). علاوه بر این، Nazari و همکاران (2017b) نشان دادند، که عناصر معدنی آهن، منگنز و روی نقش مهمی در میزان تولید سورفکتین دارند، بنابراین افزودن این عناصر مهم به خاک ممکن است اثر کنترل زیستی *B. subtilis* در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی را افزایش دهد (Nazari *et al*., 2017b). استفاده از باکتری‌های مفید گیاهان میزان موفقیت عوامل کنترل کننده زیستی را به‌دلیل سازگاری بهتر با میزبان و شرایط محیطی نسبت به گونه‌های جدا شده از سایر گیاهان افزایش می‌دهد (Karimi *et al*., 2016). بنابراین، عوامل محدود کننده اصلی برای کاربرد و تجاری‌سازی این ابزارهای بیولوژیکی در کشاورزی پایدار، استقرار هر چه بهتر عوامل زیستی آنتاگونیستی و نیز ثبات در تولید ترکیبات ضدمیکروبی می‌باشد (Wang *et al*., 2018).

نتیجه گیری

به‌نظر می‌رسد استقرار روش بیولوژیک موثر تنها راه مدیریت بیماری گال باکتریایی طوقه باشد. به‌منظور دستیابی به تکنولوژی کارآمد مدیریت بیماری، استقرار تحقیقات پیامد محور و هدفمند روی عوامل بیوکنترل عامل بیماری ضروری است. بیماری گال باکتریایی طوقه موجب خسارت اقتصادی می‌شود که استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی و عدم موفقیت آن‌ها در کنترل این بیماری ضرورت کنترل یا پیشگیری از این بیماری را به روش کنترل بیولوژیک نشان

می‌دهد. برای کنترل گال‌ها استفاده از روش‌های کنترل شیمیایی با محدودیت‌هایی امکان‌پذیر بوده و این امر هزینه‌های بسیار زیادی را به کشاورزان تحمیل کرده و از طرف دیگر مصرف سموم مشکلات زیست محیطی فراوانی را به‌همراه دارد و مهم‌تر اینکه پس از مصرف سموم با بروز مقاومت باکتری نسبت به سموم مصرفی مواجه می‌گردیم. این امر موجب شده که امروزه محققین بدنبال استفاده از راه‌های کنترل بیولوژیک به‌عنوان کم‌خطرترین روش از نظر زیست محیطی برای کنترل بیماری‌ها باشند. لذا تحقیقاتی که به درک عمیق اساس ژنتیک کنترل بیولوژیک منجر شود، در اولویت است و به‌همین دلیل شناخت مکانیسم مولکولی ایجاد بیماری ونحوه پاسخ گیاه از ضروری‌ترین موضوعات تحقیقاتی درآینده به‌شمار می‌رود. از طرفی یافتن عوامل زیستی آنتاگونیستی که کمتر تحت تاثیر شرایط محیطی قرار بگیرند یکی از ضروری ترین موضوعات تحقیقی برای تجاری‌سازی و مدیریت بهینه این بیماری است.

References

Ahn, S.J., Shin, R. & Schachtman, D.P. 2004. Expression of KT/KUP genes in Arabidopsis and the role of root hairs in K+ uptake. Plant Physiology, 134: 1135–1145.

Aeini, M., Mirzaee, H., Taghavi, Khodakaramian, G.R. & Amiri Mazhar, M. 2014. Occurrence of crown gall disease on *Ficus benjamina* in Fars and Isfahan provinces of Iran, Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(18): 2257–2262.

Allen, O.N. & Holding, A.J. 1974. Genus II. Agrobacterium Conn 1942, 359.In R.E. Buchanan & N. E. Gibbons (Eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology (8th ed., pp. 264–267). Baltimore: Williams and Wilkins Co.

Baker, K.F. & Cook, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. Freeman and Company Publishers, San Francisco.

Basavand, E., Charkhabi, N.F., Khodaygan, P. & Rahimian, H. 2020. *Agrobacterium pusense*, a new plant tumour–inducing pathogen isolated from Lawson cypress. Forest Pathology, 00, e12655.

Bobeú, I., Comes, I., Drăcea, A. & Lazăr, A. 1972. Fitopatologie. Editura Didactică úi Pedagogică, Bucureúti, p.408.

Burr, T.J., Bazzi, C. & Brissett, M.N. 1991. Crown gall, *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn. Integrated Pest Management.

Bell, C.R., Dickie, G.A. & Chan, J.W.Y.F. 1995. Variable response of bacteria isolated from grapevine xylem to control grape crown gall disease in planta. American Journal of Enology and Viticulture, 46: 499–508.

