



Article

Nanoargile montmorillonite et formulation avec Satureja L'huile essentielle du Montana comme outil pour soulager les Xanthomonas euvesicatoria Charge sur Solanum lycopersicum

Paulo R. Oliveira-Pinto ^{1,2,3,4}, Nuno Mariz-Ponte ^{1,2,*}, Renato L. Gil ^{3,4}, Edite Cunha ^{3,4}, Célia G. Amorim ^{3,4}, Maria CBSM Monténégro ^{1,2,3,4}, Manuel Fernandes-Ferreira ^{1,5,6}, Rose MOF Sousa ^{5,6}, Conceição Santos ^{1,2,*}

- ¹ Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Porto (FCUP), Rua Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal ; paulopinto@fc.up.pt (PRO-P.); manuel.ferreira@fc.up.pt (MF-F.)
 - ² LAQV-REQUIMTE, Faculté des Sciences, Université de Porto (FCUP), Rua Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal
 - ³ Département des Sciences Chimiques, Faculté de Pharmacie, Université de Porto (FFUP), Rua Jorge de Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal ; renatogil19@gmail.com (RLG); ecunha@ff.up.pt (CE) ; camorim@ff.up.pt (CGA) ; mcbranco@ff.up.pt (MCBSMM)
 - ⁴ LAQV-REQUIMTE, Faculté de Pharmacie, Université de Porto (FFUP), Rua Jorge de Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal
 - ⁵ GreenUPorto & Inov4Agro, Faculté des Sciences, Université de Porto (FCUP), Rua Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal ; rose.sousa@fc.up.pt
 - ⁶ CITAB & Inov4Agro, Université de Trás-os-Montes et Alto Douro (UTAD), 5000-801 Vila Real, Portugal
- * Correspondance : nuno.ponte@fc.up.pt (NM-P.) ; csantos@fc.up.pt (CS)



Citation : Oliveira-Pinto, PR ;

Mariz-Ponte, N. ; Gil, RL; Cunha, E. ;

Amorim, CG; Monténégro,

MCBSM ; Fernandes-Ferreira, M. ;

Sousa, RMOF; Santos, C.

Nanoargile montmorillonite et

Formulation avec Satureja montana

L'huile essentielle comme outil pour soulager

Xanthomonas euvesicatoria Charge sur

Solanum lycopersicum. Appl. Nano

2022, 3, 126-142. [https://doi.org/](https://doi.org/10.3390/applnano3030009)

10.3390/applnano3030009

Rédacteurs académiques : Anthony William
Coleman et Mattia Rapa

Reçu : 9 mai 2022

Accepté : 28 juin 2022

Publié : 4 juillet 2022

Note de l'éditeur : MDPI reste neutre

en ce qui concerne les réclamations juridictionnelles dans
cartes publiées et affiliations institutionnelles
iations.



Copyright : © 2022 par les auteurs.

Licencié MDPI, Bâle, Suisse.

Cet article est un article en libre accès
distribué selon les termes et

conditions des Creative Commons

Licence d'attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Résumé : Tache bactérienne (BS) de la tomate (*S. lycopersicum*), provoquée par *Xanthomonas* spp., à savoir *X. euvesicatoria* (Xeu) constitue l'une des principales menaces pour la production de cette culture dans le monde. Le développement de nouvelles solutions de biocontrôle contre cette maladie permettra d'améliorer les stratégies de gestion de la maladie. moins à base de composés de Cu. Les nanoargiles, telles que la montmorillonite (NMT), ont fait l'objet d'études pour leur activité antimicrobienne, ou comme outils d'administration/stabilisants pour des composés organiques, tels que les huiles essentielles (HE), qui possèdent également une activité antimicrobienne contre les agents pathogènes des plantes. Ce travail vise pour évaluer comment l'application de NMT seule ou l'incorporation d'HE de *S. montana* sur des hôtes infectés par Xeu (var. Oxheart) affecte le statut redox des pousses et les mécanismes de défense antioxydants. Pousses in vitro, cultivées sur milieu Murashige et Skoog, ont été divisées en deux groupes, infectés par Xeu et non infectés (témoin) tire. Les pousses de chaque groupe ont ensuite été traitées avec NMT, *S. montana* EO, EO-NMT. Les résultats montrent que le NMT a pu réduire la quantité de bactéries Xeu, tout en réduisant la production de ROS et en conservant le niveaux de transcription des gènes liés à la défense proches de ceux du contrôle. Lorsqu'il est appliqué sur des personnes non infectées pousses, les traitements ont déclenché la production de ROS et régulé positivement le phénylpropanoïde et voie hormonale, ce qui suggère qu'elles agissent comme éliciteurs de défense. Globalement, les résultats indiquent que La NMT a le potentiel d'intégrer les stratégies de gestion de la BS, en raison de son activité antimicrobienne, et que l'HE et/ou les nanoargiles pourraient être utilisées avec succès comme nouvelles stratégies de prévention des maladies, car ils renforcent la défense des pousses saines, limitant ainsi potentiellement l'établissement du pathogène.

