

Original Article



Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* Fungus and Increase of *Satureja rechingeri* Resistance Using *Bacillus subtilis* Bacterial Volatile Compounds

Received: 2023.11.04

Accepted: 2025.09.28

Fateme Mirzajani,^{1,2*}  Atousa Aliahmadi,³ Atefeh Hajipour,⁴
Alireza Ghasempour⁴

¹ Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

² Protein Research Center, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³ Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

⁴ Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Plant diseases are responsible for at least 10% of global crop losses, costing the agricultural sector Billions of dollars in economic losses each year. This issue is all the more important when we consider that the world's population is rapidly increasing and the need to provide sufficient, safe and sustainable food is felt more than ever. Plant pathogens, including fungi, bacteria and viruses, can severely reduce the quality and quantity of crops and pose a serious threat to food security. On the other hand, given climate change and increasing temperatures and humidity in many regions, the conditions for the spread and severity of these diseases have become more favorable. In response to these challenges, farmers have relied mainly on the use of pesticides and chemical compounds in recent decades, which, although effective in the short term, have been severely questioned due to the development of resistance in pathogens, the persistence of chemical residues in the environment and the threat to human and other living organisms. Therefore, attention to new and environmentally friendly methods for disease control has become an inevitable necessity. One important and promising solution is the use of biological control agents such as beneficial microorganisms, antagonistic fungi, and beneficial bacteria, which can help reduce and eliminate pathogens through competition, production of antimicrobial substances, and stimulation of the plant defense system.

Material and methods: In order to investigate the effect of volatile compounds and *Bacillus subtilis* on the *Sclerotinia sclerotiorum* fungus, cross-peer test was used. In the present study, *Bacillus subtilis* beneficial bacteria volatile compounds were identified using mass spectrometric-mass spectrometry analysis.

Results and discussion: The compounds of Decane, Undecane, Tridecane and their derivatives, Octadecane, Eicosane and Hexadecane are the most important compounds produced by this bacterium. After detecting bacterial Volatile compounds *B. subtilis*. To investigate the inhibitory nature of the volatile compounds from Mycelium growth of *Sclerotinia sclerotiorum*, cross cross-peer tests were used. This pathogen is one of the most common pathogenic agents in the greenhouse and field plants, which has remained in soil for a long time and causes contamination. The fungus *S. sclerotiorum* was exposed to *B. subtilis* bacterial volatile compounds. Studies show that *B. subtilis* antagonist is able to prevent 95.93% of the growth of fungi and has the ability to control biological activity.

Conclusion: This bacterium can be used as a non-chemical and effective method against *sclerotia* caries in different hosts in a long-term future and can be used widely in commercial scale. Also, due to the fact that bacterial volatile compounds are also responsible for inducing resistance and change of essential oils in plants, the simultaneous effect of volatile compounds *B. antagonist B. subtilis* on essential oil changes of *Satureja rechingeri* was investigated. The plant exhibits antimicrobial, anti-cancer, anti-inflammatory and anticoagulant properties of the blood through its essential components. During the interaction, the bacterial and plant volatile compounds are increased in the compounds effective in plant resistance, including β -Pinene, α -Pinene, β -Myrcene, α -Terpinene, p-Cymene, γ -terpinene, Carvacrol methyl ether, Trans-Caryophyllene, α - Thujone, Thymol, and Carvacrol have significantly changed their control status.

Keywords: Biological control, *Bacillus subtilis*, Spectrometry-gaseous chromatography, *Sclerotinia sclerotiorum*.

How to cite this article:
Mirzajani, F., Aliahmadi, A., Hajipour, A and Ghasempour, A. 2026. Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* Fungus and Increase of *Satureja rechingeri* Resistance Using *Bacillus subtilis* Bacterial Volatile Compounds. Adv. Environ. Sci. 24 (1): 149-162.

* Corresponding Author Email Address: f_mirzajani@sbu.ac.ir

DOI: 10.48308/envs.2025.222409.1072



Copyright: © 2026 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

مقدمه

ویژگی در ریزوباکتری‌ها باعث شده ریزوباکتری‌ها در قالب محصولات تجاری بهبوددهنده رشد گیاه وارد بازار مصرف شوند (Hage-Ahmed *et al.*, 2019; Kabdwal *et al.*, 2019). تعداد زیادی از سویه‌های *Bacillus* باعث کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی و افزایش رشد گیاه می‌شوند که تعدادی از آن‌ها تجاری‌سازی شده‌اند (Šević *et al.*, 2019). معمولاً افزایش سلامت گیاه به سه مکانیسم آنتاگونیسم علیه آفات و بیماری‌ها، تحریک رشد، تغذیه گیاه و القاء مقاومت میزبان انجام می‌گیرد. *Bacillus subtilis* علاوه بر اهمیت به عنوان مدل ژنتیکی، اهمیت ویژه‌ای در صنعت و کشاورزی دارد (Šević *et al.*, 2019; Tunsagool *et al.*, 2019). از این گونه، آنزیم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و سورفکتانت‌های متعددی استخراج می‌شود (Tunsagool *et al.*, 2019). در کنار فعالیت کنترل زیستی، برخی جدایه‌های *Bacillus* قادرند با تولید هورمون‌های گیاهی و حلالیت فسفات باعث افزایش رشد گیاه شوند. جنس *Bacillus* تنوع ژنتیکی بالایی را نشان می‌دهد و در محیط‌های مختلف از خاک‌های زراعی گرفته تا آب دریا یافت می‌شوند (Gotor-Vila, Usall, Torres, Solsona, & Teixido, 2019). حتی در شرایط بسیار نامساعد مانند چشمه‌های آب گرم هم می‌توان اعضای این جنس را جست (Moreno-Velandia, Izquierdo-García, Ongena, Kloepper, & Cotes, 2018). این باکتری می‌تواند منبعی با پتانسیل بالا برای تولید فراورده‌های زیستی باشند. تولید صنعتی *Bacillus* راحت است، چون نیاز تغذیه‌ای خاصی ندارد. *Bacillus* که به‌طور معمول در شرایط هوازی رشد می‌کند، قادر است در شرایط با غلظت کم اکسیژن به صورت بی‌هوازی بقاء پیدا کند. این باکتری می‌تواند تقریباً تمام مکانیسم‌های شناخته‌شده کنترل زیستی و افزایش رشد را به کار گرفته و باعث شود باکتری در

خاک مخلوط پیچیده‌ای است که در نتیجه فرآیندهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی حاصل می‌شود (Rocha-Miranda & Venâncio, 2019). میکروارگانیسم‌های موجود در خاک مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها عملکرد اکوسیستم را از طریق تجزیه مواد و چرخه مواد غذایی کنترل می‌کنند و این موجودات ممکن است به عنوان نشانگر تغییرات خاک و سلامتی اکوسیستم باشند (Almakki, Jumas-Bilak, Marchandin, & Licznar-Fajardo, 2019; Jørgensen, Kudsk, & Ørum, 2019). فراوان‌ترین میکروروب‌ها در خاک باکتری‌ها هستند که در هر ۴۰۰۰ مترمربع از خاک حدود یک میلیون تن از باکتری‌ها وجود دارند. با توجه به رشد روزافزون جمعیت و نیاز به تولید مواد غذایی بیشتر برای این جمعیت در حال رشد در جهان، تولید بیشتر محصولات کشاورزی به‌شدت مورد توجه قرار دارد. استفاده از آفت‌کش‌ها شیمیایی معمول‌ترین روش برای تولید بیشتر محصولات کشاورزی در جهان به حساب می‌آید (Hage-Ahmed, Rosner, & Steinkellner, 2019; de Queiroz *et al.*, 2018). اما بعد اقتصادی و مشکلات زیست‌محیطی مربوط به آلودگی اکوسیستم‌های خاکی و آبی استفاده از آن‌ها کشاورزی را با چالشی بزرگ روبه‌رو کرده است. در این راستا بهره‌گیری از روش‌های نوین دوست‌دار محیط‌زیست و مقرون‌به‌صرفه از لحاظ اقتصادی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (Jørgensen *et al.*, 2019; de Queiroz *et al.*, 2018).