Biondi, E., Bini, F., Anaclerio, F. & Bazzi, C. 2009. Effect of bioagents and resistance inducers on grapevine crown gall. Phytopathology Mediterranean, 48: 379–384.

Burr, T.J. & Reid, C.L. 1994. Biological control of grape crown gall with non–tumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. American Journal of Enology and Viticulture, 45: 213–219.

Bazzi, C., Alexandrova, M., Stefani, E., Anaclerio, F. & Burr, T.J. 1999. Biological control of *Agrobacterium vitis* using non–tumorigenic agrobacteria. Vitis, 38: 31–35.

Burr, T.J., Bishop, A.L., Katz, B.H., Blanchard, L.M. & Bazzi, C. 1987a. A root–specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* biovar 3. Phytopathology, 77: 1424–1427.

Chen, F., Guo, Y.B., & Wang, H.M. 2007. Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatitis* HX2. Plant Disease, 91: 957–963.

Chen, M., Wang, J., Liu, B., Zhu, Y., Xiao, R., Yang, W., Ge, C. & Chen, Z. 2020. Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT–46737 and its lipopeptides. BMC Microbiology, 20:160 https://doi.org/10.1186/s12866–020–01851–2.

Cao, X.H., Zhao, S.S., Liu, D.Y., Wang, Z., Niu, L.L., Hou, L.H. & Wang, C.L. 2011. ROS–Ca2+ is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin–induced MCF–7 cells apoptosis. Chemico–Biological Interactions, 190: 16–27.

Eastwell, K.C., Sholberg, P.L. & Sayler, R.J. 2006. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. Crop Protection, 25: 1191–1200.

Ebrahimi–Kazemabad, Z., Rouhani, H., Jamali, F. & Mahdikhani–Moghadam, E. 2013. Identification of *phID* Gene with Fluorescent Pseudomonads from Rhizospheric Zone of Chickpea and its Relation with Biological Control of Chickpea Fusarium wilt Disease Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Journal of Plant Protection, 27: 407–416.

Ferrigo, D., Causin, R. & Raiola, A. 2017. Effect of potential biocontrol agents selected among grapevine endophytes and commercial products on crown gall disease. Biocontrol, 62: 821–833

Frikha–Gargouri, O., Ben, Abdallah, D., Bhar, I. & Tounsi, S. 2017. Antibiosis and *bmy*B Gene Presence as Prevalent Traits for the Selection of Efficient Bacillus Biocontrol Agents against Crown Gall Disease. Frontiers in Plant Science, 8: 1363.

Ganjeh, A., Rahimian, H. & Basavand, E. 2020a. *Agrobacterium tumefaciens* causing crown and stem gall disease of citrus propagation nursery in Iran. Journal of Plant Pathology.

Gerik, J.S. & Wang, D. 2008a. Dose response of *Agrobacterium tumefaciens* to soil fumigants. Page 110 in: Proc Annu. Intl. Res. Conf. Methyl Bromide Alternatives Emissions Reductions.

Gerik, S.J. & Wang, D. 2008b. Control of *Agrobacterium tumefaciens* with soil fumigants. USDA/ARS San Joaquin Valley Agricultural Sciences Center, Parlier, CA.

Gheorghie, C., Cristea, S. 2002. Fitopatologie. Vol.I, Editura Ceres, Bucuresti.

Hao, L., Kemmenoe, D.J., Orel, D.C. & Burr, T. 2017. The impacts of tumorigenic and non–tumorigenic *Agrobacterium vitis* strains on graft strength and growth of grapevines. Plant Disease, 102: 375–381.

Habbadi, K., Benkirane, R., Benbouazza, A., Bouaichi, A., Maafa, I., Chapulliot, D. & Achbani, E.H. 2017.Biological control of grapevine crown gall caused by *Allorhizobium vitis* using bacterial antagonists. International Journal of Science Research, 6: 1390–1397.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases. Plant disease, 87: 4–10.

Hervas, A., Landa, B., Datnoff, L.E. & Jimenez–Diaz, R.M. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on Fusarium wilt development in chickpea. Biological Control, 13: 166–176.

Huszcza, E. & Burczyk, B. 2006. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. Zaturforsch [C], 61: 727–733.

Jetiyanon, K., Fowler, W.D. & Kloepper, J.W. 2003. Broad–spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand. Plant Disease, 87: 1390–1394.

Jones, D.A., Ryder, M.H., Clare, B.G., Farrand, S.K. & Kerr, A. 1988. Construction of a Tra− deletion mutant of pAgK84 to safeguard the biological control of crown gall. Molecular and general genetics, 212: 207–214.

