



Статья

Монтмориллонитовая наноглина и состав с сатурейей Эфирное масло Монтаны как средство для лечения ксантомонады euvesicatoria Нагрузка на Solanum lycopersicum

Паулу Р. Оливейра-Пинту ^{1,2}, Нуну Марис-Понте ^{1,2,*}, Ренато Л. Хиль ^{3,4}, Эдите Кунья ^{3,4} , Селия Г. Аморим ^{3,4} , Мария CBSM Черногория ^{1,2,3,4} , Мануэль Фернандес-Феррейра ^{1,5,6}, Роуз МОФ Соуза ^{5,6} , Консейсан Сантуш ^{1,2,*}



Цитирование: Оливейра-Пинто, РР;
Марис-Понте, Н.; Гил, РЛ; Кунья, Э.;

Аморим, КГ; Черногория,
МКБСМ; Фернандес-Феррейра, М.;

Соуза, РМОФ; Сантос, К.
Монтмориллонитовая наноглина и
Формула с Satureja Montana
Эфирное масло как средство облегчения
Xanthomonas euvesicatoria Нагрузка на

Паслен ликоперсикум. Прил. Нано
2022, 3, 126–142. <https://doi.org/10.3390/applnano3030009>

Академические редакторы: Энтони Уильям
Коулман и Маттиа Рапа

Поступила: 9 мая 2022 г.

Принято: 28 июня 2022 г.

Опубликовано: 4 июля 2022 г.

Примечание издателя: MDPI остается нейтральным
в отношении юрисдикционных претензий в
опубликованные карты и институциональная принадлежность
ации.



Копирайт: © 2022 авторов.

Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария.

Эта статья находится в открытом доступе.
распространяется на условиях и
условия Creative Commons

Лицензия с указанием авторства (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Кафедра биологии, факультет естественных наук Университета Порту (FCUP), Руа Кампу Алегре, 4169-007 Порту, Португалия; paulopinto@fc.up.pt (ПРО-П.); manuel.ferreira@fc.up.pt (ПН-Ф.)
 - ² LAQV-REQUIMTE, Факультет естественных наук Университета Порту (FCUP), Руа Кампо Алегре, 4169-007 Порту, Португалия
 - ³ Кафедра химических наук, фармацевтический факультет Университета Порту (FFUP), Руа Хорхе де Витербо Феррейра 228, 4050-313 Порту, Португалия; renatogil19@gmail.com (РЛГ); ecunha@ff.up.pt (ЕС); camorim@ff.up.pt (СГА); mcbranco@ff.up.pt (МКБСММ)
 - ⁴ LAQV-REQUIMTE, Фармацевтический факультет Университета Порту (FFUP), Руа Хорхе де Витербо Феррейра 228, 4050-313 Порту, Португалия
 - ⁵ GreenUPorto & Inov4Agro, Факультет естественных наук Университета Порту (FCUP), Руа Кампо Алегре, 4169-007 Порту, Португалия; rose.sousa@fc.up.pt
 - ⁶ CITAB & Inov4Agro, Университет Трас-уш-Монтес и Альто-Дору (UTAD), 5000-801 Вила-Реал, Португалия
- * Переписка: nuno.ponte@fc.up.pt (НМ-П.); csantos@fc.up.pt (С)

Реферат: Бактериальная пятнистость (БП) томата (*S. lycopersicum*), вызываемая *Xanthomonas* spp., а именно *X. euvesicatoria* (Хеу) представляет собой одну из основных угроз для производства этой культуры во всем мире. Разработка новых решений биоконтроля против этого заболевания позволит разработать стратегии управления заболеванием. меньше на основе соединений Си. Наноглины, такие как монтмориллонит (NMT), исследуются на предмет их антимикробной активности или в качестве средств доставки/стабилизаторов органических соединений, таких как эфирные масла (ЭМ), которые также обладают антимикробной активностью в отношении патогенов растений. Эта работа направлена чтобы оценить, как применение только NMT или включения ЭО *S. montana* на хозяев, инфицированных Хеу (вар. Oxheart) влияет на окислительно-восстановительный статус побегов и механизмы антиоксидантной защиты. Побег *in vitro*, выращенные на среде Мурасиге и Скуга были разделены на две группы: инфицированные Ксеу и неинфицированные (контроль). стреляет. Затем побеги каждой группы обрабатывали NMT, *S. montana* EO, EO-NMT. Результаты показывают, что NMT удалось снизить количество бактерий Хеу, одновременно уменьшив выработку АФК и сохранив уровни транскриптов защитных генов близки к контрольным. При применении к неинфицированным побегов, обработка вызвала выработку АФК и активировала фенилпропаноид и гормональный путь, что позволяет предположить, что они действуют как защитные элиситоры. В глобальном масштабе результаты показывают, что NMT имеет потенциал для интеграции стратегий управления BS благодаря своей противомикробной активности и что ЭО и/или наноглины могут быть успешно использованы в качестве новых стратегий профилактики заболеваний, поскольку они усиливают защиту здоровых побегов, тем самым потенциально ограничивая распространение патогена.

Ключевые слова: Сатурейя Монтана; наноглина; Паслен ликоперсикум; бактериальное пятно; окислительный стресс; антимикробные натуральные продукты; фенилпропаноидный путь; гормональные пути

1. Введение

В настоящее время борьба с фитопатогенами в основном опирается на бактерициды на основе меди. и антибиотики, и хотя это доступные и простые в использовании препараты широкого спектра действия [1,2], постоянное применение этих стратегий привело к появлению устойчивых бактериальных штаммов [3]. Кроме того, директивы Европейского Союза запрещают использование антибиотиков для борьбы с фитопатогенами и способствовать сокращению использования меди и ее

замена естественными и устойчивыми альтернативами. Наноматериалы и наноструктуры, такие как наноглина монтмориллонит (NMT), находятся под наблюдением из-за их антимикробной активности и способности выступать в качестве носителей для противомикробных продуктов. Кроме того, другие неорганические глины (например, каолин) оказались в центре внимания из-за их способности включать противомикробные вещества, одновременно снижая фитотоксичность этих соединений и улучшая их антибактериальную активность [4]. Однако исследования влияния таких глин на патосистему редки.

Наноглины представляют собой неорганические пористые материалы, представляющие большой интерес из-за их способности включать в себя органические соединения, а именно эфирные масла (ЭМ), и контролировать высвобождение [5], при этом НМТ является одним из наиболее перспективных способов доставки ЭМ. НМТ представляет собой слоистый силикатный минерал, который состоит из алюминия и кремнезема в слоистой структуре, что обеспечивает большую площадь поверхности, что делает его идеальным для внедрения ЭО между слоями алюминия и кремнезема [5]. Другие исследования показали, что активные соединения ЭО и НМТ образуют водородные связи. Более того, гидрофобные взаимодействия также важны для включения ЭО в НМТ; эту гидрофобность можно изменить, добавляя в смесь поверхностно-активные вещества, такие как Tween20®, увеличивая пространство между слоями и облегчая интеркаляцию гидрофобных молекул между этими слоями (например, компонентов ЭО) [6]. Эти наноглины в природе широко распространены, доступны по цене и обычно считаются нетоксичными [7]. Они также могут повысить стабильность и срок хранения некоторых активных соединений и улучшить противомикробную активность эфирных масел, которые будут использоваться в агропищевой промышленности [8–10]. Их антимикробная активность в сочетании со способностью действовать в качестве переносчиков других биологически активных соединений делает НМТ выдающимся кандидатом для использования в сельском хозяйстве, а именно против фитопатогенов [11,12]. Однако их взаимодействие с сельскохозяйственными культурами и механизмы защиты растений еще не изучены.

ЭМ представляют собой высококонцентрированные смеси летучих соединений с низкой молекулярной массой, экстрагированные из нескольких частей растений (т.е. стеблей, листьев, семян, плодов и цветов) [13,14]. Некоторые из этих эфирных масел обладают хорошо изученными антимикробными свойствами, главным образом благодаря наличию производных фенилпропена (например, эвгенола, метилэвгенола, анетхола, эстрагола) и терпеноидов (например, лимонена, линалоола, карвакдиена). Антимикробная активность этих растительных продуктов оценивалась главным образом в отношении болезней пищевого происхождения [17–19]. Недавние исследования также показали, что ЭМ обладают антимикробной активностью в отношении фитопатогенов, а именно *Xanthomonas* spp. [20,21]. Лишь немногие из ЭО были протестированы против штаммов *Xanthomonas*, вызывающих бактериальную пятнистую болезнь (BS). Например, ЭМ из рода *Satureja*, а именно *S. spigera* и *S. hortensis* [22,23], продемонстрировали антимикробный потенциал против этих бактериальных патогенов. Таким образом, следует оценить антимикробный потенциал других видов *Satureja* с высоким содержанием терпенов и фенолов (например, *S. montana*) против *Xanthomonas* spp., вызывающих BS. Например, *S. montana* (зимний чабер) очень богат ЭМ [24], которые в основном состоят из терпеноидов (т.е. карвакрола, линалоола и тимолола) и обладают антимикробной активностью в отношении бактериальных патогенов (например, *Staphylococcus aureus*) [25].

Несмотря на весь потенциал ЭО выступать в качестве жизнеспособной альтернативы традиционным методам борьбы с патогенами, их применение все еще требует некоторых улучшений, в основном в отношении летучести некоторых соединений ЭО [26]. Недавно некоторые носители или системы доставки (например, нанокомпозиты) продемонстрировали снижение улетучивания ЭО, одновременно увеличивая его растворимость в водных растворителях и улучшая антимикробную активность [26,27].

Некоторые другие многообещающие кандидаты, такие как наноглины, могут выступать в качестве средств доставки ЭО [28].

Xanthomonas — род бактерий, поражающий широкий спектр сельскохозяйственных культур и дикорастущих растений и вызывающий заболевания, вызывающие значительные экономические потери [29]. Помидор (*Solanum lycopersicum* L.), одна из важнейших овощных культур в мире (FAOSTAT, 2019), повсеместно находится под угрозой бактериальных заболеваний, среди которых бактериальная пятнистость томатов [30]. Это заболевание вызывают четыре вида ксантомонад (*Xanthomonas euvesicatoria*; *X. vesicatoria*; *X. perforans*; *X. gardneri*) [31]. Среди них *X. perforans* и *X. gardneri* вызывают заболевание только томатов, тогда как *X. euvesicatoria* (Хеу) и *X. vesicatoria* поражают другие культуры (например, перец) [32]. БС поражает надземную часть растения (листья и стебли).