امروزه استفاده از ریزوباکتری‌هایی که باعث تولید محصول بیشتر در صنعت کشاورزی می‌شوند از جمله روش‌های مورد توجه در این زمینه می‌باشند (Kabdwal *et al.*, 2019). به‌عنوان مثال، *Bacillus spp* با القاء ایزومرهای مختلفی از ژیرلین در گیاه توسکا باعث افزایش طول ساقه در این گیاه می‌شوند. وجود این

تأخیری، لگاریتمی و سکون الگوی متفاوت دارد. شاید در آینده مطالعه روی مسیرهای بیوسنتز ترکیبات فرار اهمیت بیشتری پیدا کند (Hage-Ahmed *et al.*, 2019; Schulz & Dickschat, 2007). استفاده از *B. subtilis* در کنترل بیماری‌های قارچی مختلف نظیر پژمردگی لوبیا، پوسیدگی زغالی سیب‌زمینی (Deshmukh, Gade, Belkar, & Koche, 2015)، *(Macrophomina phaseoli)*، پوسیدگی سفید پیاز (*Sclerotium cepivorum*) و پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از *Monilinia fructicola* در درختان میوه هسته‌دار (Shlevin, Gamliel, Katan, & Shtienberg, 2018) و نیز در کنترل مرگ گیاهچه پنبه در اثر *Pythium ultimum* (Li *et al.*, 2019) مؤثر و مفید واقع گردیده است.

قارچ *S. sclerotiorum* یکی از پلی‌فاژترین (*polyphagous*) بیمارگرهای گیاهی است و در فرم غیر جنسی تولید اسکروت به رنگ سیاه و لایه‌ی درونی سفید می‌کند. این عامل بیمارگر از شایع‌ترین بیمارگرهای گیاهان آبدار (سبزی‌ها و گل‌ها) در گلخانه و مزارع است و جزو بیمارگرهای خاک‌زاد است که به صورت اسکروت مدت زیادی در خاک باقی می‌ماند و موجب آلودگی می‌شود. خسارت گسترده در محصولات و عدم وجود مقاومت میزبان، انگیزه‌ای برای تحقیقات مداوم بر این بیمارگر است، به طوری که در ایالت متحده آمریکا خسارت قارچ سالانه به ۲۰۰ میلیون دلار می‌رسد و به همین دلیل، بودجه‌ای برای طرح ملی قارچ در وزارت کشاورزی به منظور حمایت از تحقیق در مورد بیولوژی و کنترل بیمارگر اختصاص داده شد. روش‌های معمول کنترل بیماری اسکروتینایی (*Sclerotinia rot*) شامل اقدامات زراعی و مبارزه شیمیایی می‌باشد (Adnan *et al.*, 2019). روش‌های زراعی اگرچه موجب کاهش تراکم عامل بیماری‌زا در خاک گردیده‌اند، ولی کاربرد آن‌ها

شرایط مختلف از جمله گیاهان متنوع، بیمارگرهای متفاوت و شرایط محیطی گوناگون از مکانیسمی به جای دیگری استفاده کند. باکتری‌ها بدبو هستند (Schulz & Dickschat, 2007). شاید این یکی از عمومی‌ترین دانسته‌های ما انسان‌ها باشد. واقعیت اینجاست که گیاهان هم قادرند بوی باکتری‌ها را حس کنند و به آن‌ها به طرق مختلف پاسخ دهند. برخی با افزایش رشد، برخی با کاهش رشد و برخی نیز با افزایش مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده (Schulz & Dickschat, 2007). ترکیبات فرار (*volatile compound*) با وزن مولکولی پایین (کمتر از ۳۰۰ گرم/مول) واسطه‌های کارایی در ارتباطات بین موجودات هستند که به صورت پیام‌های جذب‌کننده، دفع‌کننده یا هشداردهنده برای موجودات در تمام سلسله‌ها استفاده می‌شوند. درک ترکیبات فرار و در نتیجه آن پاسخ دادن به خیلی از محرک‌ها، ویژه انسان و حیوانات نیست و در گیاهان و میکروب‌ها هم دیده شده است (Schulz & Dickschat, 2007). ترکیبات فرار به صورت فعالی تولید می‌شوند و به عنوان یک زبان پیشرفته و توانا به وسیله گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد تا با دیگر موجودات از جمله حشرات و میکروب‌ها ارتباط برقرار کند. تعداد ۳۴۶ ترکیب فرار باکتری‌ها شناسایی شده که در مجموع ۷۵ مشتق اسید چرب، ۵۰ ترکیب آروماتیک، ۷۴ ترکیب نیتروژن دار، ۳۰ ترکیب گوگرددار، ۹۶ ترپن و ۱۸ ترکیب هالوژنه هستند. ظهور و وجود ترکیبات فرار به مسیر متابولیسمی موجود در باکتری‌ها، نوع محیط کشت و شرایط محیطی بستگی دارد. به عنوان مثال، رشد *Stenotrophomonas rhizophila* در محیط NB حاوی یا فاقد گلوکز چه از لحاظ کمی و چه از لحاظ کیفی کروماتوگرافی گازی متفاوتی دارد. همچنین افزودن فرم L-گلوکز به محیط کشت باعث تولید ترکیبات فرار کمتری در مقایسه با فرم D-گلوکز می‌شود. همچنین متابولیسم ترکیبات فرار در باکتری *S. rhizophila* در فاز

مواد و روش‌ها

باکتری *B. subtilis*، قارچ *S. sclerotiorum* و بذرها *S. rechingeri* از کلکسیون، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد. این سویه قارچی قادر به بیماری‌زایی اسکلوونیایی است. برای تهیه اسپور، قارچ به مدت ۷ روز در محیط کشت PDA و در دمای C ۲۵ قرار داده شد (Adnan et al., 2019).

برای بررسی اثر ترکیبات فرار *B. Subtilis* از آزمون پتری‌های متقابل استفاده شد. بدین منظور پتری‌های ۶ حای کشت تازه روی محیط کشت (NA) Nutrient Agar تهیه شد. قرص میسلیمی به قطر ۵cm از حاشیه کشت جوان قارچ *S. sclerotiorum* روی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) تهیه شده، درب هر دو تشتک حاوی کشت باکتری و کشت قارچ حذف شده و تشتک حاوی باکتری به صورت وارونه روی تشتک حاوی قارچ قرار داده شد (شکل ۱- الف). به منظور جلوگیری از خروج ترکیبات فرار، این دو تشتک با پارافیلیم به خوبی مسدود شدند. مجموعه حاصل در دمای C ۲۵ و تاریکی نگهداری شد تا زمانی که رشد قارچ در تشتک شاهد (تشتک NA فاقد باکتری) کامل شود.

