

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГРЕЦКОГО ОРЕХА И *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* : ВЛИЯНИЕ, МЕХАНИЗМ, УПРАВЛЕНИЕ И БУДУЩИЕ РЕШЕНИЯ

¹ Эшбекова Г.Г., ² Исмаилов З.Ф.

¹ Самаркандский государственный университет имени Шарофа Рашидова, Республика Узбекистан, e-mail: guljakhonbio@mail.ru

² Самаркандский государственный университет имени Шарофа Рашидова, Республика Узбекистан, доктор биологических наук, профессор, e-mail: zafarismailov55@gmail.com

В статье представлены аналитические данные по сведениям о взаимодействии между грецким орехом (*Juglans regia* L.) и *Agrobacterium tumefaciens*, опубликованных за последние годы в современных научных источниках, что является возбудителем корончатого галла, в том числе о влиянии на плантации, механизме процесса и о потенциальной будущей управленческой меры. Грецкий орех (*Juglans regia* L.) считается одной из самых ценных и распространенных орехоплодных культур. Помимо своих свойств плодовой культуры, ценится также как лесное и декоративное дерево. По всему миру на плантациях грецкого ореха наблюдались несколько бактериальных и грибковых заболеваний этого растения. В настоящее время все большее распространение получает корончатый галл (возбудитель *Agrobacterium tumefaciens*), который считается одним из таких заболеваний. *Agrobacterium tumefaciens* является патогеном с широким кругом хозяев, который может вызывать опухоли у большинства рода двудольных растений, а также у некоторых однодольных растений. Хотя механические, биологические и химические методы борьбы с этим заболеванием были разработаны и внедрены в практику, но они оказались недостаточно эффективными. Проанализированные данные показывают, что опосредованный РНКи сайленсинг, может решить эти проблемы, а клональное микроразмножение снижает уровень заболеваемости. Таким образом, в будущем разработка технологии вирусо-индуцированное подавление экспрессии генов (virus-induced gene silencing, VIGS), повышение микробного разнообразия и активности в фумигированной почве могут быть использованы в борьбе с корончатым галлом.

Ключевые слова: Грецкий орех, *Agrobacterium tumefaciens*, корончатый галл, pTi, T-ДНК, *Agrobacterium radiobacter* K84, микроразмножение *in vitro*.

WALNUT AND *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* INTERACTION: INFLUENCE, MECHANISM, MANAGEMENT AND FUTURE SOLUTIONS

¹G.G. Eshbekova., ²Z. F. Ismailov.

¹ Samarkand State University named after Sharof Rashidov, Republic of Uzbekistan, e-mail: guljakhonbio@mail.ru

² Samarkand State University named after Sharof Rashidov, Republic of Uzbekistan, Doctor of Biological Sciences, Professor, e-mail: zafarismailov55@gmail.com

The article presents analytical data on the information published in recent years in modern scientific sources on the interaction between Persian walnut (*Juglans regia* L.) and *Agrobacterium tumefaciens*, causing agent of crown gall disease, including influence on orchards, the mechanism of the process and potential future management measures. The Persian walnut (*Juglans regia* L.) is considered one of the most valuable and widespread nut crops. In addition to its properties as a fruit crop, it is also valued as a forestry and ornamental tree. Several bacterial and fungal diseases of this plant have been observed in walnut plantations around the world. Today, crown gall (causing agent *Agrobacterium tumefaciens*), which is considered one of these diseases, is becoming more and more common. *Agrobacterium tumefaciens* is a pathogen with a wide host range that can cause tumors in plants from most dicotyledonous genera as well as certain monocots. Although mechanical, biological and chemical methods of combating this disease have been developed and put into practice, they have not been sufficiently effective. The analyzed data show that, RNAi-mediated silencing can address these problems, as well as, clonal micropropagation also reduce the incidence rate. Therefore, developing virus-induced gene silencing (VIGS) technologies, increasing microbial diversity and activity in fumigated soil can be used in fighting against crown gall in the future.

Keywords: Persian walnut, *Agrobacterium tumefaciens*, crown gall, pTi, T-DNK, *Agrobacterium radiobacter* K84, *in vitro* micropropagation.

Введение

Грецкий орех (*Juglans regia* L.) — один из самых распространенных орехов в мире. В настоящее время грецкий орех выращивают в коммерческих целях в Южной Европе, Северной Африке, Восточной Азии, США и западной части Южной Америки. Мировое производство цельного грецкого ореха в 2021 году составило около $2,31 \times 10^6$ т. Китай является ведущим мировым производителем, а за ним следуют США, Иран, Турция, Украина, Румыния, Франция и Индия, но производство в других странах, таких как Чили и Аргентина, увеличилось стремительно в последние годы [1].