появление темных пятен, пожелтение листьев, в конечном итоге происходит дефолиация и на плодах появляются поражения [33,34]. Сообщалось, что штаммы *Xanthomonas*, выделенные из нескольких сельскохозяйственных культур (например, *Phaseolus vulgaris* и *Capsicum annuum*), обладают устойчивостью к нескольким антибиотикам и металлам (включая Cu) [35]. Следовательно, крайне важно найти новые естественные меры борьбы с этим видом фитопатогена.

Таким образом, эта работа направлена на объяснение эффектов NMT и EO-NMT *S. montana* после 3 дней применения на побегах томатов *in vitro*, инокулированных Хеи, на молекулярном и физиологическом уровнях. Это исследование дает новые знания о средствах составов NMT и EO-NMT в тканях томата и их антимикробной эффективности против Хеи при нанесении на листья, что в конечном итоге проливает свет на его потенциальное применение в качестве инструмента борьбы с болезнями в условиях растений. Эти данные будут способствовать оценке потенциала наноглины и ее составов в качестве зеленой, экологически чистой альтернативы управлению Хеи в томатах. Эта работа также проясняет потенциальное использование NMT в качестве противомикробного или ЭО-нанонесителя.

2. Материалы и методы

2.1. Эфирное масло и приготовление рецептуры

Сертифицированное органическое эфирное масло *S. montana* было приобретено у Florihana Distillerie (Косолс, Франция), его плотность при -20 °C составляла 1,02 г/см³. Простую эмульсию ЭМ-вода готовили путем смешивания ЭО *S. montana* (3,92 мкл) с Tween20® (3,63 мкл) до конечной концентрации 0,4 мг/мл и конечного объема 10 мл. Используемая концентрация была выбрана на основе наших предыдущих исследований (неопубликованных), основанных на минимальной бактерицидной концентрации (МБК), которая была той же самой концентрацией, которая использовалась здесь. Для эмульсии ЭО-вода медленно добавляли стерильную воду MilliQ при встряхивании со скоростью 3200 об/мин (VWR, Раднор, Пенсильвания, США). В рецептуру добавляли монтмориллонит (NMT) до конечной концентрации 1% (мас./об.) (0,1 г) и перемешивали в течение 2 минут при 3200 об/мин (VWR, Раднор, Пенсильвания, США) с конечным объемом 10 л. мл. Наконец, к препарату были применены ультразвуковые волны с использованием ультразвукового разрушителя клеток, оснащенного микронаконечником (Microson™) (10 циклов по 5 с с паузой 10 с между циклами при мощности 10 Вт).

2.2. Культура побегов, прививка и обработка

Семена томатов (*S. lycopersicum* var. *Oxheart*), приобретенные у коммерческого поставщика (Вильморен, Франция), подвергали поверхностной дезинфекции раствором 40% (по объему) коммерческого отбеливателя (Ravā o©) в течение 20 минут. Затем семена трижды промывали стерильной деионизированной водой и помещали в среду 1/2 MS (30 % (мас./об.) сахарозы; 0,7 % (мас./об.) агар; pH = 5,6–5,8) для прорастания. Через две недели после прорастания побеги переносили на среду MS (0,5 мг/л бензиладенина (BAP); 30% (мас./об.) сахарозы; 0,7% (мас./об.) агар; pH = 5,6–5,8) для пролиферации побегов. Инкубацию проводили в камере для выращивания растений при температуре 24 ± 0,5 °C, с максимальной интенсивностью фотосинтетического света 250 мкмоль м⁻² с при фотопериоде 16:8 ч (свет: темнота). Каждые две недели побеги использовали как источник новых побегов. Через три месяца побеги субкультивировали на среде MS без добавления BAP в течение 7 дней. Затем отбирали побеги длиной 10 см и случайным образом делили их на группы для индивидуальных обработок следующим образом: (A) неинфицированные (отрицательный контроль) – C; (B) инфицированные Хеи (положительный контроль) – X; (C) неинфицированные + обработанные *S. montana* EO–S; (D) инфицированный + обработанный *S. montana* EO–XS; E неинфицированный + обработанный препаратом – SNMT; (F) инфицированный + обработанный составом – XSNMT; (G) неинфицированные + обработанные наноглиной HMT – HMT; (H) инфицированный + обработанный наноглиной NMT–XNMT.

Эталонный штамм *X. euvesicatoria* LMG 905 был получен из коллекции бактерий BCCM/LMG (Гентский университет, Бельгия) и консервирован при -80 °C в 30% (по объему) глицерине в коллекции лаборатории MDE (FCUP, Португалия). Бактерии культивировали в среде дрожжевой экстракт-декстроза-СаСО₃ (YDC). Для заражения побеги погружали (на 30 с) в суспензию *X. euvesicatoria* LMG 905 в PBS (фосфатно-солевой буфер, pH = 7) с оптической плотностью при 600 нм (OD₆₀₀) 0,1 ЕД. После этого побеги подвергали заражению, переносят в новые стерильные коробки с MS-агаровой средой. Через три дня после заражения лечение было проведено.

осуществляют путем опрыскивания адаксиальной страницы листьев 1 мл обрабатывающего раствора в соответствии с условиями, описанными выше. Стерильная вода MilliQ использовалась в качестве положительного (инфицированного) и отрицательного контролей. Через сутки после обработки побеги опудрили в жидком азоте и хранили при температуре -80°C для дальнейшего анализа. Было проведено два временных независимых опыта по 10 побегов в каждом условии.

2.3. Количественная оценка *X. euvesicatoria*.

X. euvesicatoria. Количественную оценку *X. euvesicatoria* проводили с помощью RT-PCR с использованием системы обнаружения ПЦР в реальном времени CFX96™ (BioRad, Hercules, CA, USA) и следуя методу, описанному Moretti et al. [36] со следующими праймерами (xeu2.4–CTGGGAAACTCATTCGCAGT, Forward; xeu2.5–TTGTGGCGCTCTTATTCCT, Reverse) с размером конечного продукта 208 пар оснований (п.н.). Для каждой реакции 10 мкл NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2×), ROX plus (NZYTech™, Лиссабон, Португалия), 0,8 мкл прямого и обратного праймера (10 мМ), 0,4 мкл обработанной DEPC H₂O и 8 мкл Использовали ДНК-матрицу. Для амплификации использовали следующие условия: 95 °C в течение 1 мин, затем 40 циклов по 5 с при 95 °C и 15 с при 60 °C. Анализ кривой плавления проводили, начиная с 65 °C и заканчивая 95 °C с шагом 0,5 °C на каждые 5 с цикла. Реакции проводили в трех экземплярах и параллельно со стандартной кривой, в которой использовались стандартные разведения от 10⁸ до 10¹ клеток Xeu LMG 905. Эффективность праймеров оценивали с использованием ПЦР- майнера в реальном времени, как описано Чжао и Фернандом [37]. Эти расчетные эффективности были использованы для получения скорректированных *S_q* для каждой кривой амплификации. Для определения количества Xeu, присутствующего в побегах, использовали стандартную кривую, поясненную выше ($R^2 = 0,994$).

2.4. Содержание активных форм

кислорода 2.4.1. Количественное определение

перекиси водорода (H₂O₂) Для количественного определения перекиси водорода используется спектрофотометрический метод, описанный Алексеевой и др. [38]. Вкратце, 50 мг порошкообразной ткани мацерировали в 2 мл 0,1% ТХУ (трихлоруксусной кислоты) (мас./об.) с использованием мельницы-смесителя (Retsch MM400, Наап, Германия) с частотой встряхивания 30 с-1 в холодные условия. Затем гомогенат центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин при 4 °C, затем собирали 500 мкл надосадочной жидкости и смешивали с 500 мкл фосфатного буфера 0,1 М (pH = 7) и 1000 мкл йодида калия (KI) 1 М. Смесь гомогенизировали с помощью вихревой мешалки (VWR, Раднор, Пенсильвания, США) в течение 5 с при 3200 об/мин и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин. Поглощение образцов регистрировали при $\lambda = 390$ нм с помощью спектрофотометра для считывания планшетов Multiskan™ GO (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США). Стандартная кривая была построена с известными концентрациями H₂O₂ в диапазоне от 0 до 10 мМ. Результаты были представлены в ммоль H₂O₂ на г свежего веса (FW).

2.4.2. Количественная оценка супероксидного радикала

(O₂^{•-}) Для полуколичественного определения супероксидного радикала (O₂^{•-}) использовался метод, описанный Гаевской и Складовской [39], с модификациями, описанными Коста-Сантосом и др. [40]. Вкратце, образцы тканей (50 мг) были гомогенизированы в 2 мл экстракционного буфера (фосфатный буфер 0,01 М (pH = 7,8), 0,05% (мас./об.) NBT (нитросиний тетразолий), растворенный в 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксид) и 10 мМ азида натрия) и перемешивали в течение 30 с при 3200 об/мин (VWR, Рэднор, Пенсильвания, США). Смесь инкубировали в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре. Образцы центрифугировали при 13 000 g в течение 2 мин при 4 °C. После центрифугирования собирали 1,5 мл надосадочной жидкости и инкубировали при 85 °C в течение 10 мин в нагревательном блоке (VWR, Рэднор, Пенсильвания, США). Затем образцы помещали при 4 °C на 10 минут, чтобы остановить реакцию. Поглощение (Abs) регистрировали при 580 нм с использованием микропланшетного спектрофотометра Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США). Результаты были представлены как Abs на г FW.

Ген	Праймер	Последовательность	Отжиг Температура (°С)	Размер товара (б.п.)	Ссылка
уби	Вперед	GGACGGACGTACTCTAGCTGAT	60	134	[42]
	Обеспечить регресс	АГКТТТСГАККТСААГГТА			
ванна	Вперед	ААККТКАТТСАГГАГАТГТТТ	60	180	[42]
	Обеспечить регресс	ТСТГСТГАТГАТСТСТГГТАТТ			
критизо	Нападающий _	ТТГККТТГГТТТЦААГК	60	117	[43]
	Обеспечить регресс				
приятель5	Нападающий _	ТСССТТТССАССАСТТГТАГС	60	136	[43]
	Обеспечить регресс				
chs1	Вперед	АССААСААГГТГСТТТГСС	60	135	[44]
	Обеспечить регресс	ГАГАТТКАКТГГГТССАССГ			
аао	Вперед	ССАССААААААААТСАА	60	154	[45]
	Обеспечить регресс	ГТСТГАААТААТТСАГАСТГ			
опр3	Нападающий _		60	152	[46]
	Обратный	ТСАСТГССААСТГТГССТГСТТАС			
ако3	Нападающий _		60	104	[47]
	Обеспечить регресс	АТГТГТТТААТТАГСТАСТГТТГ			

Реакции RT-qPCR выполняли с использованием термоциклера CFX96 Touch™ (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США). Для каждой реакции 2,5 мкл общей кДНК первой цепи, 10 мкл NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x), ROX plus (NZYTech™, Лиссабон, Португалия), 0,8 мкл прямого и обратного праймера (10 мМ), и 5,9 мкл воды MilliQ.