Kado, C.I. 2002. Crown g all. The P lant H ealth Instructor, DOI: 10.1094/PHI–I–2002–1118–01.

Kaewnum, S., Zheng, D., Reid, C.L., Kameka L. Johnson, J.C.G. & Burr, T.J. 2013. A host–specific biological control of grape crown gall by *Agrobacterium vitis* strain F2/5: its regulation and population dynamics. Phytopathology, 103: 427–435.

Karimi, E., Safaie, N., Shams–Baksh, M. & Mahmoudi, B. 2016. *Bacillus amyloliquefaciens* SB14 from rhizosphere alleviates Rhizoctonia damping–off disease on sugar beet. Microbiological research, 192: 221–230.

Kawaguchi, A., Inoue, K., Tanina, K. & Nita, M. 2017. Biological control for grapevine crown gall using nonpathogenic *Rhizobium vitis* strain ARK–1. Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences, 93: 547–560.

Kazempour, N., Roustaei, A. & Rezaei, M. 2007. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens*, the causal agent of crown gall disease, from cypress in Kashan. Iranian Journal of Plant Pathology, 43: 398–409.

Kennedy, B.W. & Alcorn, S.M. 1980. Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. Plant Disease, 64: 674–676.

Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. Plant Disease, 64: 25–30

Kim, J.G., Park, B.K., Kim, S.U., Choi, D., Nahm, B.H., Moon, J.S., Reader, J.S., Farrand, S.K. & Hwang, I. 2006. Bases of biocontrol: sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan horse antibiotic that controls crown gall. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, 103: 8846–8851.

Khmel, I.A., Sorokina, T.A., Lemanova, N.B., Lipasova, V.A., Metlitski, O.Z., Burdeinaya, T.V. & Chernin, L.S. 1998. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two Pseudomonas spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. Biocontrol science and technology, 8: 45–57.

Kracht, M., Rokos, H., Ozel, M., Kowall, M., Pauli, G. & Vater, J. 1999. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. Journal of Antibiotic, 52 (7): 613–619.

Krimi, Z., Petit, A., Mougel, C., Dessaux, Y. & Nesme, X. 2002. Seasonal fluctuation sand long–term persistence of pathogenic populations of Agrobacterium spp. in soils. Applied Environmental Microbiology, 68: 3358 –3365

Kuzmanović, N., Puławska, J., Hao, L. & Burr, T.J. 2018. The Ecology of *Agrobacterium vitis* and Management of Crown Gall Disease in Vineyards.

Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., Shams, M., Abrouk, Céline Lavire, D., Oger–Desfeux, C., Hommais, F., Guéguen, L., Daubin, V., Muller, D. & Nesme, X. 2011. Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. Genome Biology and Evolution, 3: 762–781.

Lee, S.W., Lee, S.H., Balaraju, K., Park, K.S., Nam, K.W., Park, J.W. & Park, K. 2014. Growth promotion and induced disease suppression of four vegetable crops by a selected plant growth–promoting rhizobacteria

(PGPR) strain *Bacillus subtilis* 21–1 under two different soil conditions. Acta Physiology of Plant, 36: 1353–1362.

Lemanova, N.B. 1990. Biological preparations for protection of g rapes against bacterial canker. Sadovodstvo i Vinogradarstvo, 11: 30–32.

Lindström, K. & Young, J.P.W. 2011. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Agrobacterium and Rhizobium, Minutes of the meeting, 7 September 2010, Geneva, Switzerland. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 61: 3089–3093.

Mafakheri, H., Taghavi, S.M., Banihashemi, Z., Osdaghi. E. & Lamichhane, J.R. 2017. Pathogenicity, host range and phylogenetic position of Agrobacterium species associated with sugar beet crown gall outbreaks in Southern Iran. European Journal of Plant Pathology, 147(3): 721–730.

Mafakheri, H., Taghavi, S.M., Puławska, J., de Lajudie, P., Lassalle, F. & Osdaghi, E. 2019. Two Novel Genomospecies in the *Agrobacterium tumefaciens* Species Complex Associated with Rose Crown Gall. Phytopathology, 109: 1859–1868.

Mafakheri H, Taghavi, S.M., Zarei, S., Kuzmanovic , N. & Osdaghi, E. 2021. Occurrence of Crown Gall Disease on Japanese Spindle (*Euonymus japonicas* var. *Green Rocket*) Caused by *Agrobacterium rose* in Iran. Plant Disease, 30.