به منظور استخراج ترکیبات فرار باکتری، از ارلن ml ۱۲۵ با درپوش پلاستیکی استفاده شد (Farag, Ryu, Sumner, & Pare, 2006). ارلن حاوی حدود ml ۲۵ محیط کشت نوترینت آگار استریل شده به طوری خنک شد محیط کشت به صورت کمی شیب‌دار جامد شده و بتوان سوسپانسیون باکتری را به راحتی بر روی آن پخش کرد (شکل ۱- ب). حدود $100 \mu\text{l}$ سوسپانسیونی از کشت تازه (۱۸-۲۰ h) حاوی 2×10^8 CFU/ml باکتری روی محیط کشت NA پخش شده و بلافاصله درب ظرف با درپوش پلاستیکی که از قبل استریل شده بود، پوشانده و طور کامل کپ شد تا از خروج ترکیبات فرار جلوگیری شود. بعد از حدود ۱۸ h رشد در انکوباتور دمای C ۳۷ برای جمع‌آوری ترکیبات فرار از روش SPME با جنس فیبر

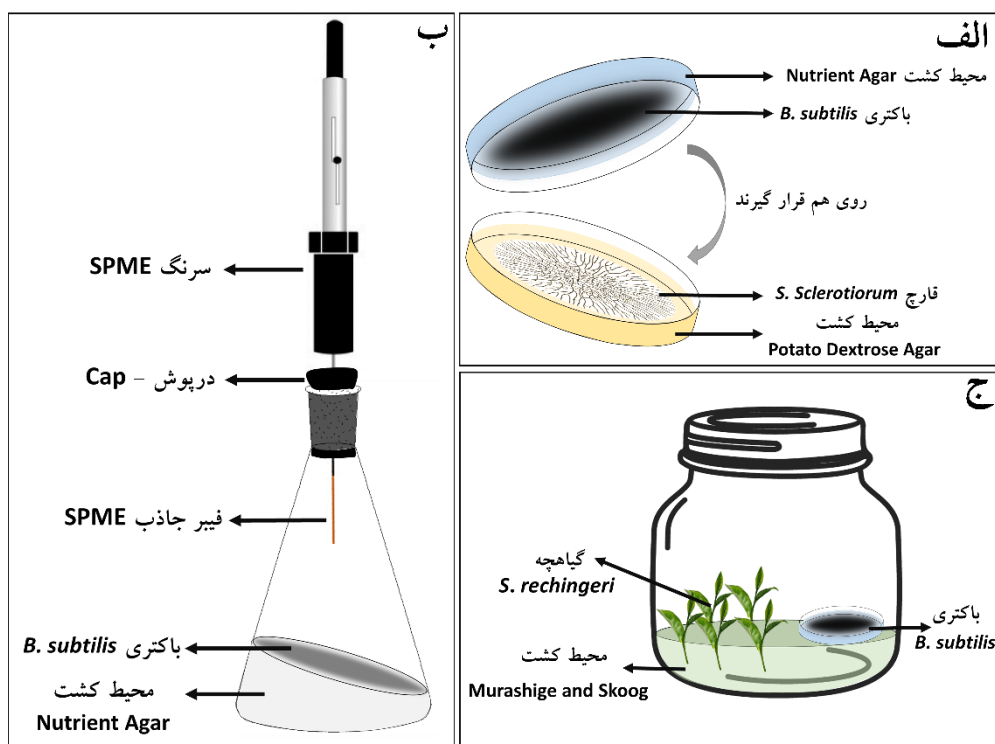
به تنهایی جهت کنترل بیماری کافی نبوده است. با توجه به اثرات قارچ‌کش‌های شیمیایی، ورود باقی‌مانده‌های سمی به محیط‌زیست و پرهزینه بودن آن‌ها باعث شده که زمینه کنترل زیستی (*biological control*) *S. sclerotiorum* با استفاده از آنتاگونیست‌ها (*antagonist*) مورد توجه قرار گیرد. جوانه‌زنی اسکروت‌های *S. sclerotiorum* جداشده از دیسک‌های هویچ به وسیله گونه‌های *B. subtilis* ممانعت و یا کاهش یافت (Adnan et al., 2019).

گیاه مرزه (*Satureja rechingeri*) متعلق به خانواده نعناعیان، یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین گیاهان دارویی و صنعتی است (Nooshkam, Mumivand, Hadian, Alemardan, & Morshedloo, 2017) و یکی از چالش‌ها در زمینه آن اسکروت‌های *S. sclerotiorum* است (Taban & Saharkhiz, 2015). در مطالعه پیش رو ضمن شناسایی و بررسی کمی ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis* و گیاه *S. rechingeri* به مطالعه کنترل بیولوژیکی قارچ *S. sclerotiorum* و افزایش مقاومت گیاه *S. rechingeri* با استفاده از ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis* پرداخته شده است. بر اساس گزارش‌های جهانی، بیماری‌های خاکزاد به‌ویژه *S. sclerotiorum* سالانه میلیون‌ها دلار خسارت به محصولات کشاورزی وارد می‌کنند (Adnan et al., 2019). استفاده مکرر از قارچ‌کش‌های شیمیایی علاوه بر هزینه‌های اقتصادی، مشکلاتی نظیر باقی ماندن سموم در محصولات، تخریب میکروفلور خاک و آلودگی منابع آب ایجاد می‌کند. روش‌های جایگزین نظیر اقدامات زراعی (تناوب کشت، ضدعفونی خاک، مدیریت بقایای گیاهی) اگرچه در کاهش فشار بیماری مؤثر هستند، اما به تنهایی کافی نبوده‌اند؛ بنابراین، بهره‌گیری از عوامل بیوکنترل به‌ویژه باکتری‌های آنتاگونیست مانند *B. Subtilis* به‌عنوان روشی پایدار، کم‌هزینه و دوستدار محیط‌زیست اهمیت بیشتری می‌یابد.

ترکیبات فرار *S. rechingeri* نیز از سیستم دستگاهی مشابه مجهز به ستون DB-5 در نسبت تزریق ۱:۱۰۰ و حجم تزریق ۰/۲ µl تحت برنامه دمایی دمای C ۶۰ و سپس افزایش دما با نسبت C/min ۵ تا دمای C ۲۵۰ حفظ این دما برای ۱۰ min استفاده شد (Salehi, Sonboli, Khaligh, & Mirzajani, 2012).

برای مطالعه اثر ترکیبات فرار باکتری بر گیاه *S. rechingeri* ابتدا گیاهچه‌های جوان آماده شدند. برای این منظور بذرها *S. rechingeri* یک روز زیر آب جاری قرار داده شد تا بذرها پوک روی آب بیایند و از سایر بذرها جدا شوند. بعد از یک روز این بذرها به روش معمول در آزمایشگاه استریل شدند؛ سپس بذرها در محیط (MS) Murashige and Skoog and همراه جیبرلین (۱۵۰۰ ppm) یک روز در یخچال قرار داده شد (Mirzajani, Askari, Hamzelou, Farzaneh, & Ghassempour, 2013).