Mots-clés : Satureja montana; nanoargile; Solanum lycopersicum; tache bactérienne; stress oxydatif ; produits naturels antimicrobiens ; voie phénylpropanoïde ; voies hormonales

1. Introduction

De nos jours, la lutte contre les phytopathogènes repose principalement sur des bactéricides à base de cuivre. et les antibiotiques, et bien qu'il s'agisse de produits abordables et faciles à utiliser, avec une action à large spectre [1,2], l'application continue de ces stratégies a conduit à l'apparition de de souches bactériennes résistantes [3]. De plus, les directives de l'Union européenne interdisent l'utilisation de antibiotiques pour contrôler les phytopathogènes et promouvoir la réduction de l'utilisation du cuivre, et son

remplacement par des alternatives naturelles et durables. Les nanomatériaux et les nanostructures, tels que la montmorillonite nanoargileuse (NMT), ont fait l'objet d'études en raison de leur activité antimicrobienne et de leur capacité à agir comme supports de produits antimicrobiens. De plus, d'autres argiles inorganiques (par exemple le kaolin) ont été sous le feu des projecteurs pour leur capacité à incorporer des antimicrobiens, tout en réduisant la phytotoxicité de ces composés et en améliorant leur activité antibactérienne [4]. Cependant, les études sur l'effet de ces argiles sur un pathosystème sont rares.

Les nanoargiles sont des matériaux poreux inorganiques d'un grand intérêt pour leur capacité à incorporer des composés organiques, à savoir des huiles essentielles (HE), et pour une libération contrôlée [5], la NMT étant l'une des plus prometteuses pour la délivrance d'HE. Le NMT est un minéral phyllosilicate composé d'aluminium et de silice dans une structure laminaire, ce qui confère une surface spécifique élevée, ce qui le rend idéal pour l'incorporation d'EO entre les couches d'aluminium et de silice [5]. D'autres recherches ont démontré que les composés actifs des EO et des NMT forment des liaisons hydrogène. De plus, les interactions hydrophobes sont également importantes pour l'incorporation des EO dans le NMT ; cette hydrophobie peut être modifiée en ajoutant des tensioactifs, tels que le Tween20®, au mélange en augmentant l'espace entre les couches et en facilitant l'intercalation de molécules hydrophobes entre ces couches (par exemple, les composants EO) [6]. Ces nanoargiles sont naturellement abondantes, abordables et généralement considérées comme non toxiques [7]. Ils peuvent également augmenter la stabilité et la durée de conservation de certains composés actifs et améliorer l'activité antimicrobienne des HE destinées à être utilisées dans l'industrie agroalimentaire [8-10]. Leur activité antimicrobienne, combinée à leur capacité à agir comme porteurs d'autres composés bioactifs, font des NMT un candidat exceptionnel pour être utilisé en agriculture, notamment contre les phytopathogènes [11,12]. Cependant, leur interaction avec les cultures et les mécanismes impliqués dans les défenses des plantes ne sont pas encore connus.