Амплификации были стандартизированы как: 95 °С в течение 1 минуты с последующими 50 циклами по 5 с при 95 °С и 15 с при 60 °С. Анализ кривой плавления находился в диапазоне от 65 °С до 95 °С с шагом 0,5 °С за цикл длительностью 5 с.

Майнер ПЦР в реальном времени [34] использовался для расчета эффективности праймеров и определения значений C_q кривых амплификации.

2.7. Экстракция и количественная оценка гормонов

Экстракция фитогормонов 6-бензиламинопурина (BAP), абсцизовой кислоты (ABA), гиббереллиновой кислоты 3 (GA3), индолуксусной кислоты (IAA), жасмоновой кислоты (JA), метилжасмоната (MeJA) и салициловой кислоты (SA) проводили, как описано Van Meulebroek et al. [48].

Для этого 100 мг ткани гомогенизировали путем встряхивания в течение 2 минут при 3200 об/мин (VWR, Рэднор, Пенсильвания, США) с 1 мл холодного (-20 °С) буфера для экстракции, состоящего из 75% (об./об.) метанол, 20% (об./об.) муравьиной кислоты и 5% (об./об.) стерильной воды MilliQ. Затем образцы подвергали холодной экстракции в течение 12 часов при -20 °С. После экстракции гомогенаты центрифугировали (17 000 g в течение 5 мин при 4 °С), супернатант собирали и сохраняли при -80 °С.

С. Перед количественной оценкой 500 мкл супернатанта переносили в 30 кДа Amicon®.

Ультрацентрифужные фильтровальные блоки, которые центрифугировали в течение 10 мин при 17 000 g и температуре 4 °С. Перед количественным определением образцы собирали и фильтровали через шприцевой фильтр из ПТФЭ с размером пор 0,2 мкм.

Хроматографический анализ проводили в системе Shimadzu LC-20, оснащенной диодно-матричным детектором SPD-M20A (DAD) и шестипортовым внешним инжектором проб Rheodyne 7725. В качестве неподвижной фазы использовали обращенно-фазовую колонку Luna Omega Polar C18 (150 × 4,6 мм; 5 мкм, Phenomenex) с предколонкой (Luna Omega Polar C18 4 × 3,0 мм, Phenomenex). Элюирование проводили в градиентном режиме смесью 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты в сверхчистой воде и метаноле (60:40 (об./об.) для растворителя А и 40:60 (об./об.) для растворителя Б соответственно). Программа градиентного элюирования начиналась с 0% растворителя В в течение 9 мин. Затем содержание растворителя Б увеличивалось до 100% за 0,01 мин. С 9,01 до 22,0 мин вклад растворителя Б был постоянным. Через 22,0 мин исходные условия восстанавливались в течение 0,01 мин и поддерживались в течение 8,0 мин для обеспечения равновесия колонки. Скорость потока поддерживали на уровне 1,0 мл/мин, объем инъекции составлял 20 мкл, а колонку ЖХ поддерживали при контролируемой комнатной температуре (±2 °С). Обнаружение и количественную оценку пиков проводили с использованием программного обеспечения LabSolutions версии 5.60 SP2 (Shimadzu Corporation). Гибберелловую кислоту 3 (GA3), бензиладенин (BAP), индолуксусную кислоту (IAA), салициловую кислоту (SA), жасмоновую кислоту (JA) и метилжасмонат (MeJA) обнаруживали с использованием длины волны 206 нм, тогда как абсцизовую кислоту (АБК) определяли. обнаружен при 254 нм.

Предложенный метод ВЭЖХ-DAD прошел валидацию в соответствии с рекомендациями ICH по валидации аналитических методик [49]. Оценивались линейность и диапазон, пределы обнаружения (LOD) и количественного определения (LOQ), прецизионность и достоверность. Результаты выражали в нг каждого гормона на г FW. Подробная информация об экспериментальных процедурах и аналитических результатах включена в качестве дополнительного материала.

2.8. Статистический анализ.

Эксперимент проводили два раза в независимых анализах. В каждом независимом анализе для анализа каждого параметра использовали десять побегов на состояние/обработку. Сравнение вариантов лечения проводилось с использованием однофакторного теста ANOVA (Graphpad™ Prism 9, Сан-Диего, Калифорния, США). Для статистических сравнений использовался критерий сравнения Даннетта с доверительным интервалом 95%.

3.1. *X. euvesicatoria* Количественная оценка

Количественное определение возбудителя показало, что Kсеу присутствовал во всех привитых. Количественное определение возбудителя показало, что Kсеу присутствовал во всех привитых. Условия эксперимента. Результаты показали, что Kсеу была единственной экспериментальной средой, подходящей для посева. Результаты показали, что Kсеу является единственным методом лечения, способным снижать количества Хеу в побегах томата (154 раза) при по сравнению со всеми другими условиями (рис. 1). При использовании ЭО-водной эмульсии (XS) или фор- по сравнению со всеми остальными условиями (рис. 1). Когда эмульсия ЭО-вода (XS) или муляций (XSNMT), существенных различий не наблюдалось в составе Хеу (XSNMT), существенных различий не наблюдалось в Хеу количество по сравнению с контролем (X), через 24 часа после обработки. количество по сравнению с контролем (X), через 24 часа после обработки.

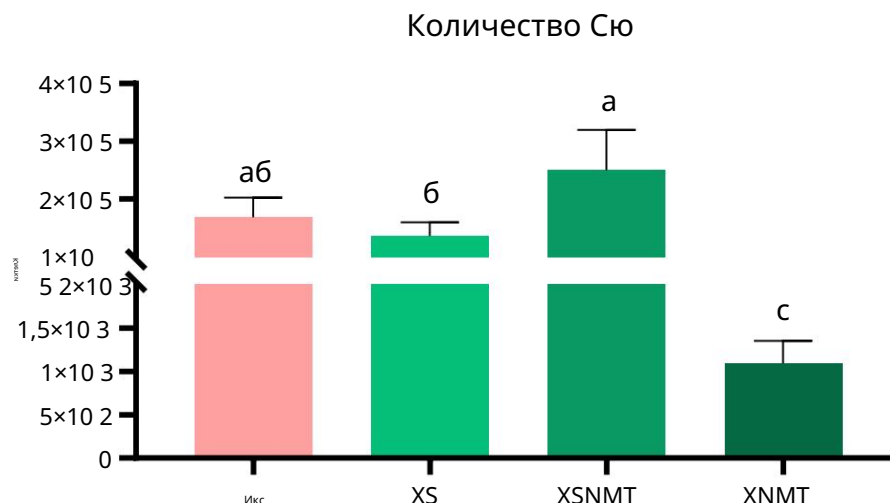


Рисунок 1. Количество *X. euvesicatoria* в инфицированных побегах *S. lycopersicum* по данным q-PCR. Ценности как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$). Средства, отмеченные одной и той же буквой, существенно не отличаются отравлено как среднее $\pm$ SD ($n = 3$). Средние, отмеченные одной и той же буквой, достоверно не различаются по критерию Даннета ($p < 0,05$). X: зараженные необработанные побеги; XS: обработанные зараженные побеги по критерию Даннета ($p < 0,05$). X: зараженные необработанные побеги; XS: инфицированные побеги, обработанные ЭМ *S. montana*; XSNMT: инфицированные побеги, обработанные составом *S. montana* EO + NMT; XNMT: *S. montana* EO; XSNMT: инфицированные побеги, обработанные составом *S. montana* EO + NMT; XNMT: инфицированные побеги, обработанные NMT.

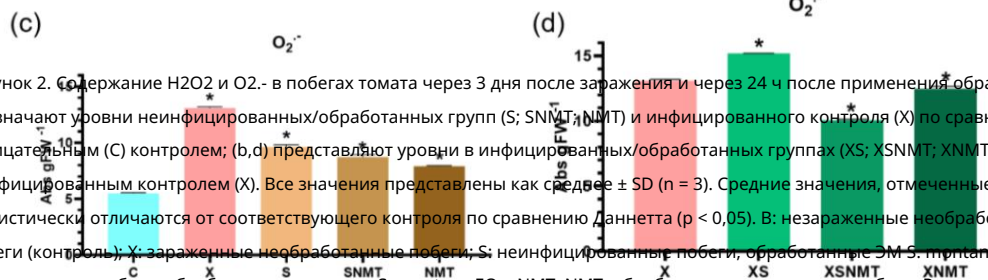
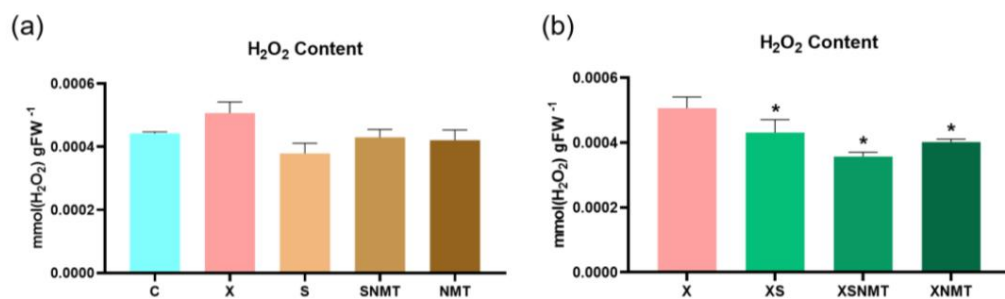
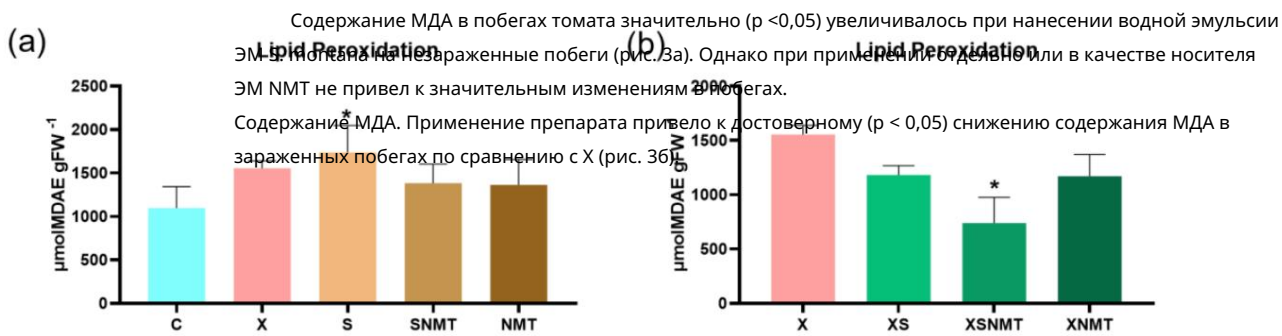