Грецкий орех является видом, имеющим большое значение в Центральной Азии, где орехи собирают с дикорастущих насаждений, приусадебных участков и коммерческих плантаций, которые значительно различаются по размеру и степени управления. Орехи собирают для домашнего потребления, продажи на местных придорожных лотках и рынках, а также для отправки в другие города. Деревья грецкого ореха в дальнейшем используются для производства широкого спектра продуктов из-за их высококачественной древесины. Листья, кора и другие части растений используются в лечебных целях, а деревья выращивают и ухаживают за ними в целях сохранения почвы [2].

Agrobacterium tumefaciens — вездесущая почвенная бактерия, обладающая уникальным молекулярным механизмом, который может опосредовать перенос определенного сегмента бактериальной ДНК в геномы клеток растений, грибов и животных. Хотя важность горизонтального переноса генов агробактерий-грибов и агробактерий-животных неизвестна, патогенез агробактерий-растений хорошо изучен [3]. Несмотря на то, что *A. tumefaciens* имеет самый широкий круг хозяев из всех патогенов растений, с более чем 600 охарактеризованными растениями-хозяевами, болезнь корончатого галла, как правило, представляет собой серьезную сельскохозяйственную проблему только для фруктовых и ореховых деревьев, винограда и некоторых декоративных растений [4]. У этих культур корончатый галл может вызвать большие экономические потери из-за выбраковки большого саженца, снижения продуктивности растений пораженных галлом и повышенной восприимчивости к условно-патогенным микроорганизмам [5].

Цель исследования

Основное внимание в борьбе с корончатым галлом обычно уделяется уничтожению *A. tumefaciens* посредством фумигации почвы, фитосанитарии и/или биоконтроля (особенно *Agrobacterium radiobacter* K84) [6]. Несмотря на то, что в ряде случаев эти меры были успешными в борьбе с болезнью корончатого галла, они не обеспечили последовательной и эффективной борьбы с болезнями многих сельскохозяйственных культур, включая

грецкий орех. Очень важно изучить и проанализировать механизм этого процесса и имеющиеся на сегодняшний день методы, чтобы разработать новые методы борьбы с этим заболеванием грецкого ореха. В данной статье анализируются механизм корончатого галла грецкого ореха, влияние болезни на плантации грецкого ореха, методы, имеющиеся на сегодняшний день и которые могут быть использованы в будущем для борьбы с этим заболеванием.

Влияние на плантации грецкого ореха

Основным признаком корончатого галла грецкого ореха является образование опухолей на короне подвоя грецкого ореха. Корончатый галл был назван одним из основных заболеваний, поражающих питомники и плантации во всех регионах, где выращивают грецкий орех [7]. При наблюдении было выяснено, что корончатый галл снижает урожайность на 12-25% в первые четыре года в молодых плантациях грецкого ореха [8]. Если их не лечить, галлы могут убить даже очень большие деревья. Кроме того, галлы являются местом проникновения грибов, и других патогенов, вызывающих гниение древесины, которые могут нанести дополнительный ущерб дереву. Галлы также служат средой обитания для ряда различных насекомых, которые могут вызывать вторичные повреждения или даже действовать как переносчики других патогенов. После попадания в почву *A. tumefaciens* может выживать в течение многих лет даже при отсутствии растения-хозяина [9]. Интересно, что было показано, что *A. tumefaciens* систематически перемещается по деревьям грецкого ореха, что также усложняет процесс обеспечения чистоты поголовья. Например, системно инфицированные деревья могут проявлять симптомы только через несколько месяцев, во время полевой прививки или после повреждения при посадке. Эта возможность делает крайне важным уделять большое внимание уменьшению или устранению ранней инфекции *A. tumefaciens*, чтобы избежать разрушительных вспышек корончатого галла на молодых деревьях спустя месяцы или годы [10].

Корончатый галл на плантациях грецкого ореха в Узбекистане

Средняя Азия, включая Узбекистан, является одним из центров происхождения грецкого ореха. Несмотря на это, в Узбекистане практически не проводились научно-исследовательские работы в области технологии выращивания грецкого ореха, борьбы с болезнями и вредителями, семеноводства. В 2017-2022 годах были заложены плантации на площади 14 000 га на основе всемирно известных сортов грецкого ореха, в том числе сорта Чандлер, а в качестве подвоя в 80% саженцах использован Парадокс. Однако эти сорта не смогли полностью адаптироваться к климату Узбекистана, то есть процент поражения ранними осенними заморозками и различными болезнями, в том числе корончатым галлом,

показал высокий показатель. Согласно исследованиям, проведенным на плантациях Джамбайского, Булунгурского, Пайарикского районов Самаркандской области и Галлааральского района Джизакской области, в 2020 году процент заражения корончатым галлом в плантациях, состоящих из 3-4-летних сеянцев, составил в среднем 30-40%, а в 2022 году этот показатель достиг 60% -70%. Учитывая, что корончатый галл у молодых деревьев вызывает резкое снижение урожайности [8] и другие вторичные заболевания [9], это означает необходимость применения в этих насаждениях мер против *Agrobacterium tumefaciens*.