Les HE sont des mélanges hautement concentrés de composés volatils de faible poids moléculaire, extraits de plusieurs parties de plantes (c.-à-d. tiges, feuilles, graines, fruits et fleurs) [13,14]. Certaines de ces HE ont des propriétés antimicrobiennes bien caractérisées, principalement dues à la présence de dérivés du phénylpropène (par exemple, l'eugénol, le méthyleugénol, l'anethole, l'estragole) et de terpénoïdes (par exemple, le limonène, le linalol, le carvacrol et le thymol) [15, 16]. L'activité antimicrobienne de ces produits botaniques a été évaluée principalement contre les maladies d'origine alimentaire [17-19]. Des études récentes ont également révélé que les HE présentent une activité antimicrobienne contre les phytopathogènes, à savoir *Xanthomonas* spp. [20,21]. Peu d'HE ont encore été testées contre les souches de *Xanthomonas* responsables de la maladie bactérienne des taches (BS). Par exemple, les HE du genre *Satureja*, à savoir *S. spigera* et *S. hortensis* [22,23], ont révélé un potentiel antimicrobien contre ces bactéries pathogènes. Ainsi, d'autres espèces de *Satureja* ayant une teneur élevée en terpènes et en phénols (par exemple, *S. montana*) devraient être évaluées en fonction de leur potentiel antimicrobien contre *Xanthomonas* spp, responsable de la BS. Par exemple, *S. montana* (sarriette) est très riche en HE [24], qui sont principalement composées de terpénoïdes (c.-à-d. carvacrol, linalol et thymol) et ont une activité antimicrobienne contre les agents pathogènes bactériens (par exemple *Staphylococcus aureus*) [25].

Malgré tout le potentiel des HE comme alternative viable aux pratiques conventionnelles de contrôle des agents pathogènes, leur application nécessite encore quelques améliorations, principalement en ce qui concerne la volatilité de certains des composés des HE [26]. Récemment, certains supports ou systèmes d'administration (par exemple, les nanocomposites) ont démontré une réduction de la volatilisation de l'EO, tout en augmentant sa solubilité dans les solvants aqueux et en améliorant son activité antimicrobienne [26,27]. Certains autres candidats prometteurs, tels que les nanoargiles, pourraient servir d'outils de fourniture d'EO [28].

Xanthomonas est un genre bactérien qui infecte une grande variété de cultures et de plantes sauvages, étant responsable de maladies entraînant des pertes économiques importantes [29]. La tomate (*Solanum lycopersicum* L.), l'une des cultures maraîchères les plus importantes au monde (FAOSTAT, 2019), est omniprésente menacée par des maladies bactériennes, parmi lesquelles la tache bactérienne de la tomate [30]. Cette maladie est causée par quatre espèces de xanthomonades (*Xanthomonas euvesicatoria* ; *X. vesicatoria* ; *X. perforans* ; *X. gardneri*) [31]. Parmi ceux-ci, *X. perforans* et *X. gardneri* ne provoquent des maladies que chez la tomate, tandis que *X. euvesicatoria* (Xeu) et *X. vesicatoria* affectent d'autres cultures (par exemple les poivrons) [32]. BS affecte les parties aériennes de la plante (feuilles et tiges) avec le

apparition de lésions sombres, jaunissement des feuilles, finalement défoliation et lésions apparaissent sur le fruit [33,34]. Les souches de *Xanthomonas* isolées de plusieurs cultures (par exemple, *Phaseolus vulgaris* et *Capsicum annum*) auraient été résistantes à plusieurs antibiotiques et métaux (dont le Cu) [35]. Il est donc essentiel de trouver de nouvelles mesures de contrôle naturel contre ce type de phytopathogène.

Ce travail vise donc à expliquer les effets du NMT et de l'EO-NMT de *S. montana*, après 3 jours d'application sur des pousses de tomates in vitro inoculées avec Xeu, aux niveaux moléculaire et physiologique. Cette étude apporte de nouvelles connaissances sur les moyens des formulations NMT et EO-NMT dans les tissus de tomates et leur efficacité antimicrobienne contre Xeu lorsqu'elles sont appliquées sur les feuilles, mettant finalement en lumière son application potentielle en tant qu'outil de gestion des maladies dans les conditions des plantes. Ces données contribueront à l'évaluation du potentiel des nanoargiles et des formulations en tant qu'alternatives vertes et respectueuses de l'environnement pour la gestion du Xeu dans les tomates. Ce travail élucide également l'utilisation potentielle du NMT comme antimicrobien ou comme support d'EO-nano.