PDMS/DVB و مدت ۳۰ min کلی جذب استفاده شد (Karami et al., 2017a; Karami et al., 2017b). برای مطالعه ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis* کروماتوگرافی گازی TRACE MS از شرکت ThermoQuest-Finnigan با اتصال به دستگاه اسپکترومتری جرمی به دام‌اندازنده یونی Quadrupole، انرژی ۷۰ eV در فیلامنت، دمای میانجی C ۲۵۰ و دمای محفظه یونش C ۲۰۰ با قابلیت مطالعه (m/z) Da ۲۰۰۰-۴۰ مجهز به ستون DB-5، به طول ۶۰ m، قطر داخلی ۰/۲۵ mm (id) و ضخامت فیلم ۰/۲۵ µm، با گاز حامل هلیوم و تحت جریان (ml/min) ۱/۱ و تحت برنامه شروع از دمای C ۶۰ و سپس افزایش دما با سرعت دمای C/min ۶ در دقیقه تا دمای C ۲۵۰ به مدت ۳ min به روش splitless مورد استفاده قرار گرفت (Karami et al., 2017b). برای مطالعه تغییرات اسانس (essential oil)



شکل ۱- تکنیک آزمایشگاهی طراحی شده جهت: الف) آزمون پتری‌های متقابل برای بررسی اثر ترکیبات فرار *B. subtilis* بر میزان رشد قارچ *S. sclerotiorum*، ب) روش استخراج ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis*، ج) مطالعه اثر ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis* بر گیاه *S. rechingeri*

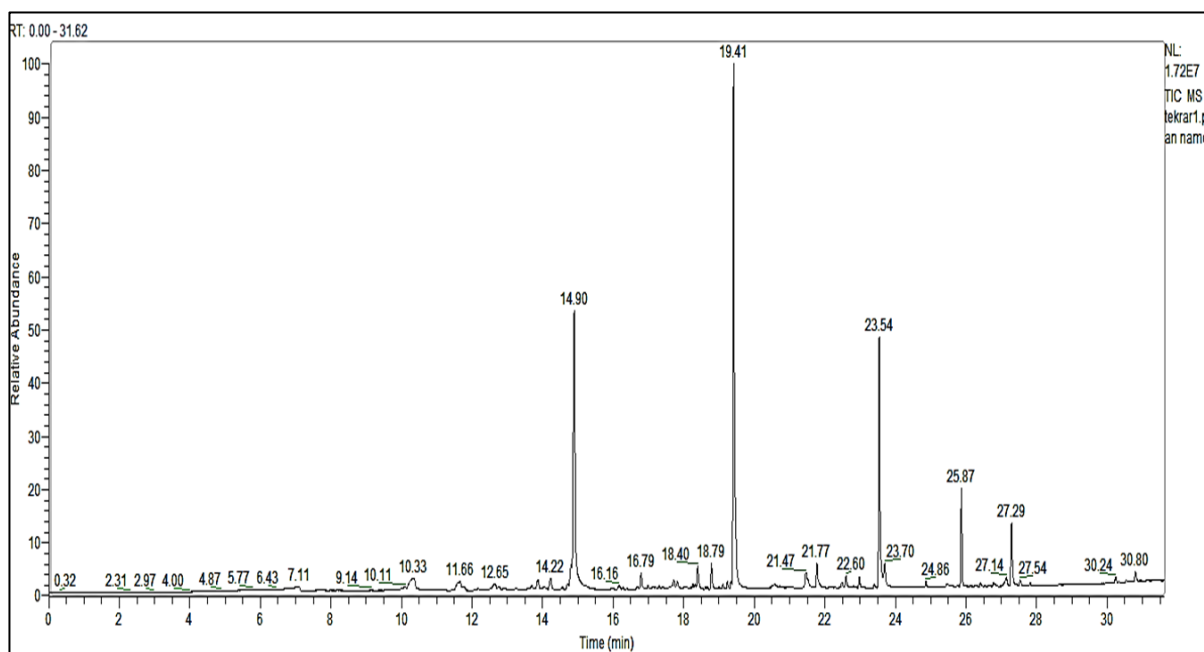
Fig. 1- Laboratory designed for: a) Petri dish comparing test to investigate the effect of *B. subtilis* volatile compounds on the growth rate of *S. sclerotiorum* fungus, b) *B. subtilis* volatile compounds extraction, and c) study the effect of *B. subtilis* volatile compounds on *S. rechingeri*

تأثیر می‌گذارند. این ترکیبات فرار مشابه سایر ترکیبات فرض شده و به عنوان ساختارهای شیمیایی برای تبادل‌های بین ارگانوسمی، سیگنال‌هایی برای روابط سلول-سلول، دریچه‌ای برای آزادسازی کربن و عوامل بهبود و بازدارنده عمل می‌کنند (Farag et al., 2006). گستره فعالیت آن‌ها از قدرت نفوذشان در محلول‌های آبی تا توانایی پخش شدن در هوا را شامل می‌شود. ترکیبات فرار باکتری منبعی جدید از ترکیبات طبیعی معرفی می‌کنند و می‌توان از آن‌ها برای بهبود سلامت عمومی و افزایش بهره‌وری در محصولات کشاورزی استفاده کرد (Farag et al., 2006; Kazan & Manners, 2008). گستره تأثیرات شناخته‌شده ترکیبات فرار باکتری بر قارچ شامل بازدارندگی و تقویت رشد میسلیوم، تحریک یا کاهش تشکیل اسپور، تغییر کلنی و مورفولوژی هیف و تشکیل زودرس اسکلروت می‌باشد. ترکیبات فرار یک گونه تأثیرات و یا درجه بازدارندگی یکسانی بر همه‌ی قارچ‌ها نمی‌گذارند و پاسخ‌ها به نوع ترکیبات هر یک از آن‌ها بستگی دارد (Adnan et al., 2019).

پنج گیاهچه هفت‌روزه در بطری‌های شیشه‌ای حاوی ml ۳۰ محیط نیمه جامد MS صورت یکنواخت نشاء کاری شدند. پلیت ۳ cm حاوی کشت تازه باکتری در داخل ظرف شیشه‌ای در کنار گیاهچه گذاشته شد (شکل ۱-ج). در شاهد، پلیت حاوی محیط کشت NA و بدون باکتری استفاده شد. به این صورت گیاه و باکتری هیچ تماس فیزیکی با هم نداشته و فقط ترکیبات فرار باکتری بر گیاه تأثیر می‌گذارد. درب ظرف شیشه‌ای با پارافیلیم به‌خوبی مسدود و برای مدت ۳۰ روز در اتاقک رشد با دمای C ۲۵ و تناوب نوری ۱۶ h روشنایی و ۸h تاریکی نگهداری شد (Mirzajani et al., 2013). بعد از یک ماه ۵/۷۹ گرم از گیاه شاهد و ۷/۶۸ گرم از گیاه تیمار دیده در کلونجر تحت شرایط رفلاکس و به مدت 2 دو ساعت اسانس گیری شد.

نتایج و بحث

بررسی‌های اخیر به‌وضوح نشان داده‌اند که باکتری‌ها ترکیبات فرار خود را در طول برهم‌کنش با دیگر ارگانوسم‌ها به کار می‌گیرند و بر روابط و جمعیت آن‌ها



شکل ۲- کروماتوگرام GC-MS ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis*
Fig. 2- GC-MS chromatogram of *B. subtilis* volatile compounds

کم متابولیت‌های فرار را استخراج می‌کند. براین اساس سیستم SPME برای استخراج ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis* استفاده و مستقیماً با دستگاه GC-MS بررسی شد (شکل ۲). با مطالعه و بررسی دقیق زمان‌های بازداری ترکیبات، شاخص بازداری، طیف‌های جرمی و مقایسه این پارامترها با ترکیبات استاندارد و کتابخانه دستگاه، ترکیبات موجود در ترکیبات فرار باکتری شناسایی شدند (جدول ۱).