Manafi, R., Babai–Ahri, A. & Arzanlou, M. 2012. Assessment of resistance in tomato varieties under greenhouse conditions against Fusarium wilt, and biological control of the disease. Quarterly Journal of Agricultural Science, 22: 145–158.

Miranda, A., Janssen, G., Hodges, L., Peralta, E.G. & Ream, W. 1992. *Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T–DNAs by a unidirectional mechanism. Journal of Bacteriology, 174: 2288–2297.

Mirzaei, H., Narimani, S., Aeini, M., Taghavi, M., Tarighi, S., Javaheri, M. 2015. Investigation the performance and biological control of the various tomato cultivarsagainst the bacterial wilt disease *Ralstonia solanacearum*. Biocontrol in Plant Protection, 2: 47–57.

Mousavi, S.A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P. & Lindström, K. 2014. Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. Systematic and Applied Microbiology, http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007.

Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P. & Lindström, K. 2015. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of Pararhizobium gen. nov., and 13 new species combinations. Systematic and Applied Microbiology, http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm. 2014.12.003.

Nazari, F., Safaie, N., Soltani, B.M., Shams–Bakhsh, M. & Sharifi, M. 2016. The effect of *Bacillus subtilis* producing Surfactin in ROS production and transformation efficiency of tobacco cells. Archives of Phytopathology and Plant Protection.

Nazari, F., Safaie, N., Soltani, B.M., Shams–Bakhsh, M. & Sharifi, M. 2017a. *Bacillus subtilis* affects miRNAs and Flavanoids production in Agrobacterium–Tobacco interaction, Plant Physiology and Biochemistry, 118: 98–106.

Nazari, F., Safaie, N., Soltani, B.M., Shams–Bakhsh, M. & Sharifi, M. 2017b. The effect of environmental factors on Surfactin production of *Bacillus subtilis*. Journal of Crop Protection, 6(1): 89–97.

Nazari, F., Safaie, N., Soltani, B.M., Shams–Bakhsh, M. & Sharifi, M. 2018. Effect of Surfactin on inducing tobacco resistance against Agrobacterium. Iranian Journal of Plant Protection Science, 49(2): 255–262.

Nazari, F. & Safaie, N. 2020. Using of auxin signaling pathway to investigate the contrast between two different strains of Bacillus against Agrobacterium. Biocontrol in Plant Protection, 8(1): 1–9.

Nazari, F., Safaie, N. & Momeni, H. 2021. Evaluation of fluorescence–activated cell sorting technology in agrobacterium biocontrol. Journal of Crop Protection, 10(2): 391–399.

Nejad, P. & Johnson, P. A. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological Control, 18: 208–215.

Ophel, K. & Kerr, A. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of Agrobacterium biovar 3 from grapevines. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 40: 236 –241.

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

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L. & Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environmental Microbiology, 9: 1084–1090.

Panday, D., Schumann, P. & Das, S.K. 2011. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61: 2632–2639.

Pârvu, M. 2010. Ghid practic de fitopatologie, EdiĠia a III–a, Editura Presa Universitară Clujană, p. 386.

Peypoux, F., Bonmatin, J. M. & Wallach, J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Applied Microbiology and Biotechnology, 51: 553–563.

Pristchepa, L., Voitka, D., Kasperovich, E. & Stepanova, N. 2006. Influence of Trichodermin–blon the decrease of fiber flax infection by diseases and the improvement of its production quality. Plant Protection Research, 46: 97–102.

Pu, X–A. & Goodman, R. N. 1993. Effects of fumigation and biological control on infection of indexed crown gall free grape plants. American Journal of Enology and Viticulture, 44: 241–248.

Puławska, J., Willems, A., De Meyer, S.E. & Süle, S. 2012. *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. Systematic and Applied Microbiology, 35: 215–220.

Rouhrazi, K. & Rahimian, H. 2014. Biochemical and genetic characterisation of *Agrobacterium tumefaciens* the causal agent of walnut crown gall disease in Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47 (20): 2493–2500.

Saito, K., Watanabe, M., Matsui, H., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Toyoda, K., Kawaguchi, A. & Noutoshi, Y. 2018. Characterization of the suppressive effects of the biological control strain VAR03–1 of *Rhizobium vitis* on the virulence of tumorigenic *R. vitis*. Journal of Genetic and Plant Pathology, 84: 58–64.

Severin, V. & Dejeu, L. 1994. Bolile úi dăunătorii viĠei de vie. Editura Ceres Bucuresti, p.124.

Sharma, P., Vignesh–Kumar, P., Saravanan, K., Sharma, M., Saini, M. & Singh, D. 2011. Biocontrol genes from Trichoderma species. African Journal of Biotechnology, 10: 19898–19907.