Механизм вирулентности корончатого галла.

Опухолеиндуцирующая плаزمида (*pTi*) необходима для вирулентности *A. tumefaciens*. Потеря *pTi* приводит к потере патогенности. Плазмиды *Ti* содержат гены, участвующие в репликации, конъюгации и катаболизме опинов [11,12]. Кроме того, плазмиды *Ti* содержат область вирулентности (*vir*), которая содержит гены, кодирующие систему секреции типа IV, другие эффекторные белки вирулентности и область транспортной ДНК или Т-ДНК. Т-ДНК содержит две группы генов: онкогены и гены биосинтеза опиона, которые экспрессируются, когда Т-ДНК встраивается в геном хозяина. Экспрессия этих генов приводит к развитию галлов или опухолей, т.е. фенотипу корончатых галлов [13,14]. Плазмиды *Ti* делятся на группы в зависимости от типов продуцируемых ими опинов, таких как октопин, нопалин, агропин, маннопин и т. д. Эти опионы являются продуктами конъюгации аминокислот с кетокислотами или сахарами и, как полагают, служат источником углерода и азота для *A. tumefaciens* [15].

Процесс патогенеза *A. tumefaciens* широко изучен в некоторых странах [16,17,18]. Подвижность, хемотаксис и прикрепление являются важными прединфекционными процессами вирулентных штаммов *A. tumefaciens* [19]. Ризосфера богата сахарами, аминокислотами и другими соединениями, которые служат сигнальными молекулами для *A. tumefaciens* в этом прединфекционном процессе. Кроме того, экссудаты из ран растений содержат сигнальную молекулу, ацетосирингон (АС), которая может восприниматься двухкомпонентной регуляторной системой *VirA/VirG* штаммов *A. tumefaciens*. *VirA* представляет собой трансмембранную гистидинкиназу и имеет С-концевой цитоплазматический домен, который аутофосфорилируется АС. Затем фосфорилированный *VirA* активирует белок *VirG* в цитоплазме. Белок *VirG*, который является регулятором ответа, модулирует нисходящую передачу сигнала и экспрессию генов. Двухкомпонентная регуляторная система *VirA/VirG* выполняет многофункциональную роль. Когда концентрация ацетосирингона низкая, он опосредует хемотаксис, тогда как при высоких концентрациях он инициирует экспрессию оперона *vir*.

Оперон *vir* содержит гены, кодирующие систему секрети IV типа, ответственную за перенос Т-ДНК в растительные клетки, где она стабильно встраивается в геном растения [15]. Как только Т-ДНК встраивается в геном растения, онкогены и гены биосинтеза опина в Т-ДНК экспрессируются системой транскрипции и трансляции растения [20]. Гормоны растений, кодируемые онкогенами, вызывают неконтролируемую пролиферацию растительных клеток, что приводит к образованию опухолей. В то же время продукты опина гены биосинтеза продуцируют опины, которые служат источниками углерода и азота для штаммов *A. tumefaciens*, несущих гены специфичного катаболизма опинов на той же плазмиде *Ti* [15,20,21]. Опины также служат индукторами, способствующими конъюгации плазмид *Ti* среди агробактерий, что приводит к появлению дополнительных штаммов *A. tumefaciens*, которые способны воспользоваться имеющимися опинами. При сравнении различных генов опинового типа плазмиды *Ti* и индуцирующие корень (*Ri*) имеют общие гомологичные участки ДНК, которые опосредуют вирулентность. Гомологические области содержат необходимые гены для патогенеза, например, *virD1*, *virD2*, *virB* гены T4SS, *virE2*; *virC*; и *virC2*, все они необходимы для трансформации. Напротив, несущественные факторы, такие как *virD3*, *virD5*, *virE3*, *virF*, *virH*, *virJ*, *virK*, *virL* и *virM*, различаются у разных штаммов [22, 23]. Эти незаменимые и заменимые гены были дополнительно определены на основе исследования мутантов *A. tumefaciens*, введенных в восприимчивым раненым хозяевам. Кроме того, известно, что хромосомы и *pAt* несут несущественные гены, участвующие в патогенезе

A. tumefaciens, такие как *chvE*, *chvH* и *chvI*. Предполагается также, что некоторые из этих генов опосредуют адаптацию хозяина. Также разумно предположить, что эти несущественные генетические элементы могут способствовать видимой изменчивости вирулентности штаммов *A. tumefaciens* в природе.