Рисунок 2. Содержание H₂O₂ и O₂⁻ в побегах томата через 3 дня после заражения и через 24 ч после применения обработок. (a, c) обозначают уровни неинфицированных/обработанных групп (S; SNMT) и инфицированного контроля (X) по сравнению с отрицательным (C) контролем; (b, d) представляют уровни в инфицированных/обработанных группах (XS; XSNT; XNMT) по сравнению с инфицированным контролем (X). Все значения представлены как среднее $\pm$ SD (n = 3). Средние значения, отмеченные звездочкой, статистически отличаются от соответствующего контроля по сравнению Даннетта (p < 0,05). В: незараженные необработанные побеги (контроль); X: зараженные необработанные побеги; S: неинфицированные побеги, обработанные SM S. tritirans; SNMT: незараженные побеги, обработанные составом S. montana EO + NMT; NMT: обработанные незараженные побеги. Рисунок 2. H₂O₂ и O₂⁻

[illegible]

содержание МДА в зараженных побегах по сравнению с Х (рис. 36).

3.3. Оценка перекисного окисления липидов путем количественного определения MDA

[illegible]

необработанные побеги (положительный контроль); S: неинфицированные побеги, обработанные ЭМ *S. montana*; SNMT: незараженные побеги, обработанные составом *S. montana* EO + NMT; HMT: неинфицированные побеги, обработанные HMT; XS: инфицированные побеги, обработанные ЭМ *S. montana*; XSNMT: инфицированные побеги, обработанные составом *S. montana* EO + NMT; XNMT: инфицированные побеги, обработанные HMT.

3.4. Анализ экспрессии генов

3.4. Анализ экспрессии генов

3.4.1: Фенилпропаноидный путь

Каротиноидный путь, а именно *crtiso*, значительно ($p < 0,05$) активировался в

Побеги, инфицированные *Xen* (X), по сравнению с неинфицированным контролем (C) (рис. 4а). Приложение каждой из трех обработок к зараженным побегам приводило к достоверному ($p < 0,05$), снижает регуляцию *crtiso* (рис. 4б). Что касается фенилпропаноидного пути, то применение ЭО-воды на незараженные побеги приводило к значительному ($p < 0,05$) увеличению регуляции *pal5* (рис. 4в). *Pal5* также значительно ($p < 0,05$) активировался в результате применения HMT (рис. 4д). Применение каждой из трех обработок к инфицированным *Xen* побегам (рис. 4е). Кроме того, *chs1* был индуцирован в побегах, инфицированных *Xen* (X), когда состав/наноглин применяли к незараженным побегам томата (рис. 4е). Нанесение ЭО-воды на незараженные побеги эмульсии на инфицированные *Xen* побеги (XS) приводила к значительному ($p < 0,05$) снижению регуляции *chs1* (рис. 4ф).

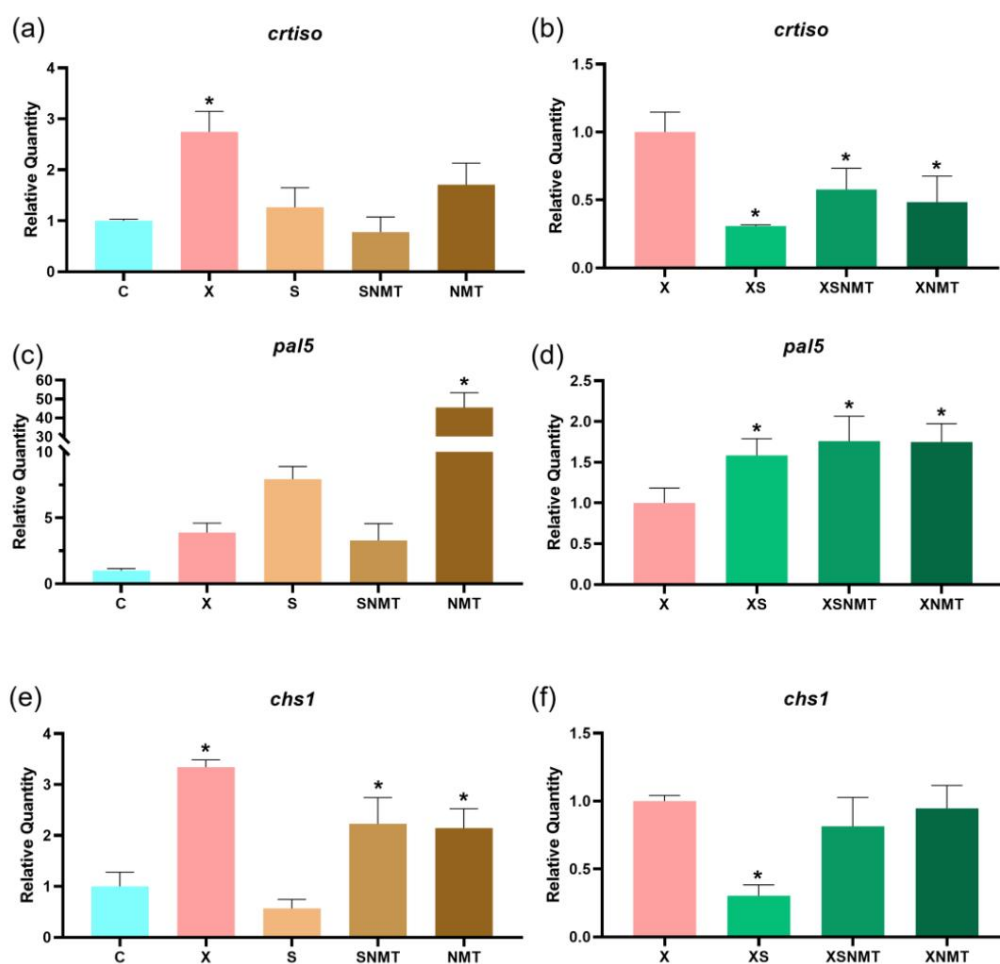
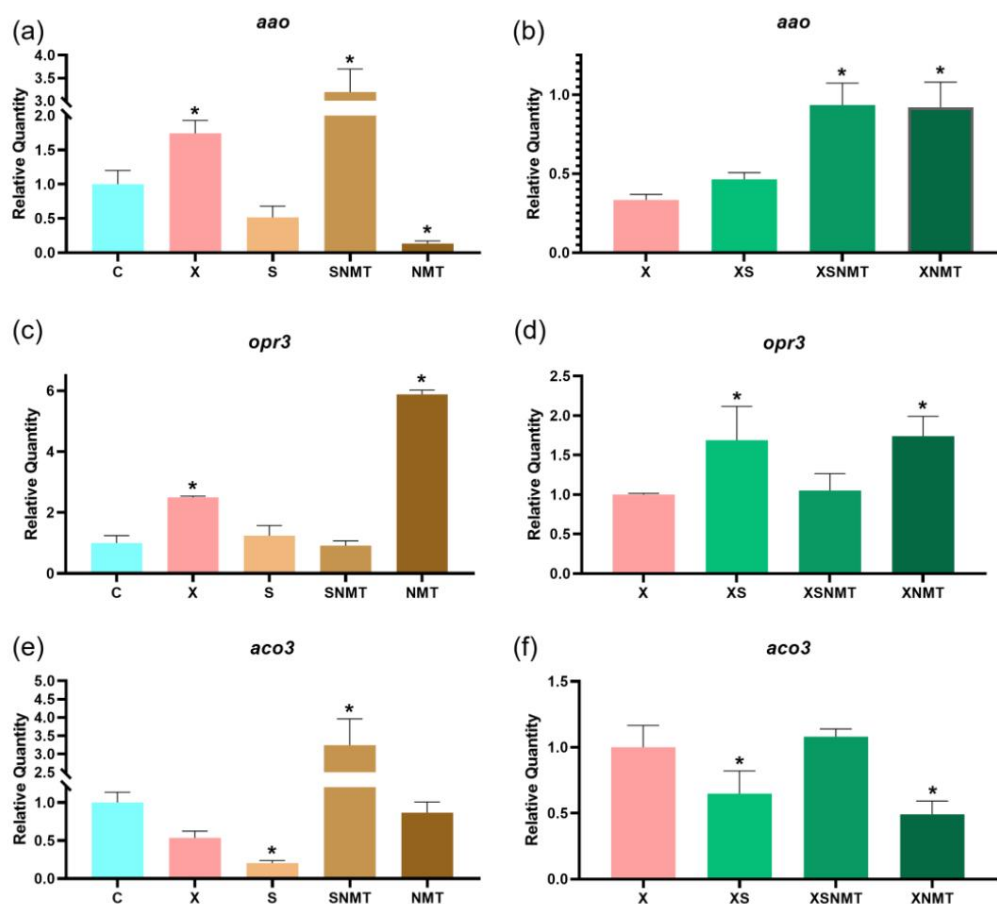


Рисунок 4. Уровни экспрессии генов, связанных с каротиноидным путем и фенилпропаноидным путем (*pal5* и *chs1*), в побегах томата, обработанных различными методами. (а) *crtiso* в незараженных побегах, обработанных ЭО-водой, составом *S. montana* EO + NMT, HMT или NMT. (б) *crtiso* в зараженных побегах, обработанных ЭО-водой, составом *S. montana* EO + NMT, HMT или NMT. (в) *pal5* в незараженных побегах, обработанных ЭО-водой, составом *S. montana* EO + NMT, HMT или NMT. (г) *pal5* в зараженных побегах, обработанных ЭО-водой, составом *S. montana* EO + NMT, HMT или NMT. (д) *chs1* в незараженных побегах, обработанных ЭО-водой, составом *S. montana* EO + NMT, HMT или NMT. (е) *chs1* в зараженных побегах, обработанных ЭО-водой, составом *S. montana* EO + NMT, HMT или NMT. (ф) *chs1* в зараженных побегах, обработанных ЭО-водой, составом *S. montana* EO + NMT, HMT или NMT. Все значения являются средними значениями $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$). Означает, отмеченное знаком «*» статистически различаются в соответствии с представлением. Все значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$). Средние, отмеченные знаком «*», статистически различаются. Сравнительный тест Даннета ($p < 0,05$). C: незараженные необработанные побеги; X: зараженные необработанные побеги; S: по критерию сравнения Даннета ($p < 0,05$). C: незараженные необработанные побеги; X: зараженные необработанные побеги; S: неинфицированные побеги, обработанные ЭМ *S. montana*; CHMT: обработка незараженных побегов с составом *S. montana* EO + NMT; HMT: неинфицированные побеги, обработанные HMT; XS: зараженный побег, обработанный ЭМ *S. montana*; XSNMT: инфицированные побеги, обработанные *S. montana* EO + NMT. формулировка; XNMT: инфицированные побеги, обработанные NMT.