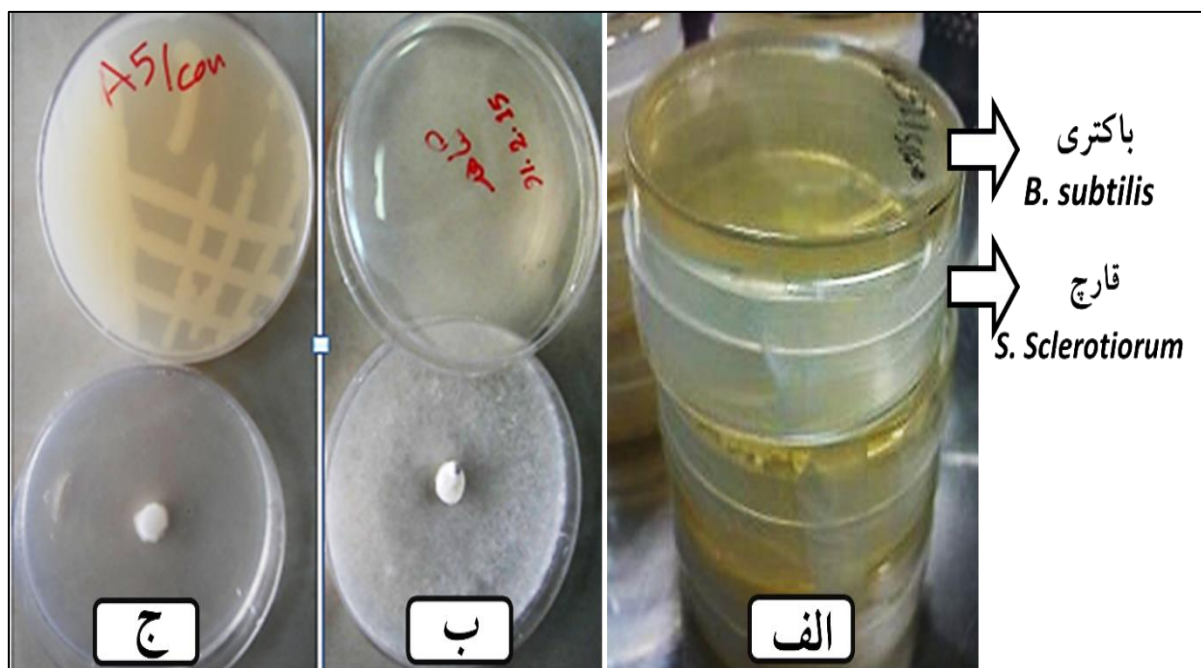
در ابتدا با توجه به هدف که تأثیر ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis* بر میزان رشد قارچ *S. sclerotiorum* و گیاه مرزه یا *S. rechingeri*، ترکیبات فرار این باکتری بر اساس روش آزمایشی شرح داده شده (شکل ۱-ب) استخراج و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی GC-MS بررسی شد. سرنگ ریز استخراج با فاز جامد (SPME) ترکیبات فرار محیط کشت باکتری را در مدت کوتاه (≤ 30 min)، در غیاب هوا و در محیط با اکسیژن

جدول ۱- شناسایی ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis* با استفاده از شاخص بازداری (RI) و مقایسه کتابخانه نرم‌افزاری الگوی طیف‌های جرمی
Table 1- Volatile compounds of *B. subtilis* identification using inhibition index (RI) and comparison of mass spectrum and library software

درصد	شاخص بازداری	نام ترکیب	ردیف	درصد	شاخص بازداری	نام ترکیب	ردیف
۱/۳۶	۱۳۶۵	Tridecane-3-methyl	۱۱	۲/۲۴	۱۰۰۳	Decane	۱
۷۵/۸۵	۱۳۹۲	Tetradecane	۱۲	۱/۹۵	۱۰۵۹	Octane,5-ethyl-2-methyl	۲
۰/۳۷	۱۴۴۸	Trans- 2-Dodecenal	۱۳	۰/۸۳	۱۱۰۰	Undecane	۳
۰/۴۹	۱۵۴۵	Pentadecane-5-methyl	۱۴	۱/۱۲	۱۱۵۱	Undecane-5-methyl	۴
۰/۳۸	۱۵۶۴	Pentadecane-3-methyl	۱۵	۰/۳۲	۱۱۶۹	Undecane-3-methyl	۵
۰/۱۳	۱۵۸۴	Hexadecene	۱۶	۰/۲۷	۱۱۸۰	2-nenen-1-ol	۶
۹/۶۲	۱۵۹۲	Hexadecane	۱۷	۲۳/۱۹	۱۱۹۴	Dodecane	۷
۲/۰۲	۱۷۹۳	Octadecane	۱۸	۲/۱۵	۱۳۰۰	Tridecane	۸
۰/۳۸	۱۹۹۵	Eicosane	۱۹	۰/۲۷	۱۳۲۲	Decane,2,3,5,8-tetramethyl	۹
				۱/۳۳	۱۳۴۸	Tridecane-5-methyl	۱۰

برای انتخاب مقدماتی گونه‌ها استفاده می‌شود. بعد از چهار روز مقدار رشد میسلیم قارچ بررسی شد. میانگین درصد کاهش رشد میسلیم *S. sclerotiorum* در اثر ترکیبات فرار تولیدشده توسط باکتری آنتاگونیست در آزمون کشت متقابل 0.1 ± 0.25 cm و درصد مهار $95/83\%$ نسبت به نمونه شاهد فاقد باکتری متقابل است. تحقیقات مشخص کرده است که به طور متوسط چهار الی پنج درصد ژنوم باکتری *B. subtilis* برای سنتز آنتی‌بیوتیک اختصاص داشته و توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی متعدد با ساختارهای متفاوت را دارد و در این آزمون توانستند درصد بازداری از رشد میسلیم را به $95/83\%$ برسانند (شکل ۳-ج).

برای بررسی تأثیرات منفی ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis* بر میزان رشد قارچ *S. sclerotiorum* از آزمون رشد در پتری‌های متقابل استفاده شد (شکل ۱-الف). به طوری که قارچ فقط در تماس با ترکیبات فرار باکتری بوده و هیچ محلولی از باکتری با قارچ در تماس نبود. باکتری‌های آنتاگونیست در آزمایشگاه بر اساس قدرت بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری‌زا انتخاب شدند. آنالیز داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. با توجه به اینکه هاله‌ی بازدارندگی بین آنتاگونیست و قارچ، منعکس‌کننده فعالیت کلی ترشحات خارج سلولی آنتاگونیست علیه بیماری‌زا است، در اکثر موارد از قطر هاله بازدارندگی، به عنوان شاخص کمی،