Образование корончатого галла включает взаимодействие между генами как вирулентных штаммов *A. tumefaciens*, так и восприимчивых растений-хозяев [22]. Хотя *pTi* несет ключевые гены, которые опосредуют корончатый галл, в хромосомах обнаруживаются и другие гены вирулентности, такие как гены *chv* [24]. Штаммы *A. tumefaciens* с мутациями *ChvA* и *ChvB* непатогенны, поскольку не способны прикрепляться к растительным клеткам. Описан мутант *ChvD*, аттенуированный по экспрессии гена *virG* и аттенуированный по вирулентности. Мутация *ChvH* привела к снижению вирулентности из-за снижения экспрессии многих генов *vir*, включая *VirB9*, *VirB10*, *VirB11*, *VirG* и *VirE*. *ChvG/I* – двухкомпонентная регуляторная система, индуцированная низким pH, который активизирует экспрессию регулятора транскрипции *Vir*. Белок *ChvE* играет роль в передаче сигналов *VirA/G* и связывается с переносчиками сахара,

а также с белками хемотаксиса. Однако только несколько модельных штаммов (например, С58 и А6) использовались для характеристики этих механизмов патогенеза. Это дает ограниченное представление о генетическом разнообразии вирулентных штаммов *A. tumefaciens*. Важно получить всесторонние знания о лежащей в основе генетической основы вирулентности путем проведения сравнительного геномного анализа ряда генетически разнообразных штаммов *A. tumefaciens* [25].

Система секреции типа VI (Т6SS).

Грамотрицательные бактерии развили различные замечательные и сложные системы секреции для выделения белков или молекул ДНК в окружающую среду. К хорошо изученным системам секреции относятся I-VI типы. Многие фитопатогенные грамотрицательные бактерии обладают системой секреции типа III (Т3SS), которая секретирует эффекторы в цитоплазму клетки-хозяина. Многие виды родов *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* и *Xanthomonas* содержат хорошо охарактеризованные Т3SS [26]. Т3SS служит важным механизмом вирулентности для многих бактериальных патогенов, заражающих растения-хозяева [27]. Вирулентные штаммы *A. tumefaciens* обладают Т4SS, который экспортирует молекулы Т-ДНК и белковые эффекторы в растение-хозяин, что приводит к образованию опухоли [28,29]. Недавно охарактеризованный Т6SS также присутствует в штаммах *A. tumefaciens* [30]. Однако мало что известно о распространении и генетическом разнообразии Т6SS штаммов у *A. tumefaciens*, в основном тех, которые поражают производство грецкого ореха в Калифорнии. Т6SS впервые был охарактеризован как секреторный аппарат *Pseudomonas aeruginosa*, где он, как известно, экспортирует белок ко-регуляции гемолизина (Hcp1). Позднее эта система секреции была обнаружена более чем в 25% геномах грамотрицательных бактерий [31]. Эта широко консервативная многокомпонентная наномашина структурно связана с сократительными фаговыми хвостами [32,33]. Это одна из многих специализированных систем секреции, которые бактерии используют для транспортировки белков и других факторов в окружающую среду и к другим микробам. Т6SS может функционировать либо контактно-зависимым [34,35], либо контактно-независимым образом, чтобы конкурировать с другими микробами [28,36]. В модельном штамме *A. tumefaciens* С58 область, кодирующая Т6SS, состоит из двух поразному транскрибируемых оперонов. Одним из них является *imp* оперон, состоящий из 14 генов (от *atu4343* до *atu4330*) [37], одиннадцать из которых считаются ключевыми для Т6SS у протеобактерий. Другой — оперон *hcp*, кодирующий 9 генов (от *atu4344* до *atu4352*), четыре из которых являются ядерными для Т6SS у протеобактерий [22]. Одно исследование, оценивающее Т6SS одиннадцати штаммов *A. tumefaciens*, показало, что локусы *imp* консервативны, тогда как гены в опероне *hcp* более вариабельны, включая *vgrG*

[38]. 11 штаммов представляют 4 геномных вида *A. tumefaciens* и 6 различных типов оперонов *hcr*. Кроме того, в некоторых штаммах *Agrobacterium* также присутствуют локус 2 *vgrG2*, локус 3 *vgrG* и локус 4 *vgrG*. Поскольку T6SS важен для бактерий, чтобы конкурировать за экологические ниши, разнообразие T6SS в одиннадцати штаммах, выделенных из различных источников, позволяет предположить, что T6SS может способствовать адаптации штаммов-хозяев к данной среде [38].