3.4.2. Гормональные пути

Побег, инфицированные Ксесу, по сравнению с отрицательным контролем ($p < 0,05$). Применение фор-Ксесу-инфицированных побегов по сравнению с отрицательным контролем ($p < 0,05$). Приложение Мульчи на незараженные побеги также приводило к значительному ($p < 0,05$) усилению активности аао. Введение препарата в неинфицированные побеги также приводило к значительному ($p < 0,05$) повышению регуляции. Напротив, NMT подавлял активность этого гена в неинфицированных побегах *S. lycopersicum* аао. Напротив, NMT подавлял активность этого гена у неинфицированных *S. lycopersicum*. (Рисунок 5а). Как наноглина, так и состав привели к усилению регуляции АОО в побегах Хеу- (рис. 5а). И наноглина, и состав привели к усилению активности АОО в организме. зараженные побеги (рис. 5б). В побегах, инфицированных Хеу, уровень *org3* был повышен по сравнению с побегами, инфицированными Хеу (рис. 5б). В побегах, инфицированных Хеу, уровень *org3* был повышен, с отрицательным контролем (С). Приложение NMT также повышало уровень транскрипта *org3* по сравнению с отрицательным контролем (С). Приложение NMT также повышало уровень *org3* при применении (р < 0,05) (рис. 5в). Нанесение эмульсии ЭО-вода и состава на транскрипты (р < 0,05) (рис. 5с). Побег, инфицированные Хеу, приводили к значительному ($p < 0,05$) повышению регуляции *org3* (рис. 5б). Наконец, инфицированные побеги Хеу приводили к значительному ($p < 0,05$) повышению уровня экспрессии *org3* (рис. 5б). При применении препарата и подавлялся ЭО-водой. Наконец, уровень *асо3* повышался эмульсия в неинфицированных группах по сравнению с отрицательным контролем (С) (рис. 5е). Приложение водной эмульсии ЭО-С. montana и наноглины NMT к инфицированным Хеу. Регуляция транскрипта *асо3* также активировала *org3* (рис. 5д).

[illegible]

формулировка; HMT: неинфицированные побеги, обработанные HMT; XS: зараженные побеги, обработанные Сатурейей Монтана ЭО; XSNMT: инфицированные побеги, обработанные составом *Satureja montana* EO + NMT; XHMT: зараженные побеги обрабатывали HMT.

3.5. Количественное

определение гормонов. Валидированный метод ВЭЖХ-DAD был применен для определения профиля фитогормонов в побегах томата, подвергнутых различным условиям. В этом контексте уровни ИУК неинфицированных побегов, обработанных препаратом ЭО + НМТ, значительно увеличились ($p < 0,05$) (рис. 6а). Применение препарата НМТ и ЭО + НМТ к инфицированным побегам томата также привело к значительному увеличению содержания ИУК (рис. 6б). Что касается GA3, ABA, JA и MeJA, то в образцах не наблюдалось существенных изменений по сравнению с соответствующими контролями (С и X) (рис. 6с-ж). Также оценивались уровни БАТ и СА, хотя они были ниже минимального порога для количественного определения.

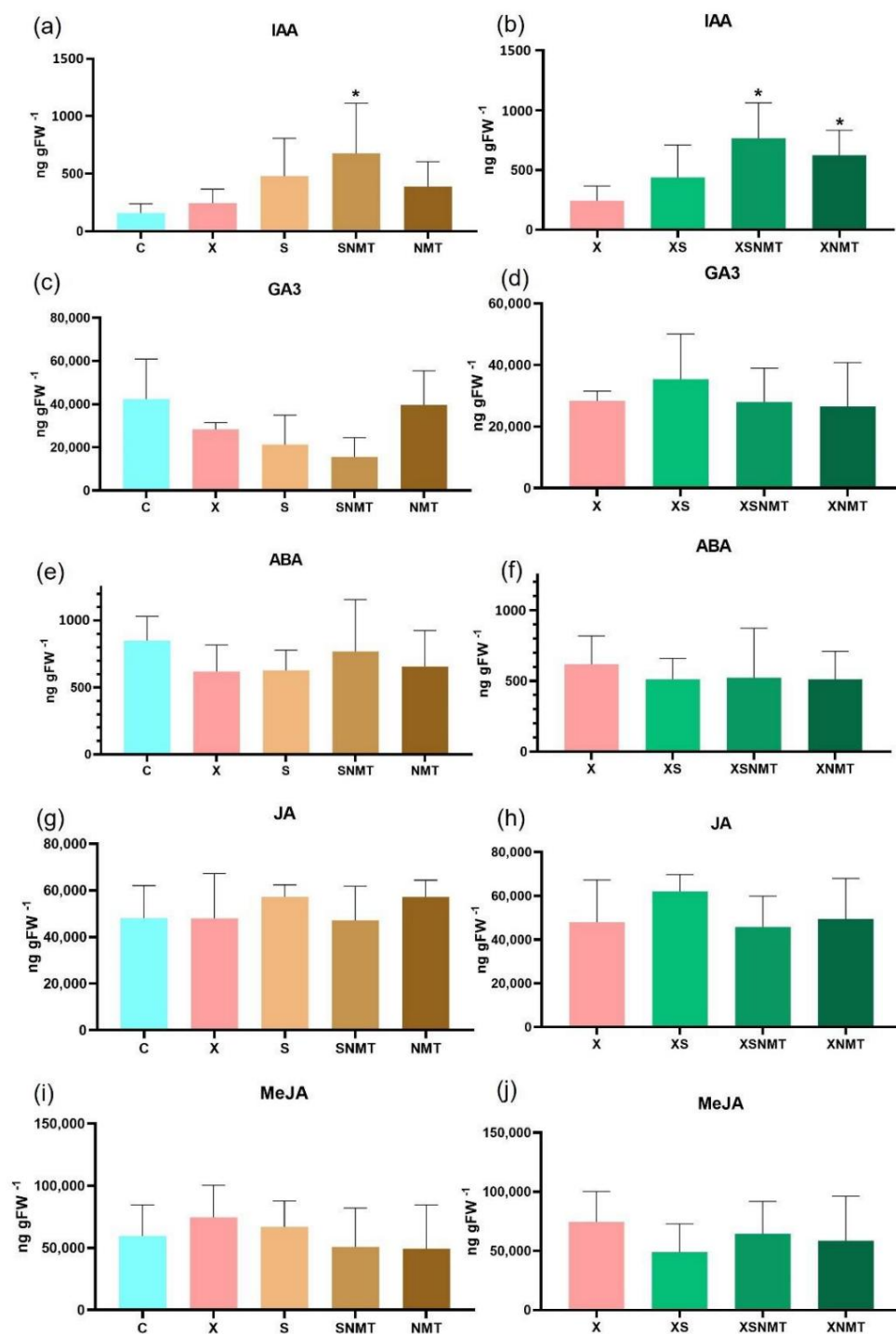


Рисунок 6. Количественное определение фитогормонов ИУК (а, б); GA3 (в, г); ABA (д, е); JA (г, з); и MeJA (и, j) по

ВЭЖХ-ДАД. (a,c,e,g,i) представляют уровни в неинфицированных/обработанных группах и положительном контроле (X) по сравнению с отрицательным контролем (C); (b,d,f,h,j) обозначают уровни инфицированных/обработанных групп по сравнению с положительным контролем (X). Все значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$). Средние значения, отмеченные знаком «*», статистически отличаются от соответствующего контроля по критерию сравнения Даннетта ($p < 0,05$). C: незараженные необработанные побеги; X: зараженные необработанные побеги; S: неинфицированные побеги, обработанные ЭМ *S. montana*; SNMT: неинфицированные побеги, обработанные составом *S. montana* EO + NMT; HMT: неинфицированные побеги, обработанные HMT; XS: инфицированные побеги, обработанные ЭМ *S. montana*; XSNMT: инфицированные побеги, обработанные составом *S. montana* EO + NMT; XNMT: инфицированные побеги, обработанные HMT.

4. Дискуссия

Современные стратегии борьбы с болезнью BS томатов по-прежнему основаны на соединениях на основе меди. Появление Cu-резистентных *Xanthomonas* в полевых условиях [50] ускорило поиск жизнеспособных альтернатив. Более того, политика ЕС в области биологического сельского хозяйства склоняется к замене меди экологически безопасными, биоразлагаемыми соединениями. Таким образом, HMT и составы с другими натуральными противомикробными продуктами становятся многообещающими инструментами для интеграции стратегий лечения заболеваний благодаря их противомикробным свойствам [12]. Однако существуют некоторые трудности при применении этих соединений в полевых условиях, в частности в случае ЭМ, из-за их быстрой деградации и высокой летучести органической фазы [51].