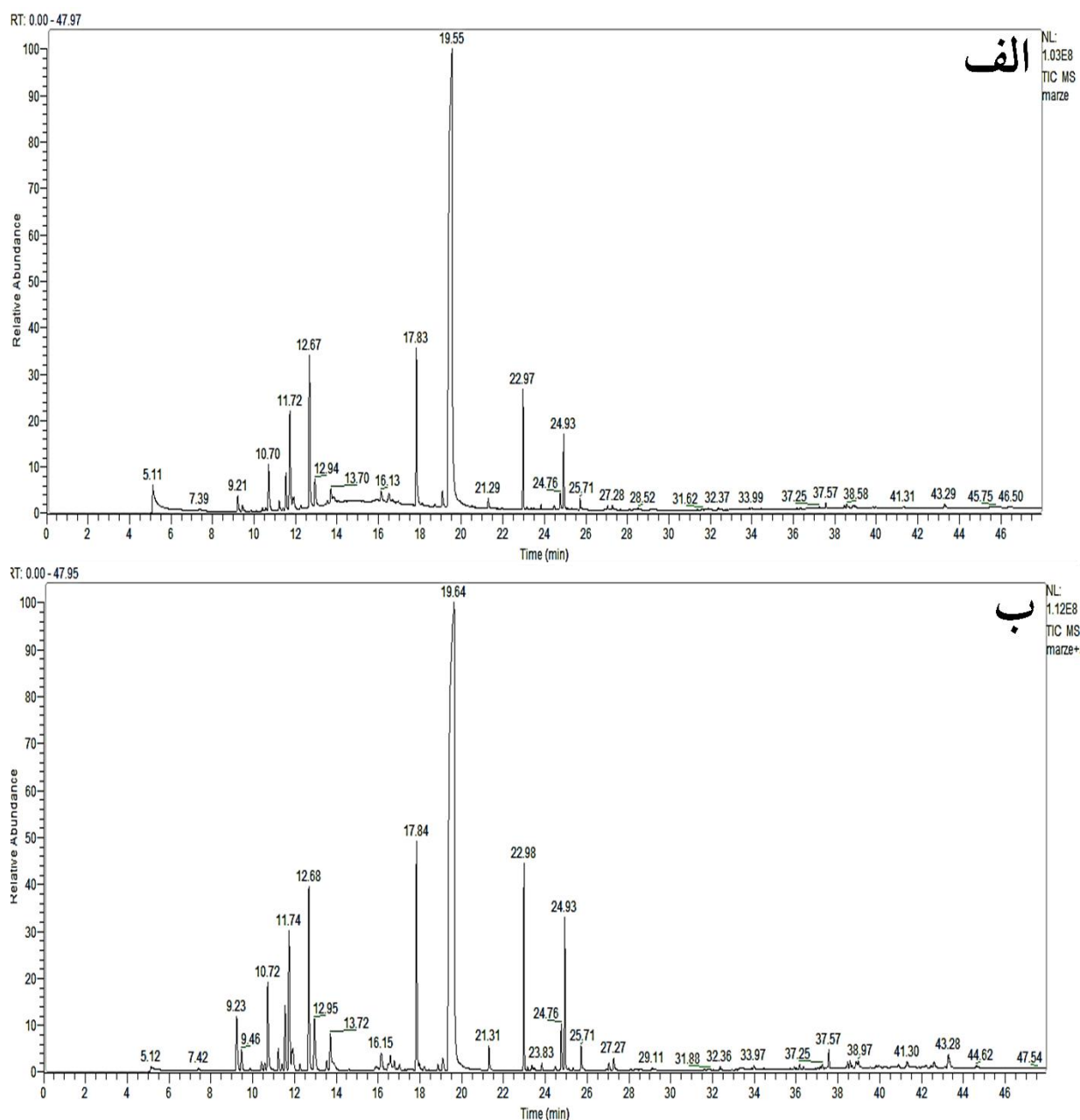
شکل ۳- الف: آزمون پتری‌های متقابل برای بررسی اثر ترکیبات فرار *B. subtilis* بر میزان رشد قارچ *S. sclerotiorum* - تأثیر جدایی‌های آنتاگونیست در کاهش رشد میسلیموم *S. sclerotiorum* در آزمون کشت متقابل قارچ با ب: محیط شاهد و ج: پلیت باکتری *B. subtilis* A5
 Fig. 3- A: Petri dish comparing test to investigate the effect of *B. subtilis* volatile compounds on the growth rate of *S. sclerotiorum* - Effect of antagonist isolates in the growth reduction of *S. sclerotiorum* cross cultured to B: control medium and C: *B. subtilis* culture

ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس طی مجاورت و رشد یک‌ماهه در کنار ترکیبات فرار *B. subtilis* توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی GC-MS بررسی شد (جدول ۲). طیف GC-MS اسانس مرزه در حالت‌های بدون تیمار و تحت تیمار در شکل‌های ۴-الف و ۴-ب قابل مشاهده است.

ترکیبات تشکیل‌دهنده این اسانس نیز به ترتیب خروج از ستون DB-5، درصد نسبی و روش شناسایی در حالت‌های بدون تیمار و تحت تیمار به ترتیب در جدول ۲ آورده شده است. با توجه به آنالیز اسانس گیاه تحت تیمار با باکتری *B. subtilis*، افزایش در اجزای α -توجان، α -پینن، β -پینن، β -میرسن، α -تریپینن، p-سیمن، γ -تریپینن، کارواکرول متیل اتر و t-کاریوفیلین نسبت به حالت کنترلی مشاهده شد. درحالی‌که درصد اسانس تیمول و کارواکرول تحت تیمار باکتری کاهش یافتند. همان‌طور که از نتایج مشخص است به غیر از چند مورد، اغلب ترکیبات شناسایی شده افزایش مقدار داشته‌اند.

در سایر تحقیقات مشخص شده است که ترکیبات فرار *B. subtilis* موجب بدشکلی هیفی و واکوئل دار شدن قارچ *R. solani* و *P. ultimum* و بازداری از رشد مایکوریزی *G. mossa* شدند و اثر بازدارندگی بر رشد میسلیموم مجموعه‌ای از قارچ‌ها را دارند. از سوی دیگر ریزوباکتری‌های بهبوددهنده رشد گیاه با تسهیل در جذب مواد مغذی و کاهش صدمات بیماری، موجب بهبود شرایط زیست‌محیطی گیاهان می‌شوند. طراحی آزمایشی مطابق شکل ۱-ج انجام شد تا اثرگذاری ترکیبات فرار *B. subtilis* در تغییر میزان و نسبت ترکیبات اسانس گیاه مرزه بررسی شود. با استفاده از خاصیت مکملی اجزای اسانس و با توجه به اثرات هم‌افزایی (synergistic effect) و آنتاگونیستی این ترکیبات می‌توان از اسانس مرزه در صنایع داروسازی و پزشکی استفاده کرد.

در ادامه، اسانس گیاهچه مرزه و گیاهچه‌هایی که به مدت ۳۰ روز در معرض ترکیبات فرار *B. subtilis* قرار گرفته بودند، به کمک دستگاه کلونجر استخراج شدند. تغییرات



شکل ۴- کروماتوگرام GC-MS ترکیبات فرار یا اسانس گیاه مرزه یا *S. rechingeri*، الف: در حالت شاهد و ب: در حالت تیمار با ترکیبات فرار *B. subtilis*

Fig. 4- Essential oil GC-MS chromatogram of *S. rechingeri* in A: the control condition and B: the *B. subtilis* treatment condition

γ -ترپینن اثبات می‌شود (Nooshkam *et al.*, 2017). تیمول و کارواکرول فعالیت ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند. در فعالیت ضد قارچی، تیمول و کارواکرول از فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی گیاه مانند کیتیناز و همچنین α و β -گلوکاناز که توسط قارچ تولید می‌شود، جلوگیری می‌کنند.

متابولیت‌های ثانویه گیاه مرزه به عنوان ترکیبات دفاعی گیاه ایجاد شده‌اند (Zhao *et al.*, 2019). با توجه به مسیر بیوسنتزی تیمول و کارواکرول γ -ترپینن و p-سیمن پیش ماده‌های تیمول و کارواکرول هستند. از آنجایی که این چهار ترکیب از نظر خواص بیولوژیکی و عملکرد به هم نزدیک هستند، تئوری تشکیل کارواکرول و تیمول از p-سیمن و

جدول ۲- شناسایی ترکیبات فرار یا اسانس گیاه مرزه یا *S. rechingeri*، در حالت شاهد و در حالت تیمار با ترکیبات فرار *B. subtilis* با استفاده از شاخص بازداری (RI) و مقایسه کتابخانه نرم‌افزاری الگوی طیف‌های جرمی

Table 2- Identified *S. rechingeri* essential oils in the control condition and *B. subtilis* volatile compounds treatment condition based on the inhibition index (RI) and mass spectrum