Sheppared, J., Jumarie, C., Coopre, D. & Laprade, R. 1991. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membrane. Biochimica et biophysica acta, 1064: 13–23.

Siameto, E.N., Okoth, S., Amugune, N.O. & Chege, N.C. 2011. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of Trichoderma harzianum from Embu District, Kenya. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 13: 81–90.

Sindhu, S.S., Rakshiya, Y.S. & Sahu, G. 2009. Rhizosphere bacteria and their role in biological control of plant diseases. Pest Technology, 3: 10–21.

Sobiczewski, P., Karczewski, J. & Berczynski, S. 1991. Biological control of crown gall *Agrobacterium tumefaciens* in Poland. Fruit Science Report, 18: 125–132.

Staphorst, J.L., Van–Zyl, F.G.H., Strijdom, B.W. & Uroenewold, Z.E. 1985. Agrocin–producing pathogenic and nonpathogenic biotype–3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* active against biotype–3 pathogens. Current Microbiology, 12:45–52.

Sun, Y.M., Horng, C.Y., Chang, F.L., Cheng, L.C. & Tian, W.X. 2010. Biosorption of lead, mercury and cadmium ions by *Aspergillus tereuss* immobilized in a natural matrix. Polish Journal of Microbiology, 59: 37–44.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B. & Prigent–Combaret, C. 2013. Plant growth promoting rhizobacteria and root system functioning. Frontiers in Plant Science, 4: 1–19.

Wang, X., Zhao, D., Shen, L., Jing, C. & Zhang, C. 2018. Application and Mechanisms of *Bacillus subtilis* in Biological Control of Plant Disease. Role of Rhizospheric Microbes in Soil. Springer, 225–250.

Warren, J.G., Kasun, G.W., Leonard, T. & Kirkpatrick, B.C. 2016. A phage display–selected peptide inhibitor of *Agrobacterium vitis* polygalacturonase. Molecular Plant Pathology, 17: 480–486.

Webster, J., Dos–Santos, M. & Thomson, J.A. 1986. Agrocin–producing *Agrobacterium tumefaciens* strain active against grapevine isolates. Applied Environmental Microbiology, 52: 217–219.

Yang, Y.L., Li, J.Y., Wang, J.H. &Wang, H.M. 2009. Mutations affecting chemotaxis of *Agrobacterium vitis* strain E26 also alter attachment to grapevine roots and biocontrol of crown gall disease. Plant Pathology, 58: 594–605.

Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez–Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. 2001. A revesion of Rhizobium Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of Agrobacterium Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* De Lajudie *et al*. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 89 –103.

Young, J.M., Kuyknall, D.L., Martinez, E. & Sawada, H. 2003. Classification and nomenclature of Agrobacterium and Rhizobium–a replay to Frrand *et al*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 1689–1695.

Young, J.M., Park, D.C. & Weir, B.S. 2004. Diversity of 16S rDNA sequences of Rhizobium spp. Implications for species determinations. FEMS Microbiology letters, 238: 125–31.

Zäuner, S., Crespan, J.E., Burr, T.J. & Ullrich, C.I. 2006. Inhibition of crown gall induction by *Agrobacterium vitis* strain F2/5 in grapevine and Ricinus. Vitis, 45: 131–139.

Zheng, D. & Burr, T.J. 2016. Inhibition of grape crown gall by *Agrobacterium vitis* F2/5 requires two nonribosomal peptide synthetizes and one polyketide synthase. Molecular and Plant Microbe Interaction, 29: 109–118.

Application of biological control agents in the management of crown gall disease

Fahimeh Nazari

Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Corresponding author: Fahimeh Nazari, email: Fahimehnazari236@gmail.com

Received: Oct., 17, 2021 8(2) 93–105 Accepted: Dec., 21, 2021

Abstract

Crown gall is a very destructive plant disease caused by *Agrobacterium radiobacter*. The most important symptom of this disease is abnormal growth like tumors or galls at or below the soil surface on the crown of plants and sometimes the trunks of seedlings and trees, as well as reduced growth and weakness of infected plants. This disease is one of the most damaging bacterial diseases economically infected at least 40 species of plants, including fruit and non–fruit trees, crops and ornamental plants. Failure of chemicals in the management of this disease indicates special attention focused on the biological control of plant diseases as an alternative to chemical control. This article is a comprehensive summary of new discoveries and advances in our understanding of the application of biological control agents in the control of crown gall disease.

Keywords: *Agrobacterium* sp., crown gall, biocontrol, mode of action