2. Matériels et méthodes

2.1. Préparation des huiles essentielles et des formulations

Une huile essentielle certifiée biologique de *S. montana* a été achetée auprès de la distillerie Florihana (Caussols, France) et sa densité à -20°C était de $1,02\text{ g cm}^{-3}$. Une simple émulsion EO-eau a été préparée en mélangeant de l'EO de *S. montana* ($3,92\text{ }\mu\text{L}$) avec du Tween20® ($3,63\text{ }\mu\text{L}$) jusqu'à une concentration finale de $0,4\text{ mg mL}^{-1}$ et un volume final de 10 mL . La concentration utilisée a été sélectionnée sur la base de nos études précédentes (non publiées), fondées sur la concentration minimale bactéricide (MBC), qui était la même concentration que celle utilisée ici. Pour l'émulsion EO – eau, de l'eau MilliQ stérile a été ajoutée lentement tout en vortexant à $3\text{ }200\text{ tr/min}$ (VWR, Radnor, PA, USA). Pour la formulation, de la montmorillonite (NMT) a été ajoutée à une concentration finale de $1\text{ }\%$ (p/v) ($0,1\text{ g}$) et vortexée pendant 2 min à $3\text{ }200\text{ tr/min}$ (VWR, Radnor, PA, USA), avec un volume final de 10 mL . Enfin, les ondes ultrasonores ont été appliquées sur la formulation à l'aide d'un perturbateur cellulaire à ultrasons équipé d'une micropointe (Microson™) (10 cycles de 5 s avec une pause de 10 s entre les cycles à 10 W).

2.2. Culture de pousses, inoculation et traitements

Les graines de tomates (*S. lycopersicum* var. Oxheart), achetées auprès d'un fournisseur commercial (Vilmorin, France), ont été désinfectées en surface avec une solution d'eau de Javel commerciale à $40\text{ }\%$ (v/v) (Pavão®) pendant 20 min . Les graines ont ensuite été lavées trois fois dans de l' H_2O désionisée stérile et placées dans un milieu $1/2\text{ MS}$ ($30\text{ }\%$ (p/v) de saccharose ; $0,7\text{ }\%$ (p/v) d'agar ; $\text{pH} = 5,6\text{--}5,8$) pour la germination. Deux semaines après la germination, les pousses ont été transférées sur un milieu MS ($0,5\text{ mg L}^{-1}$ de benzyladénine (BAP) ; $30\text{ }\%$ (p/v) de saccharose ; $0,7\text{ }\%$ (p/v) d'agar ; $\text{pH} = 5,6\text{--}5,8$) pour la prolifération des pousses. L'incubation a eu lieu dans une chambre de croissance végétale à $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, avec une intensité lumineuse photosynthétique maximale de $250\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ sous une photopériode de $16:8\text{ h}$ (lumière : sombre). Toutes les deux semaines, les pousses étaient utilisées comme source de nouvelles pousses. Après trois mois, les pousses ont été repiquées dans du milieu MS sans supplémentation en BAP pendant 7 jours . Ensuite, les pousses d'une longueur de 10 cm ont été sélectionnées et divisées au hasard en groupes pour les traitements individuels comme suit : (A) non infectées (témoin négatif) – C ; (B) infecté par Xeu (contrôle positif) – X ; (C) non infecté + traité avec *S. montana* EO – S ; (D) infecté + traité avec *S. montana* EO – XS ; E non infectés + traités avec la formulation – SNMT ; (F) infecté + traité avec la formulation – XSNMT ; (G) non infecté + traité avec de la nanoargile NMT – NMT ; (H) infecté + traité avec de la nanoargile NMT – XNMT.

Une souche de référence de *X. euvesicatoria* LMG 905 a été obtenue auprès de la collection bactérienne BCCM/LMG (Université de Gand, Belgique) et conservée à -80°C dans $30\text{ }\%$ (v/v) de glycérol, dans la collection du laboratoire MDE (FCUP, Portugal). Les bactéries ont été cultivées dans un milieu extrait de levure-dextrose- CaCO_3 (YDC). Pour l'infection, les pousses ont été plongées (pendant 30 s) dans une suspension de *X. euvesicatoria* LMG 905 dans du PBS (tampon phosphate salin, $\text{pH} = 7$) avec une densité optique à 600 nm (DO600) de $0,1\text{ UA}$. Après cela, les pousses ont été transférés dans de nouvelles boîtes stériles avec un milieu MS-agar. Trois jours après l'infection, les traitements

réalisée en pulvérisant la page adaxiale des feuilles avec 1 mL de la solution de traitement, selon les conditions expliquées ci-dessus. De l'eau MilliQ stérile a été utilisée pour les contrôles positifs (infectés) et négatifs. Un jour après l'application des traitements, les pousses ont été réduites en poudre dans du N₂ liquide et conservées à -80 ° C pour toute analyse ultérieure. Deux expériences temporelles et indépendantes ont été réalisées, avec 10 pousses par condition.