Методы борьбы с корончатым галлом на плантациях грецкого ореха

Борьба с корончатым галлом долгое время была проблемой во всем мире из-за широкого круга хозяев и уникального механизма патогенеза. Чтобы справиться с болезнью корончатого галла, производители полагаются на фумигацию почвы, выбраковку зараженных деревьев или на хирургическое удаление опухолевой ткани. Эти методы имеют ограниченную эффективность, являются дорогостоящими и трудоемкими. Штамм биоконтроля *A. radiobacter* K84 [39] показал себя многообещающим в борьбе с корончатым галлом, когда о нем впервые сообщили в 1972 г. *New & Kerr* [40], и он использовался для лечения корончатого галла во многих странах. Штамм K84 продуцирует бактериоцин под названием агроцин84, который ингибирует синтез ДНК или РНК чувствительных вирулентных штаммов *A. tumefaciens*. Агроцин84 кодируется генами, расположенными на плазмиде pAgK84. Однако pAgK84 может быть приобретен вирулентными штаммами, в результате чего эти штаммы становятся устойчивыми к штамму биоконтроля K84. Чтобы решить эту проблему, был сконструирован мутант pAgK84 по Trade-делеции, и было показано, что он значительно снижает передачу pAGK84 вирулентным штаммам, при этом снижая образование галлов у восприимчивых хозяев. Горизонтальный перенос гена pAgK84 является одним из механизмов, благодаря которому вирулентные штаммы *A. tumefaciens* становятся устойчивыми к штамму биоконтроля K84. Характеристика генов катаболизма опинов, расположенных в опероне *acc*, свидетельствует о том, что мутации в гене *accF* также приводят к устойчивости к штамму K84. Оперон *acc* состоит из 8 генов, названных *accR*, и от *accA* до *accG*, экспрессия которых индуцируется агроцинопинами [39]. Теоретически штаммы, несущие ген агроцинопинсинтазы, чувствительны к K84 из-за мимикрии агроцинопина с помощью агроцин84, что делает возможным его поглощение вирулентными штаммами. Таким образом, вирулентные штаммы станут чувствительными к штамму K84 [41]. Однако исследования эффективности штамма K84 в регионе выращивания грецкого ореха в Калифорнии показали, что штаммы, устойчивые к K84, широко распространены. Однако механизм резистентности этих штаммов не ясен [42]. На сегодняшний день на рынке не существует широко эффективных бактерицидов для послепосевной борьбы с корончатым галлом грецкого ореха.

Предпосевные обработки против корончатого галла также широко используются во всем мире [4]. Несмотря на широкое использование бромистого метила в качестве предпосевного фунгицида, все еще встречается корончатый галл. Несколько исследований пришли к выводу, что бромистый метил неэффективен для сокращения вирулентных популяций *A. tumefaciens* в почве; однако в этих исследованиях популяции вирулентных *A. tumefaciens* оценивали косвенно, либо путем наблюдения за развитием болезни, либо с использованием сред с ограниченной способностью селективно культивировать *A. tumefaciens* с использованием отмеченного штамма *A. tumefaciens*, устойчивого к антибиотикам, наряду с полимеразной цепной реакцией (ПЦР), основанная на тесте для проверки вирулентности. В недавнем исследовании непосредственно измерялись популяции *A. tumefaciens* до и после фумигации бромистым метилом [37]. Это исследование пришло к выводу, что многие предпосевные фунгициды эффективны для сокращения популяций *A. tumefaciens*, передающихся через почву, и предположило, что *A. tumefaciens* повторно заносится в почву через зараженный посадочный материал, таких как саженцы или семена [43]. Таким образом, борьба с корончатым галлом остается серьезной проблемой в ореховых садах во всем мире.

Будущие стратегии борьбы с корончатым галлом у грецкого ореха

На основе последних исследований, проведенных во всем мире, предложено несколько новых методов борьбы с корончатым галлом. Например, развитие генетической устойчивости с помощью новых подходов, таких как РНК-интерференция (РНК-интерференция) или вирус-индуцированное подавление экспрессии генов (virus-induced gene silencing, VIGS), может решить эти проблемы. Опосредованное подавление корончатого галла у грецкого ореха (*Juglans regia L.*) РНК-интерференцией было достигнуто ранее [44]. Кроме того, предполагается, что увеличение микробного разнообразия и активности в фумигированной почве обеспечит большую конкуренцию *A. tumefaciens*, тем самым снизив ее численность и ограничив заболеваемость [45].