ЭО других видов *Satureja* уже были протестированы против других видов *Xanthomonas*. [23]. Наши результаты показывают, что через 24 часа после инокуляции Хеу ЭО *S. montana* в водной эмульсии или интегрированный в NMT в виде препарата не был способен снижать количество Хеу в побегах томата; это может быть связано с контролируемой скоростью высвобождения ЭО с помощью NMT, что может оказывать существенное влияние на кратковременную антимикробную активность этих материалов [52]. Однако Оливейра-Пинто и др. [12] продемонстрировали противомикробные свойства этого состава EO-NMT в долгосрочном исследовании. Интересно, что только NMT был способен значительно снизить плотность клеток Хеу, что соответствует сообщению Oliveira-Pinto et al. [12] относительно антимикробного потенциала NMT против Хеу и подтверждает потенциал этой наноглины в качестве средства борьбы с Хеу в сельском хозяйстве (рис. 1). Антимикробный потенциал наноглины HMT в литературе обычно связывают с их сочетанием с органическими соединениями или с металлами (например, [53,54]). В сельском хозяйстве HMT в основном исследовался как средство доставки органических соединений, а именно ЭО [55,56]. Однако их потенциал как противомикробных агентов, способных интегрировать стратегии борьбы с болезнями растений, остается малоизученным. Наши данные ясно показывают, что эти минеральные соединения являются многообещающими продуктами, действующими самостоятельно (или в качестве носителей) для контроля BS.

Наши данные также показывают, что NMT и препарат обладают кратковременной антиоксидантной активностью в побегах, инфицированных Хеу, уменьшая как H_2O_2 , так и супероксидные радикалы (рис. 2). ЭМ *S. montana* также снижали уровень H_2O_2 , причем эти результаты согласуются с антиоксидантной активностью, приписываемой ЭМ *S. montana* Милади и др. [57]. Такое снижение содержания АФК в инфицированных побегах в конечном итоге привело к уменьшению окислительного повреждения липидов за счет снижения содержания МДА в клетках томата (рис. 3). Интересно, что применение обработок к незараженным побегам томата привело к увеличению содержания супероксида (рис. 2), что, в свою очередь, привело к более высокому уровню повреждения липидов (рис. 3). Это говорит о том, что при применении к здоровым побегам состав NMT, EO + NMT и только EO *S. montana* могут действовать как защитные элиситоры, запуская защитные реакции растений против бактериальных патогенов. Лукас и др. [58] сообщили, что ЭМ других видов (например, цитронеллы, гвоздики, корицы, лемонграсса, эвкалипта, тимьяна и чая) могут действовать как защитные элиситоры у растений. Несмотря на то, что молекулярные механизмы действия этих эфирных масел остаются неясными, здесь показано, что происходит активация окислительных путей. Кроме того, увеличение содержания АФК не приводило к повреждению липидов при применении состава NMT или ЭО + NMT к неинфицированным побегам (рис. 3). Эти данные показывают, что

NMT играет защитную роль против повреждений липидов, вызванных перепроизводством АФК. Необходимы дальнейшие исследования для изучения сигнальных и метаболических путей, запускаемых в ответ на применение NMT или ЭО, а также их потенциала в качестве средств снижения стресса и профилактических продуктов в системах производства растений.

Что касается регуляции фенилпропаноидного пути, то в побегах, инфицированных Хеи, наблюдалось усиление *chs1* (X). Аналогичный ответ наблюдался при применении препарата ЭО + NMT к неинфицированным побегам. NMT активировал оба гена этого пути (рис. 4), указывая на ключевую роль фенилпропаноидного пути в инфекции *Xanthomonas*, как сообщалось ранее Du et al. [59] и Оливейра-Пинто и др. [43] и подтверждают гипотезу о том, что при применении к неинфицированным хозяевам NMT действует как защитный элиситор, запуская иммунную защиту растений.

Заражение Хеи и применение препарата способствовали увеличению транскриптов *aaо*, в то время как NMT уменьшал те же транскрипты (рис. 5). Несмотря на такое подавление *aaо*, количественная оценка АБК не выявила изменений в содержании АБК на неинфицированных побегах (рис. 6в), таким образом, подавление *aaо* было недостаточным для подавления всего пути, что привело к снижению АБК. Однако при применении к инфицированным побегам обработка была неспособна немедленно снизить уровни АО и, следовательно, не подавляла путь АБК, что подтверждается количественным анализом ВЭЖХ (рис. 6д). Растения в условиях биотического стресса продуцируют этилен и ЖК в случае некроза [60]. Результаты показывают, что наноглина активирует *opr3* (путь JA), который имеет основополагающее значение для подавления бактериальной инфекции. Однако увеличение количества транскриптов, связанных с JA, не сопровождалось накоплением JA или его конъюгата метилового эфира (MeJA) в побегах (рис. 6е,г), что позволяет предположить наличие некоторого посттрансляционного механизма, регулирующего выработку JA. Более того, уровни GA3 (одной из наиболее биоактивных форм гиббереллиновой кислоты) не претерпели каких-либо существенных изменений в результате применения лечения или присутствия патогенов (рис. 6и,ж). Отсутствие ответа на GA может быть связано с тем, что этот гормон играет более значительную роль против некротрофных патогенов (например, *Erwinia amylovora*), опосредуя ответ JA/ET [61].

Накопление транскриптов *opr3* в результате обработки инфицированных побегов может указывать на то, что увеличение пути ABA (рис. 5б) недостаточно для подавления роли JA и облегчения инфекции *Xanthomonas*, как сообщает Long et al. [62]. Этилен играет ключевую роль в защите растений от бактериальных патогенов, его уровень повышается, когда растения находятся в состоянии биотического стресса [63], а низкие уровни этилена, как известно, повышают восприимчивость *Arabidopsis thaliana* к *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* [64]. Более того, Гуан и др. [65] сообщили, что мутантные линии *A. thaliana* с дефицитом продукции ACC также демонстрируют повышенную восприимчивость к инфекции *Pseudomonas syringae*. Известно, что ИУК стимулирует выработку этилена в тканях растений, способствуя синтезу как ACC, так и ACC-оксидазы [66]. Таким образом, значительное увеличение уровней IAA, которое наблюдалось при применении ЭО-NMT к неинфицированным побегам (рис. 6а) и при применении только ЭО-NMT или NMT к инфицированным побегам (рис. 6б), можно объяснить активацией пути синтеза этилена посредством ACC и ACC-оксидазы. Однако транскрипты *aco3* активировались только при применении препарата на неинфицированных побегах (рис. 5с), что позволяет предположить, что другие транскрипты пути биосинтеза этилена (*aco1*) могут играть более важную роль в синтезе этилена в ответ на применение ЭО, который в настоящее время находится на стадии изучения.

5. Выводы

В заключение, NMT значительно снижает бактериальную инфекцию в побегах томатов, одновременно снижая уровни экспрессии генов, связанных с защитой, снижая выработку АФК и защищая томаты от окислительного повреждения, тем самым способствуя улучшению общего состояния здоровья побегов. Более того, другие обработки (состав/эмульсия ЭМ-вода) могут действовать как защитные элиситоры, усиливая выработку АФК и активируя гормональные и фенилпропаноидные пути в неинфицированных побегах. В целом, наши результаты показывают, что NMT является многообещающим инструментом для краткосрочного контроля Хеи в томатах, в то время

Составы ЭО и ЭО + HMT *S. montana* могут действовать лучше в качестве защитных средств, и, таким образом, их роль в предотвращении заболеваний должна быть лучше изучена. Необходимы дальнейшие исследования на растениях, чтобы правильно оценить потенциал этих продуктов для полевого применения и прояснить потенциальное использование этих соединений в качестве защитных средств.

Дополнительные материалы. Следующую вспомогательную информацию можно загрузить по адресу: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/appnano3030009/s1>, Таблица S1: Аналитические показатели качества, полученные с помощью предложенной методологии HPLC-DAD для количественного определения фитогормонов; Таблица S2: Значения восстановления предлагаемой методологии количественного определения фитогормонов в экстрактах листьев томата (n = 3 для каждой концентрации). Ссылка [67] цитируется в дополнительных материалах.

Вклад автора: Концептуализация, ПРО-П., НМ-П., РМОФС, МФ-Ф. и КС; культура побегов томата, ПРО-П., поддерживаемая НМ-П.; количественный анализ гормонов, ПРО-П., RLG и ЕС при поддержке CGA и MCBSMM; все остальные анализы ПРО-П., поддерживаемые НМ-П.; написание — подготовка оригинального проекта, ПРО-П., поддерживаемая НМ-П. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Данное исследование финансировалось Европейскими инвестиционными фондами в рамках Оперативной программы конкурентоспособности и интернационализации COMPETE 2020 (POCI) и Национальными фондами Португальского фонда науки и технологий (FCT) (02/SAICT/2017, Ref. PTDC/BAAAGR/31131/2017, акроним EOIS-CropProt). Национальные фонды через FCT (Португалия) также финансировали эту работу в рамках GreenUPorto, исследовательского подразделения FCUP: проекты UIDB/05748/2020 и UIDP/05748/2020; Исследовательское подразделение CITAB, UTAD: проект UIDB/04033/2020; Исследовательский отдел LAQV-REQUIMTE (UIDB/QUI/50006/2020). Кроме того, НМ-П. финансировался за счет докторского гранта SFRH/BD/138187/2018.

Заявление о доступности данных: авторы предоставляют данные по запросу.

Благодарности: Авторы хотели бы поблагодарить профессора Фернандо Тавареса из лаборатории MDE (FCUP, Порту, Португалия) за предоставление бактериального штамма и методов культивирования бактерий, использованных в этой работе.