درصد تیمار	درصد شاهد	شاخص بازداری	نام ترکیب	ع.ع	درصد تیمار	درصد شاهد	شاخص بازداری	نام ترکیب	ع.ع
۱/۳۴	۰/۹۳	۱۰۵۷	γ -terpinene	۷	۰/۴۲	۰/۰۸۱	۹۲۷	α -Thujone	۱
۰/۰۳۱	۰/۱۵	۱۲۸۴	Thymol	۸	۰/۱۷	۰/۰۴۲	۹۳۶	α -Pinene	۲
۸۸/۲	۹۱/۶	۱۲۹۸	Carvacrol	۹	۰/۰۷۹	۰/۰۲۹	۹۸۰	β -Pinene	۳
۱/۴۱	۱/۰۸	۱۴۲۹	Trans-Caryophyllene	۱۰	۰/۸۶	۰/۲۸	۹۸۵	β -Myrcene	۴
۱/۹۲	۱/۳۷	۱۲۳۹	Carvacrol methyl ether	۱۱	۰/۳۵	۰/۲۱	۱۰۱۷	α -Terpinene	۵
					۱/۳۱	۰/۷۱	۱۰۲۳	p-Cymene	۶

کارواکرول دارند که سبب مهار و کاهش مقادیر آن‌ها می‌شود. در مقابل α -پینن و β -پینن به میزان قابل توجهی از رشد باکتری جلوگیری نمی‌کنند (Taban & Saharkhiz, 2015)؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مونوترپن‌های اکسیژن‌دار به خاطر گروه عاملی فنولی خود فعالیت ضد باکتری بیشتری نسبت به هیدروکربن‌ها نشان می‌دهند. با این وجود افزایش مقادیر α -توجان، α -پینن، β -پینن، β -میرسن، α -ترپینن، p-سیمن، γ -ترپینن، کارواکرول متیل اتر و t-کاریوفیلن در مقابل تنش وارد شده توسط باکتری را می‌توان چند عامل مربوط دانست. می‌توان فرض کرد که این ترکیبات خود نقشی در دفاع نداشته باشند اما در تولید یک یا چند ماده کلیدی در سیستم دفاعی نقش دارند (Ataide et al., 2019). همچنین شروع کننده یک مسیر دفاعی خاصی را رقم می‌زنند و یا با مواد دیگر اثر هم‌افزایی و ضد میکروبی دارند (Subramanyam et al., 2019). ترکیبات فرار *B. subtilis* می‌توانند با اختلال در یکپارچگی غشای سلولی قارچ، مهار آنزیم‌های دخیل در سنتز دیواره (مانند کیتیناز و β گلوکاناز) و ایجاد استرس اکسیداتیو، رشد میسلیم را متوقف کنند (Farag et al., 2006). از سوی دیگر، این ترکیبات با القای مسیرهای دفاعی در گیاه نظیر مسیر ژاسمونات (jasmonate pathway) و افزایش

به احتمال زیاد، فعالیت ضد میکروبی تنها به خاطر حضور مشتقات فنولی نیست و ترکیبات جزئی اسانس نیز با فعالیت‌های آنتاگونیستی و هم‌افزایی بر فعالیت کلی اسانس تأثیر دارند. به طوری که p-سیمن به تنهایی خاصیت ضد باکتری ندارد ولی زمانی که با کارواکرول ترکیب می‌شود با اثر هم‌افزایی موجب فعالیت باکتری‌کشی می‌شود (Elansary et al., 2018; Saharkhiz et al., 2016). فعالیت ضد باکتری به این دلیل است که p-سیمن آب‌گریز است و در لایه لیپیدی قرار می‌گیرد و انتقال کارواکرول به غشای سیتوپلاسمی را آسان می‌کند. با این حال γ -ترپینن به صورت چشمگیر فعالیت ضد باکتری از خود نشان نمی‌دهد. نتایج نشان از کاهش مقادیر تیمول و کارواکرول در مقابل ترکیبات فرار باکتری دارد (Saharkhiz et al., 2016). طبق مسیر بیوسنتزی این دو ماده در گیاه، احتمال مهار آنزیم سنتزی آن‌ها توسط ترکیبات فرار باکتری وجود دارد. از آنجایی که مقادیر p-سیمن و γ -ترپینن افزایش یافته است، این احتمال نیز وجود دارد که ترکیبات فرار باکتری از یک طرف مسیرهای اولیه سنتزی p-سیمن و γ -ترپینن را تقویت کرده و سبب افزایش مقادیر این دو ماده می‌شود و از طرف دیگر، تمایل زیادی به جایگاه فعال آنزیم سنتزی تولید تیمول و

مرزه یا *S. rechingeri* مورد بررسی قرار گرفت. این گیاه در درمان دردهای عصبی کاربرد دارد و به دلیل داشتن کارواکرول که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است در درمان سرطان نیز استفاده می‌شود (Nooshkam *et al.*, 2017). نتایج نشان می‌دهد که این ترکیبات گیاه مرزه از خانواده مونوترپن‌ها هستند که بیشتر به عنوان آفت‌کش‌های گیاهی و طبیعی در دنیا به کار می‌روند (Asai, Matsukawa, & Kajiyama, 2017; Ding *et al.*, 2018). تحقیقات محققین نشان داده است که ترکیبات مونوترپنی، بر بخش‌های مختلف سیستم عصبی حشرات از جمله گیرنده‌های انتقال پیام عصبی (مانند گیرنده‌های تیرامین، گیرنده‌های نیکوتینیک استیل کولین، گیرنده‌های اکتوپامین) و کانال‌های سدیم و کلر و آنزیم استیل کولین استراز اثر دارد. این ترکیبات مونوترپنی تحت تیمار ترکیبات فرار باکتری به میزان زیادی افزایش یافتند و می‌توان از آن‌ها به عنوان حشره‌کش نیز استفاده کرد (Kazan & Manners, 2008).

سپاسگزاری

نویسندگان از راهنمایی جناب آقای دکتر محسن فرزانه در بخش مطالعات قارچی و همچنین، حمایت مالی معاونت پژوهش دانشگاه شهید بهشتی کمال قدردانی را دارند.

References

- Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Huang, Z., Chen, H. Y. H., & Lu, G. D. 2019. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microb Pathog*, 129: 7-18.
- Almakki, A., Jumas-Bilak, E., Marchandin, H., & Licznar-Fajardo, P. 2019. Antibiotic resistance in urban runoff. *Sci Total Environ*, 667: 64-76.
- Asai, T., Matsukawa, T., & Kajiyama, S. 2017. Metabolomic analysis of primary metabolites in citrus leaf during defense responses. *J Biosci Bioeng*, 123(3): 376-381.
- Ataide, L. M. S., Dias, C. R., Schimmel, B. C. J., van Erp, T., Pallini, A., & Kant, M. R. 2019. Food decisions of an omnivorous thrips are independent from the indirect effects of jasmonate-inducible plant defences on prey quality. *Sci Rep*, 9(1): 1727.

تولید مونوترپن‌های فنولی (تیمول و کارواکرول) مقاومت گیاه را در برابر تنش‌های زیستی تقویت می‌کنند (Kazan & Manners, 2008). این نتایج نشان می‌دهد که ترکیبات فرار هم به طور مستقیم بر قارچ و هم به طور غیرمستقیم از طریق تقویت دفاع گیاه اثرگذار هستند.