Некоторые эксперименты показали, что микроклональное размножение является потенциальной технологией борьбы с заболеваемостью корончатым галлом. Клоновые подвои, размножаемые методом микроразмножения, показали значительно более низкие рейтинги корончатого галла, чем подвои сеянцев через 7 и 12 лет после посадки [46,47]. Родиной грецкого ореха считается Средняя Азия, в том числе и Узбекистан, и существует множество местных сортов и форм, которые демонстрируют сильные характеристики роста и продуктивности. Однако отмечено, что в садах, созданных на основе этих сортов, корончатый галл практически не встречается. По этой причине отбор сортов, устойчивых к *A. tumefaciens*, среди местных сортов с сильными характеристиками роста, а также их

микрклональное размножение и использование на плантациях в качестве прививок также может помочь уменьшить распространение этого заболевания.

Заключение

Грецкий орех (*Juglans regia* L.) выращивается во многих странах как ценное орехоплодное дерево, и его значение на мировом рынке с каждым годом возрастает. Однако сегодня плантации грецкого ореха сильно повреждены несколькими болезнями, такими как корончатый галл. Хотя для борьбы с корончатым галлом было разработано несколько биологических, химических и механических методов, они оказались недостаточно эффективными. По этой причине разработка методов борьбы с этим заболеванием и его возбудителем не потеряла своей актуальности. В будущем развитие генетической устойчивости с помощью новых подходов, таких как РНК-интерференция (РНКи), технологии вирус-индуцированное подавление экспрессии генов (virus-induced gene silencing, VIGS), увеличение микробного разнообразия и активности в фумигированной почве, а также микроразмножение будут лучшими стратегиями против корончатого галла на грецком орехе.

Литература

1. Vahdati K., Sadeghi-Majd R., Sestras A.F., Licea-Moreno R.J., Peixe A., Sestras R.E. Clonal Propagation of Walnuts (*Juglans* spp.): A Review on EVolution from Traditional Techniques to Application of Biotechnology // *Plants*. 2022. Vol. 11. Is. 3040. P. 1-25.
<https://doi.org/10.3390/plants11223040>
2. Akca Y., Yuldaşulu Y.B., Murad E., Vahdati K. Exploring of Walnut Genetic Resources in Kazakhstan and Evaluation of Promising Selections // *International Journal of Horticultural Science and Technology*. 2020. Vol. 7. Is. 2. P. 93-102.
<https://doi.org/10.22059/ijhst.2020.299930.352>
3. Colleen, A. M., Andrew, N. B. *Agrobacterium tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2016. Vol.22. P. 101–127. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.011105.102022>
4. Borges R.C.F., Rossato M., Albuquerque G.M.R. Crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens* species complex: a novel nursery disease of *Tectona grandis* in Brazil. // *J Plant Pathol.* 2019. Vol. 101. Is. 445. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-00211-4>
5. Păcurar D. I., Thordal-Christensen H., Păcurar M. L., Pamfil D., Botez C., Bellini C. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2011. Vol. 76. Is.2. P. 76–81.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.06.004>

6. Aditi Sh., Gupta A.K. New insights in the biological control of crown gall through native *Agrobacterium radiobacter* strain UHFBA-218. // Plant Disease research. 2017. Vol. 32. Is. 2. P. 137–152.
7. Yakabe L. E., Parker S. R., Kluepfel D. A. Role of systemic *Agrobacterium tumefaciens* Populations in Crown Gall Incidence on the Walnut Hybrid Rootstock 'Paradox' // Plant Dis. 2012. Vol. 96. Is.10. P.1415-1421. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-11-0364-re>
8. Epstein, L., Kaur S., McKenna J.R., Grant J.A., Olson W.H., Reil W.O. Crown Gall can spread between walnut trees in nurseries and reduce future yields. California Agriculture // 2018. Vol. 62. Is.3. P.111-115. <http://dx.doi.org/10.3733/ca.v062n03p111>
9. Ferdous M. L., Hossain M. N., Ali M. O., Islam M. S., Yasmin S. Morphological, biochemical and molecular identification of the wild strain of *Agrobacterium tumefaciens* from crown gall infected mango tree // Fundamental and Applied Agriculture. 2021. Vol. 6. Is.1. P. 43–49. <https://doi.org/10.5455/faa.136134>
10. Yakabe L. E., Parker S. R., and Kluepfel D. A. Cationic Surfactants: Potential Surface Disinfectants to Manage *Agrobacterium tumefaciens* Biovar 1 Contamination of Grafting Tools // Plant Dis. 2012. Vol.96. Is.3. P. 409-415. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-10-0839>
11. Krenek P., Samajova O., Luptovčiak I., Doskočilová A., Komis G., Samaj J. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications // Biotechnology Advances. 2015. Vol. 1. Is.3. P. 1024-1042. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>
12. Barton I.S., Fuqua C., Platt T.G. Ecological and evolutionary dynamics of a model facultative pathogen: *Agrobacterium* and crown gall disease of plants // Environ. Microbiol. 2018. Vol. 20. Is. 1. P. 16–29. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13976>
13. Bourras S., Rouxel T., Meyer M. *Agrobacterium tumefaciens* Gene Transfer: How a Plant Pathogen Hacks the Nuclei of Plant and Nonplant Organisms // Phytopathology. 2015. Vol. 105. Is.10. P.1288-1301. <https://doi.org/10.1094/phyto-12-14-0380-rvw>
14. Schrammeijer B., Idier K.B., Leo S. M., Thompson D.V., Hooykaas P.J. Sequence analysis of the vir-region from *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955 // Journal of Experimental Botany. 2016. Vol.51. Is.347. P. 1167–1169. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.347.1167>