Конфликты интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Рекомендации

1. Ляо, ГГ; Страйер-Шерер, Алабама; Уайт, Дж.; Мукерджи, А.; Де Ла Торре-Рош, Р.; Ричи, Л.; Коули, Дж.; Валлад, GE; Фриман, Дж. Х.; Джонс, Дж. Б. Нанооксид магния: новый бактерицид против толерантной к меди *Xanthomonas perforans*, вызывающей бактериальную пятнистость томатов. *Фитопатология* 2019, 109, 52–62. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
2. Ляо, ГГ; Хуанг, Ю.; Карвальо, Р.; Чоудхари, М.; Да Силва, С.; Коули, Дж.; Уэрта, А.; Валлад, GE; Фриман, Дж. Х.; Джонс, Дж. Б.; и другие. Наноматериал оксида магния, альтернатива коммерческим медным бактерицидам: борьба с бактериальными пятнистыми заболеваниями томатов в полевых условиях и общее и биодоступное накопление металлов в почве. *Окружающая среда. наук. Технол.* 2021, 55, 13561–13570. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
3. Цяо, К.; Лю, К.; Хуанг, Ю.; Ся, Ю.; Чжан С. Лечение бактериальной пятнистости томатов, вызванной устойчивыми к меди *Xanthomonas perforans*, с использованием низкомолекулярного соединения карвакрола. *Прот. урожая.* 2020, 132, 105114. [\[CrossRef\]](#)
4. Смит, С.Л.; Кампос, Миннесота; Озджан, А.; Мендис, ХК; Янг, М.; Майерс, Мэн; Атилола, М.; Думра, М.; Твин, З.; Джонсон, Е.Г.; и другие. Многофункциональный поверхностный, подповерхностный и системный терапевтический состав (MS3T) для борьбы с раком цитрусовых. *Дж. Агрик. Пищевая хим.* 2021, 69, 10807–10818. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
5. Эль Миз, М.; Салхи, С.; Храйби, И.; Эль Бачири, А.; Фоконье, ML; Тахани, А. Характеристика и исследование адсорбции тимола на столбчатый бентонит. *Открыть J. Phys. хим.* 2014, 4, 98–116. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
6. Де Оливейра, Л.Х.; Тригейро, П.; Соуза, JSN; де Карвальо, MS; Осадзима, Дж.А.; да Силва-Фильо, ЕС; Фонсека, М.Г. Монтмориллонит с эфирными маслами в качестве противомикробных средств, упаковки, репеллентов и инсектицидов: обзор. *Коллоиды Прибой.* 2022, 209, 112186. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
7. Йендлури, Р. Наноклей: новый путь доставки лекарств. *ЕС Фармакол. Токсикол. ЭКО* -2019, 2, 20–22.
8. Рават, К.; Агарвал, С.; Тьяги, А.; Верма, А.; Бохидар, Х.Б. Цитотоксичность и антимикробные свойства, зависящие от соотношения сторон наноглина. *Прил. Биохим. Биотехнология.* 2014, 174, 936–944. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
9. Гианнакас, А. На-монтмориллонит в сравнении с органически модифицированным монтмориллонитом в качестве наноносителей эфирного масла для экструдированных из расплава полиэтиленовых нанокомпозитных активных упаковочных пленок низкой плотности с контролируемой и долговечной антиоксидантной активностью. *Наноматериалы* 2020, 10, 1027. [\[CrossRef\]](#)
10. Цакалиас, И.С.; Лукиди, А.; Хацимихайлиду, С.; Салмас, СЕ; Яннакас, А.Е.; Ахилиас Д.С. Влияние нано- и органо-модифицированных наногибридов монтмориллонита/ эфирного масла на кинетику радикальной полимеризации стирола in situ. *Наноматериалы* 2021, 11, 474. [\[CrossRef\]](#)

11. Мерино, Д.; Мансиля, Айда; Казалонге, Калифорния; Альварес В.А. Получение, характеристика и тестирование *in vitro* антимикробной активности и элиситорной способности наноглины. Дж. Агрик. Пищевая хим. 2018, 66, 3101–3109. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
12. Оливейра-Пинто, РР; Марис-Понте, Н.; Торрес, А.; Таварес, Ф.; Фернандес-Феррейра, М.; Соуза, РМ; Сантос, эфирное масло *C. Satureja montana* L., монтмориллонит и наноформуляция уменьшают инфекцию *Xanthomonas euvesicatoria*, модулируя окислительно-восстановительные и гормональные пути растений томата. науч. Хортик. 2022, 295, 110861. [\[CrossRef\]](#)
13. Ханиф, Массачусетс; Нисар, С.; Хан, Г.С.; Муштак, З.; Зубайр, М. Эфирные масла. В исследовании эфирных масел, 1-е изд.; Малик, С., Ред.; Спрингер: Берлин, Германия, 2019 г.; стр. 3–17.
14. Франц, К.; Новак Дж. Источники эфирных масел. В Справочнике эфирных масел, 1-е изд.; Басер, К.С.С., Бухбауэр, Г., ред.; CRC Press: Бока-Ратон, Флорида, США, 2020 г.; стр. 41–83.
15. Ман, А.; Сантакроче, Л.; Якоб, Р.; Маре, А.; Мэн, Л. Антимикробная активность шести эфирных масел против группы патогенов человека: сравнительное исследование. Патогены 2019, 8, 15. [\[CrossRef\]](#)
16. Го, Ф.; Чен, К.; Лян, К.; Чжан, М.; Чен, В.; Чен, Х.; Юн, Ю.; Чжун, К.; Чен, В. Антимикробная активность и предлагаемые Механизм действия линалоола против *Pseudomonas fluorescens*. Передний. Микробиол. 2021, 12, 49. [\[CrossRef\]](#)
17. Озогул Ю.; Кулей, Э.; Укар, Ю.; Озогул Ф. Антимикробное воздействие эфирных масел на патогены пищевого происхождения. Недавний Пат. Пищевая Нутр. Сельское хозяйство. 2015, 7, 53–61. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
18. Джу, Дж.; Се, Ю.; Го, Ю.; Ченг, Ю.; Цянь, Х.; Яо, В. Ингибирующее действие эфирных масел растений на патогенные бактерии пищевого происхождения. Крит. Преподобный Food Sci. Нутр. 2019, 59, 3281–3292. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
19. Граната, Г.; Страквандано, С.; Леонарди, М.; Наполи, Э.; Маландрино, Г.; Кафизо, В.; Стефани, С.; Джерачи, К. Эфирные масла орегано и тимьяна, инкапсулированные в наночастицы хитозана, как эффективные противомикробные средства против патогенов пищевого происхождения. Молекулы 2021, 26, 4055. [\[CrossRef\]](#)
20. Эльшафи, Х.С.; Грульова, Д.; Баранова, Б.; Капуто, Л.; Де Мартино, Л.; Седлак, В.; Камеле, И.; Де Фео, В. Антимикробная активность и химический состав эфирного масла, полученного из *Solidago canadensis* L., произрастающего в дикой природе в Словакии. Молекулы 2019, 24, 1206. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
21. Делла Пепи, Т.; Эльшафи, НС; Капассо, Р.; Де Фео, В.; Камеле, И.; Наззаро, Ф.; Сконьямильо, МР; Капуто, Л. Антимикробная и фитотоксическая активность эфирных масел *Origanum heracleoticum* и *O. majorana*, произрастающих в Чиленто (Южная Италия). Молекулы 2019, 24, 2576. [\[CrossRef\]](#)
22. Котан Р.; Чакир, А.; Дадасоглу, Ф.; Айдын Т.; Чакмакчи, Р.; Озер, Х.; Кордали, С.; Мете, Э.; Дикбас, Н. Антибактериальная активность эфирных масел и экстрактов турецких видов *Achillea*, *Satureja* и *Thymus* против фитопатогенных бактерий. Дж. Наук. Продовольственное сельское хозяйство. 2010, 90, 145–160. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
23. Котан Р.; Дадасоглу, Ф.; Карагоз, К.; Чакир, А.; Озер, Х.; Кордали, С.; Чакмакчи, Р.; Дикбас, Н. Антибактериальная активность эфирного масла и экстрактов *Satureja hortensis* против фитопатогенных бактерий и их потенциальное использование в качестве дезинфицирующих средств для семян. науч. Хортик. 2013, 153, 34–41. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
24. Коста, П.; Медроньо, Б.; Гонсалес, С.; Романо, А. Циклодекстрины усиливают антиоксидантную активность эфирного масла. Индийский урожай сельскохозяйственных культур. 2015, 70, 341–346. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
25. Кюи, Х.; Ван, Ю.; Ли, К.; Чен, Х.; Лин, Л. Антибактериальная эффективность эфирного масла *Satureja montana* L., инкапсулированного в гидрогель растворимого полисахарида метил-β-циклодекстрина/сои, и его оценка в качестве консерванта для мяса. LWT 2021, 152, 112427. [\[CrossRef\]](#)
26. Кадена, МБ; Престон, генеральный менеджер; Ван дер Хорн, РА; Фланган, Северная Каролина; Таунли, НЕ; Томпсон, И.П. Повышение активности эфирного масла корицы путем инкапсуляции наночастиц для борьбы с патогенами семян. Индийский урожай сельскохозяйственных культур. 2018, 124, 755–764. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
27. Чоухан, С.; Шарма, К.; Гулерия, С. Антимикробная активность некоторых эфирных масел – современное состояние и перспективы на будущее. Лекарства 2017, 4, 58. [\[CrossRef\]](#)
28. Сауседо-Суньига, Х.Н.; Санчес-Вальдес, С.; Рамирес-Варгас, Э.; Гильен, Л.; Рамос-деВалле, ЛФ; Грасиано-Вердуго, А.; Урибе-Кальдерон, JA; Валера-Сарагоса, М.; Лосано-Рамирес, Т.; Родригес-Гонсалес, Х.А.; и другие. Контролируемое высвобождение эфирных масел с использованием ламинарной наноглины и пористых композитов галлузита/эфирного масла в многослойном пленочном резервуаре. Микропористый мезопористый мат. 2021, 316, 110882. [\[CrossRef\]](#)
29. Катара, В.; Куберо, Дж.; Потье, Дж. Ф.; Босис, Э.; Брагард, К.; Джермич, Э.; Холева, МС; Жак, Массачусетс; Петтер, Ф.; Прувост, О.; и другие. Тенденции в молекулярной диагностике и изучении разнообразия фитосанитарно регулируемых *Xanthomonas*. Микроорганизмы 2021, 9, 862. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
30. Хорват, Д.М.; Столл, РЭ; Джонс, Дж. Б.; Поли, Миннесота; Валлад, GE; Дальбек, Д.; Стаскавич, Б.Дж.; Скотт, Дж. В. Трансгенная устойчивость обеспечивает эффективный контроль над бактериальной пятнистостью томатов на уровне поля. PLoS ONE 2012, 7, e42036. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
31. Столл, РЭ; Джонс, Дж. Б.; Минсаваж Г. В. Устойчивость устойчивости томата и перца к ксантомонадам, вызывающим бактериальную пятнистость. Анну. Преподобный Фитопатол. 2009, 47, 265–284. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
32. Потнис, Н.; Тимиллина, С.; Страйер, А.; Шантарадж, Д.; Барак, доктор медицинских наук; Парет, МЛ; Валлад, GE; Джонс, Дж. Б. Бактериальная пятнистость томатов и перца: разнообразные виды *Xanthomonas* с широким спектром факторов вирулентности, представляющие собой проблему во всем мире. Мол. Растительный патол. 2015, 16, 907–920. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
33. Джонс, Дж. Б.; Зиттер, Т.А.; Момол, ТМ; Миллер, С.А. Сборник болезней и вредителей томатов, Американское фитопатологическое общество; АПС Пресса: Сент-Пол, Миннесота, США, 2014 г.
34. Эгель, Д.С.; Джонс, Дж. Б.; Минсаваж, ГВ; Кресвелл, Т.; Руль, Г.; Мейнард, Э.; Марчино, К. Распространение и характеристика штаммов *Xanthomonas*, вызывающих бактериальную пятнистость томатов в Индиане. Программа здоровья растений. 2018, 19, 319–321. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