نتیجه‌گیری

مشخص شده ترکیبات فرار آزاد شده از گونه‌های میکروبی خاص موجب بهبود رشد و پاسخ‌های دفاعی در گیاه آرابیدوپسیس می‌شوند، چنین سیگنال‌های فراری می‌توانند میزان اسانس‌های ضروری را در سایر گیاهان نیز افزایش دهند. از سوی دیگر شواهدی وجود دارد که ترکیبات فرار *B. subtilis* تجمع اسانس‌های ضروری را در گیاه *Ocimum basilicum* که غنی از ترپن است، افزایش می‌دهند. اجزای اصلی اسانس شامل R-terpineol و eugenol زمانی که گیاه در معرض ترکیبات فرار *B. subtilis* قرار می‌گیرند به ترتیب افزایش دو و ده برابری نسبت به حالت کنترل پیدا می‌کنند. این نتایج اثبات می‌کنند که ترکیبات فرار باکتری به عنوان انگیزاننده، میزان اسانس و زیست‌توده را در گونه‌های گیاهی که از نظر تجاری با ارزش هستند، افزایش می‌دهد. با توجه به اثرات بیولوژیکی ترکیبات فرار *B. subtilis*، اثر آن بر گیاه

منابع

- de Queiroz, V. T., Azevedo, M. M., da Silva Quadros, I. P., Costa, A. V., do Amaral, A. A., Dos Santos, G., Juvanhil, R. S., de Almeida Telles, L. A., & Dos Santos, A. R. 2018. Environmental risk assessment for sustainable pesticide use in coffee production. *J Contam Hydrol*, 219: 18-27.
- Deshmukh, M. A., Gade, R. M., Belkar, Y. K., & Koche, M. D. 2015. Efficacy of bioagents, biofertilizers and soil amendments to manage root rot in greengram. *Legume Research - An International Journal(OF)*.
- Ding, J., Ulanov, A. V., Dong, M., Yang, T., Nemzer, B. V., Xiong, S., Zhao, S., & Feng, H. 2018. Enhancement of gamma-aminobutyric acid (GABA) and other health-related metabolites in germinated red rice (*Oryza sativa* L.) by ultrasonication. *Ultrason Sonochem*, 40(Pt A): 791-797.

- Elansary, H. O., Abdelgaleil, S. A. M., Mahmoud, E. A., Yessoufou, K., Elhindi, K., & El-Hendawy, S. 2018. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. *BMC Complement Altern Med*, 18(1): 214.
- Farag, M. A., Ryu, C. M., Sumner, L. W., & Pare, P. W. 2006. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, 67(20): 2262-2268.
- Gotor-Vila, A., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixido, N. 2019. Enhanced shelf-life of the formulated biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 combining diverse packaging strategies and storage conditions. *Int J Food Microbiol*, 290: 205-213.
- Hage-Ahmed, K., Rosner, K., & Steinkellner, S. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. *Pest Manag Sci*, 75(3): 583-590.
- Jørgensen, L. N., Kudsk, P., & Ørum, J. E. 2019. Links between pesticide use pattern and crop production in Denmark with special reference to winter wheat. *Crop Protection*, 119: 147-157.
- Kabdwal, B. C., Sharma, R., Tewari, R., Tewari, A. K., Singh, R. P., & Dandona, J. K. 2019. Field efficacy of different combinations of *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas fluorescens*, and arbuscular mycorrhiza fungus against the major diseases of tomato in Uttarakhand (India). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1).
- Karami, N., Karimi, A., Aliahmadi, A., Mirzajani, F., Rezadoost, H., Ghassempour, A., & Fallah, F. 2017a. Identification of bacteria using volatile organic compounds. *Cellular and Molecular Biology*, 63(2): 112.
- Karami, N., Mirzajani, F., Rezadoost, H., Karimi, A., Fallah, F., Ghassempour, A., & Aliahmadi, A. 2017b. Diagnosis of three different pathogenic microorganisms by gas chromatography-mass spectrometry. *F1000Research*, 6: 1415.
- Kazan, K., & Manners, J. M. 2008. Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol*, 146(4): 1459-1468.
- Li, N., Zhou, Q., Chang, K.-F., Yu, H., Hwang, S.-F., Conner, R. L., Strelkov, S. E., McLaren, D. L., & Turnbull, G. D. 2019. Occurrence, pathogenicity and species identification of *Pythium* causing root rot of soybean in Alberta and Manitoba, Canada. *Crop Protection*, 118: 36-43.
- Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Farzaneh, M., & Ghassempour, A. 2013. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88: 48-54.
- Moreno-Velandia, C. A., Izquierdo-García, L. F., Ongena, M., Kloepper, J. W., & Cotes, A. M. 2018. Soil sterilization, pathogen and antagonist concentration affect biological control of *Fusarium wilt* of cape gooseberry by *Bacillus velezensis* Bs006. *Plant and Soil*, 435(1-2): 39-55.
- Nooshkam, A., Mumivand, H., Hadian, J., Alemardan, A., & Morshedloo, M. R. 2017. Drug yield and essential oil and carvacrol contents of two species of *Satureja* (*S. khuzistanica* Jamzad and *S. rechingeri* Jamzad) cultivated in two different locations. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6: 126-130.
- Rocha-Miranda, F., & Venâncio, A. 2019. Mycotoxigenic fungi in plant-based supplements and medicines. *Current Opinion in Food Science*, 30: 27-31.
- Saharkhiz, M. J., Zomorodian, K., Taban, A., Pakshir, K., Heshmati, K., & Rahimi, M. J. 2016. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Three *Satureja* Species Against Food-borne Pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(8): 1984-1992.
- Salehi, P., Sonboli, A., Khaligh, P., & Mirzajani, F. 2012. Essential oil composition and antioxidant activity of different extracts of *Nepeta betonicifolia* C.A. Meyer and *Nepeta saccharata* Bunge. *Natural Product Research*, 26(8): 736-743.
- Schulz, S., & Dickschat, J. S. 2007. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep*, 24(4): 814-842.
- Šević, M., Gašić, K., Ignjatov, M., Mijatović, M., Prokić, A., & Obradović, A. 2019. Integration of biological and conventional treatments in control of pepper bacterial spot. *Crop Protection*, 119: 46-51.
- Shi, Z. Q., Liu, Y. S., Xiong, Q., Cai, W. W., & Ying, G. G. 2019. Occurrence, toxicity and transformation of six typical benzotriazoles in the environment: A review. *Sci Total Environ*, 661: 407-421.
- Shlevin, E., Gamliel, A., Katan, J., & Shtienberg, D. 2018. Multi-study analysis of the added benefits of combining soil solarization with fumigants or non-chemical measures. *Crop Protection*, 111: 58-65.
- Subramanyam, S., Nemacheck, J. A., Hergarten, A. M., Sardesai, N., Schemerhorn, B. J., & Williams, C. E. 2019. Multiple molecular defense strategies in *Brachypodium distachyon* surmount Hessian fly (*Mayetiola destructor*) larvae-induced susceptibility for plant survival. *Sci Rep*, 9(1): 2596.
- Taban, A., & Saharkhiz, M. J. 2015. Natural phytotoxic activity of water extracts and dried leaf powders of three *Satureja* species. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4): 594-602.
- Tunsagool, P., Jutidamrongphan, W., Phaonakrop,

N., Jaresitthikunchai, J., Roytrakul, S., & Leelasuphakul, W. 2019. Insights into stress responses in mandarins triggered by *Bacillus subtilis* cyclic lipopeptides and exogenous plant hormones upon *Penicillium digitatum* infection. *Plant Cell Rep.*

Zhao, L., Hu, Z., Li, S., Zhou, X., Li, J., Su, X., Zhang, L., Zhang, Z., & Dong, J. 2019. Diterpenoid

compounds from *Wedelia trilobata* induce resistance to Tomato spotted wilt virus via the JA signal pathway in tobacco plants. *Sci Rep*, 9(1): 2763.



*This page is intentionally
left blank.*