15. Vladimirov I. A., Matveeva T. V., Lutova L. A. Opine biosynthesis and catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* // *Genetika*. 2015. Vol. **51**. Is.2. P. 121–129.
<https://doi.org/10.1134/S1022795415020167>
16. Hwang H., Yu M., Lai E.M. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. PMCID: PMC6501860. 2017. doi: [10.1199/tab.0186](https://doi.org/10.1199/tab.0186)
17. Gelvin S. B. Traversing the Cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the Host Genome // *Front. Plant Sci*. 2012. Vol. 3. Is.52. P. 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00052>
18. Nonaka S., Ezura H. Plant-*Agrobacterium* interaction mediated by ethylene and super-*Agrobacterium* conferring efficient gene transfer // *Front. Plant Sci*. 2014. Vol. 5. Is.681.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00681>
19. Merritt P. M., Danhorn T., Fuqua C. Motility and Chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* Surface Attachment and Biofilm Formation // *Journal of Bacteriology*. 2007. Vol. 189. Is.22. P. 8005–8014. <https://doi.org/10.1128/jb.00566-07>
20. Tzfira T., Citovsky V. *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology.*: Springer Science & Business Media, 2007. P.737.
21. Tzfira T., Citovsky V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology // *Current Opinion in Biotechnology*. 2016. Vol. 17. Is. 2. P. 147–154.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.01.009>
22. Lacroix B., Citovsky V. Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species // *Annual Review of Phytopathology*. 2019. Vol. 57. P. 231–251.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100101>
23. Lacroix B, Citovsky V. Nopaline-type Ti plasmid of *Agrobacterium* encodes a VirF-like functional F-box protein // *Sci. Rep*. 2015. Vol. 5. <https://doi.org/10.1038/srep16610>
24. Kado C. I. Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens* // *Front Microbiol*. 2014. Vol. 5. Is.340.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00340>
25. Gohlke J., Deeken R. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development // *Front. Plant Sci*. 2014. Vol. 5. Is.155. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00155>
26. Beekman D.S., Vanrompay C.G. Bacterial Secretion Systems with an Emphasis on the Chlamydial Type III Secretion System. *Current Issues in Molecular Biology*. 2016. Vol.12. Is.1. P. 17-42. <https://doi.org/10.21775/cimb.012.017>
27. Sheikh Beig Goharrizi M. A., Dejahang A., Tohidfar M., Izadi Darbandi A., Carillo N., Hajirezaei M. R., Vahdati K. *Agrobacterium* Mediated Transformation of Somatic

Embryos of Persian Walnut Using fld Gene for Osmotic Stress Tolerance // Journal of Agricultural Science and Technology. 2016. Vol. 18. Is. 2. P. 423-435.

<http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807073.2016.18.2.8.8>

28. Sgro G. G., Oka G. U., Souza D. P., Cenens W., Bayer-Santos E., Matsuyama B. Y., Farah C. Bacteria-Killing Type IV Secretion Systems // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10. Is.1078.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01078>

29. Christie P.J., Whitaker N., González-Rivera C. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1843. Is.8. P. 1578–1591.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.019>

30. Lin J.S., Ma L.S., Lai E.M. Systematic Dissection of the Agrobacterium Type VI Secretion System Reveals Machinery and Secreted Components for Subcomplex Formation // PLoS one. 2013. Vol. 8. Is. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067647>

31. Mougous J. D., Marianne E. C., Raunser S., Shen A., Zhou M., Gifford C.A., Goodman A.L., Joachimiak G., Ordoñez C.L., Lory S., Walz T., Joachimiak A., Mekalanos, J.J. A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus // Science. 2016. Vol. 312. P. 1526–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1128393>

32. Leiman P. G., Basler M., Ramagopal U. A., Bonanno J. B., Sauder J. M., Pukatzki S., Mekalanos J. J. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin // PNAS. 2009. Vol. 106. Is.11. P. 4154–4159.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0813360106>

33. Basler M., Pilhofer M., Henderson G. P., Jensen G. J., Mekalanos J. J. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure // Nature. 2012. Vol. 483. P. 182–186.