35. Рохас, М.; Пенья, М.; Пенья-Вера, М.; Сулбаран, М.; Перес, Э.; Веласкес, К. Л. Характеристика и определение профилей устойчивости к противомикробным препаратам и металлам штаммов *Xanthomonas*, выделенных из природной среды. *Дж. Анал. Фарм. Рез.* 2019, 8, 55–60. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
36. Моретти, К.; Аматулли, Монтана; Буонаури, Р. ПЦР-анализ для обнаружения *Xanthomonas euvesicatoria*, вызывающего бактериальную пятнистость перца и томатов. *Летт. Прил. Микробиол.* 2009, 49, 466–471. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
37. Чжао, С.; Фернандес, Р.Д. Комплексный алгоритм количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. *Cell Rep.* 2005, 12, 1047–1064. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
38. Алексиева В.; Сергиев И.; Мапелли, С.; Каранов Е. Влияние засухи и ультрафиолетового излучения на маркеры роста и стресса у растений. *горох и пшеница. Окружающая среда растительной клетки.* 2001, 24, 1337–1344. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
39. Гаевская Э.; Складовская М. Влияние никеля на содержание АФК и антиоксидантную активность ферментов в листьях пшеницы. *БиоМеталлы* 2007, 20, 27–36. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
40. Коста-Сантос, М.; Марис-Понте, Н.; Диас, МС; Моура, Л.; Маркес, Г.; Сантос, К. Эффект *Bacillus* spp. и *Brevibacillus* sp. на Фотосинтез и окислительно-восстановительный статус *Solanum lycopersicum*. *Horticulturae* 2021, 7, 24. [\[CrossRef\]](#)
41. Ходжес, Д.М.; Делонг, Дж. М.; Форни, СФ; Прейндж Р.К. Совершенствование анализа веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, для оценки перекисного окисления липидов в тканях растений, содержащих антоцианы и другие мешающие соединения. *Планта* 1999, 207, 604–611. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
42. Лёвдал, Т.; Лилло, К. Выбор эталонного гена для количественной нормализации ПЦР в реальном времени у томатов, подвергнутых азотному, холодному и световому стрессу. *Анальный. Биохим.* 2009, 387, 238–242. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
43. Оливейра-Пинто, РР; Марис-Понте, Н.; Соуза, РМОФ; Торрес, А.; Таварес, Ф.; Рибейро, А.; Кавако-Пауло, А.; Фернандес-Феррейра, М.; Сантос, С. *Satureja montana* Эфирное масло, наночастицы зеина и их комбинация как стратегия биоконтроля для уменьшения бактериальной пятнистости на растениях томата. *Horticulturae* 2021, 7, 584. [\[CrossRef\]](#)
44. Марис-Понте, Н.; Мендес, Р.Дж.; Сарио, С.; Де Оливейра, JF; Мело, П.; Сантос, К. Растения томата используют неферментативные антиоксидантные пути, чтобы справиться с умеренным облучением УФ-А/В: вклад в использование УФ-А/В в садоводстве. *Дж. Физиол. растений.* 2018, 221, 32–42. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
45. Хорват, Э.; Чисар, Дж.; Галле, А.; Бедный, П.; Сепеши, А.; Тари, И. Закаливание салициловой кислотой вызывает зависящие от концентрации изменения в биосинтезе абсцизовой кислоты томатов в условиях солевого стресса. *Дж. Физиол. растений.* 2015, 183, 54–63. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
46. Нива, Т.; Сузуки, Т.; Такебаяси, Ю.; Исигуро, Р.; Хигасияма, Т.; Сакакибара, Х.; Исигуро, С. Жасмоновая кислота способствует раскрытию цветков и развитию цветочных органов за счет повышенной экспрессии транскрипционного фактора SIMYB21 в томатах. *Биология. Биотехнология. Биохим.* 2018, 82, 292–303. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
47. Сан, К.; Лю, Л.; Чжан, Л.; Льв, Х.; Он, К.; Го, Л.; Чжан, Х.; Он, Х.; Рен, С.; Чжан, Н.; и другие. Мелатонин способствует биосинтезу каротиноидов этилензависимым образом в плодах томатов. *Наука о растениях.* 2020, 298, 110580. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)
48. Ван Мёлебрук, Л.; Буше, СП; Степь, К.; Ванхаек, Л. Сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией Orbitrap высокого разрешения для метаболомного профилирования эндогенного фитогормонального статуса растения томата. *Дж. Хроматогр. А* 2012, 1260, 67–80. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
49. ИЧ. Согласованное трехстороннее руководство ICH: Валидация аналитических процедур: текст и методология Q2 (R1); ICH: Женева, Швейцария-Земля, 2005.
50. Лай, Ю.Р.; Лин, Швейцария; Чанг, КП; Ni, HF; Цай, WS; Хуанг, К.Дж. Распространение вариантов гена устойчивости к меди у *Xanthomonas* цитрусовый подвид. *citri* и *Xanthomonas euvesicatoria* pv. перфораны. *Завод Прот. наук.* 2021, 57, 206–216. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
51. Ву, Ю.В.; Ву, КВ; Чжоу, К.; Тао, JX; Нода, И. Двумерный ИК-корреляционный анализ традиционной китайской медицины, зависящий от волатильности. *Препарат «Масло красного цветка» от разных производителей.* *Дж. Мол. Структура.* 2008, 882, 107–115. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
52. Тунч, С.; Думан, С. Получение активных противомикробных нанокмполитных пленок метилцеллюлозы/карвакрола/монтмориллонита и исследование высвобождения карвакрола. *ЛВТ* 2011, 44, 465–472. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
53. Рой, А.; Джоши, М.; Бутула, Б.С. Антимикробные свойства полиэтиленовых нанокмполитных мононитей, армированных металлом наночастицы декорировали монтмориллонит. *Коллоиды Прибой.* Б. 2019, 178, 87–93. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
54. Он, Ю.; Фей, Х.; Ли, Х. Нанокмполиты на основе карбоксиметилцеллюлозы, армированные монтмориллонитом и ε-поли-L-лизинном для антимикробная активная упаковка для пищевых продуктов. *Дж. Прил. Полим. наук.* 2020, 137, 48782. [\[CrossRef\]](#)
55. Хонг, Си; Рим, Дж. В. Антимикробная активность органически модифицированных наноглин. *Дж. Наноски. Нанотехнологии.* 2008, 8, 5818–5824. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
56. де Соуза, АГ; Дос Сантос, НМА; Торин, РФС; Роза Д.С. Синергические антимикробные свойства эфирного масла карвакрола и монтмориллонита в биоразлагаемых крахмальных пленках. *Межд. Ж. Биол. Макромол.* 2020, 164, 1737–1747. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
57. Милади, Х.; Бен Слама, Р.; Мили, Д.; Зуари, С.; Бахруф, А.; Аммар, Э. Химический состав, цитотоксическая и антиоксидантная активность эфирного масла *Satureja montana* L. и его антибактериальный потенциал против *Salmonella* spp. штаммы. *Дж. Хим.* 2013, 2013, 275698. [\[CrossRef\]](#)
58. Лукас, GC; Алвес, Э.; Перейра, РБ; Перина, Ф.Дж.; Соуза, Р.М.Д. Антибактериальная активность эфирных масел в отношении *Xanthomonas vesicatoria* и контроль бактериальной пятнистости томатов. *Пески. Агропеку. Бюстгальтеры.* 2012, 47, 351–359. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
59. Ду, Х.; Ван, Ю.; Ян, Дж.; Ян, В. Сравнительный транскриптомный анализ устойчивых и восприимчивых линий томата в ответ на инфекция *Xanthomonas perforans* расы ТЗ. *Передний. Наука о растениях.* 2015, 6, 1173. [\[CrossRef\]](#)
60. Питерс, СМ; Ван Лун, Л. К. Пути защиты растений, независимые от салициловой кислоты. *Тенденции растениеводства.* 1999, 4, 52–58. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
61. Бари, Р.; Джонс, Дж. Д. Роль растительных гормонов в защитных реакциях растений. *Завод Мол. Биол.* 2009, 69, 473–488. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

62. Лонг, К.; Се, Ю.; Привет.; Ли, К.; Цзоу, Х.; Чен, С. Абсцизовая кислота способствует накоплению жасмоновой кислоты и играет ключевую роль в цитрусовых. развитие язвы. Передний. Наука о растениях. 2019, 10, 1634. [\[CrossRef\]](#)
63. Экер, младший; Дэвис, Р.В. Защитные гены растений регулируются этиленом. Учеб. Натл. акад. наук. США 1987, 84, 5202–5206. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
64. Норман-Сеттерблад, К.; Видаль, С.; Палва, Э.Т. Взаимодействующие сигнальные пути контролируют экспрессию защитных генов у *Arabidopsis* в ответ на разрушающие клеточную стенку ферменты *Erwinia carotovora*. Мол. Взаимодействие с растительными микробами. 2000, 13, 430–438. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
65. Гуань, Р.; Су, Дж.; Мэн, Х.; Ли, С.; Лю, Ю.; Сюй, Дж.; Чжан С. Многоуровневая регуляция индукции этилена играет положительную роль в устойчивости *Arabidopsis* к *Pseudomonas syringae*. Физиол растений. 2015, 169, 299–312. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
66. Чае, Х.С.; Чо, Ю.Г.; Парк, штат Миссури; Ли, МС; Ын, МОЙ; Канг, Б.Г.; Ким, В.Т. Гормональные перекрестные взаимодействия между ауксином и этиленом по-разному регулируют экспрессию двух членов семейства генов 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатоксидазы в рисе (*Oryza sativa* L.). Физиол растительной клетки. 2000, 41, 354–362. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
67. Европейское сообщество. Решение Комиссии от 12 августа 2002 г. о реализации Директивы Совета 96/23/ЕС, касающейся применения аналитических методов и интерпретации результатов. Выключенный. Дж. Эур. Коммун. 2002, 221, 8–36.