<https://doi.org/10.1038/nature10846>

34. Cianfanelli F. R., Monlezun L., Coulthurst S. J. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon // Trends in Microbiology. 2016. Vol. 24. Is.1. P. 51–62.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005>

35. Förster A., Planamente S., Manoli E., Lossi N. S., Freemont P. S., Filloux A. Coevolution of the ATPase ClpV, the Sheath Proteins TssB and TssC, and the Accessory Protein TagJ/HsiE1 Distinguishes Type VI Secretion Classes // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289. Is.47. 33032– 33043.

<https://doi.org/10.1074/jbc.m114.600510>

36. Si M., Wang Y., Zhang B., Zhao C., Kang Y., Bai H., Shen X. The Type VI Secretion System Engages a Redox-Regulated Dual-Functional Heme Transporter for Zinc Acquisition // Cell Reports. 2017. Vol. 20. Is.4. P. 949–959. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.081>

37. Wu H.Y., Chung P.C., Shih H.W., Wen S.R., Lai E.M. Secretome analysis uncovers an Hcpfamily protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Bacteriol.* 2008. Vol. 190. Is.8. P. 2841–2850. <https://doi.org/10.1128/jb.01775-07>
38. Wu Ch.F., Santos M.N. Plant-Pathogenic *Agrobacterium tumefaciens* Strains Have Diverse Type VI Effector-Immunity Pairs and Vary in In-Planta Competitiveness // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2019. Vol. 32. Is. 8. P. 961–971. <https://doi.org/10.1094/mpmi-01-19-0021-r>
39. Kim H. S., Yi H., Myung J., Piper K. R., Farrand S. K. Opine-Based *Agrobacterium* Competitiveness: Dual Expression Control of the Agrocinnopine Catabolism (*acc*) Operon by Agrocinnopines and Phosphate Levels // *J. Bacteriol.* 2008. Vol.190. Is.10. P. 3700–3711. <https://doi.org/10.1128/jb.00067-08>
40. Kerr A. Biological Control of Crown Gall: Seed Inoculation // *Journal of Applied Bacteriology.* 1972. Vol. 35. Is.3. P. 493–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1972.tb03727.x>
41. Gonzalez-Mula A., Lachat J., Mathias L., Naquin D., Lamouche F., Faure D. The biotroph *Agrobacterium tumefaciens* thrives in tumors by exploiting a wide spectrum of plant host metabolites.// *New Phytologist.* 2019. Is.222. P. 455–467. doi: 10.1111/nph.15598
42. Hwang H.H., Gelvin S.B., Lai E.M. Editorial: “*Agrobacterium* biology and its application to transgenic plant production.”// *Front. Plant Sci.* 2015. Vol.6. Is.265. doi: 10.3389/fpls.2015.00265
43. Yakabe L. E., Parker S. R., Kluepfel D. A. Effect of pre-plant soil fumigants on *Agrobacterium tumefaciens*, pythiaceous species, and subsequent soil recolonization by *A. tumefaciens* // *Crop Protection.* 2010. Vol. 29. Is.6. P. 583-590. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.01.001>
44. Walawage S. L., Britton M. T., Leslie C. A., Uratsu S. L., Li Y., Dandekar A. M. Stacking resistance to crown gall and nematodes in walnut rootstocks // *BMC Genomics.* 2013. Vol.14. Is. 668. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-668>
45. Strauss S.L., Stover J.K., Kluepfel D.A. Impact of biological amendments on *Agrobacterium tumefaciens* survival in soil // *Applied Soil Ecology.* 2015. Vol. 87. P. 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.10.016>
46. Hasey J.K. Kluepfel D.A. Anderson K.K. Crown gall incidence and severity: seedling walnut rootstock versus clonally propagated rootstock // *Acta Horticulturae.* 2014. Vol. 1050. P. 305–308. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1050.41>
47. Eshbekova G., Haydarov I., Bozorov E. In vitro micropropagation of local genotypes of walnut in Uzbekistan.// *Scientific Journal of SamSU.* 2022. Vol.1. P.63-68