2.3. Quantification de *X. euvesicatoria*

X. euvesicatoria a été quantifié par RT-PCR en utilisant le système de détection PCR en temps réel CFX96™ (BioRad, Hercules, CA, USA), et en suivant la méthode décrite par Moretti et al. [36], avec les amorces suivantes (xeu2.4 – CTGGGAACTCATTCGCAGT, Forward ; xeu2.5 – TTGTGGCGCTCTTATTCCT, Reverse), avec une taille de produit final de 208 paires de bases (pb). Pour chaque réaction, 10 µL de NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2×), ROX plus (NZYTech™, Lisbonne, Portugal), 0,8 µL d'amorce directe et inverse (10 mM), 0,4 µL de H₂O traitée au DEPC et 8 µL de Une matrice d'ADN a été utilisée. Les conditions suivantes ont été utilisées pour les amplifications : 95 ° C pendant 1 min suivi de 40 cycles de 5 s à 95 ° C et 15 s à 60 ° C. L'analyse de la courbe de fusion a été réalisée, commençant à 65 ° C et allant jusqu'à 95 ° C avec un incrément de 0,5 ° C pour chaque cycle de 5 s. Les réactions ont été réalisées en triple et en parallèle avec une courbe standard utilisant des dilutions standard de 10⁸ à 10¹ cellules de Xeu LMG 905. L'efficacité des amorces a été évaluée à l'aide du mineur PCR en temps réel , comme décrit par Zhao et Fernald (37). Ces efficacités calculées ont été utilisées pour obtenir les C_q corrigés pour chaque courbe d'amplification. Pour déterminer la quantité de Xeu présente dans les pousses, la courbe standard expliquée ci-dessus (R² = 0,994) a été utilisée.

2.4. Contenu en espèces réactives de

l'oxygène 2.4.1. Quantification du peroxyde

d'hydrogène (H₂O₂) Pour quantifier le peroxyde d'hydrogène, la méthode spectrophotométrique, décrite par Alexieva et al. [38], a été utilisée. En bref, 50 mg de tissu en poudre ont été macérés dans 2 ml de TCA (acide trichloroacétique) à 0,1 % (p/v), à l'aide d'un mélangeur-broyeur (Retsch MM400, Haan, Allemagne), avec une fréquence d'agitation de 30 s⁻¹ po. conditions froides. L'homogénat a ensuite été centrifugé à 12 000 × g pendant 15 min à 4 ° C, puis 500 µL de surnageant ont été collectés et mélangés avec 500 µL de tampon phosphate 0,1 M (pH = 7) et 1 000 µL d'iodure de potassium (KI) 1 M. Le mélange a été homogénéisé avec un mélangeur vortex (VWR, Radnor, PA, USA) pendant 5 s à 3 200 tr/min et incubé dans l'obscurité, à température ambiante pendant 60 min. Les absorbances des échantillons ont été enregistrées à λ = 390 nm avec le spectrophotomètre à lecteur de plaques Multiskan™ GO (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Une courbe standard a été réalisée avec des concentrations connues de H₂O₂, comprises entre 0 et 100 µM. Les résultats ont été présentés en mmol de H₂O₂ par g de poids frais (FW).

2.4.2. Quantification du radical superoxyde (O₂·⁻)

–) Pour semi-quantifier le radical superoxyde (O₂·⁻), la méthode décrite par Gajewska et Sklodowska [39] a été utilisée, avec les modifications décrites par Costa-Santos et al. [40]. En bref, les échantillons de tissus (50 mg) ont été homogénéisés dans 2 mL de tampon d'extraction (tampon phosphate 0,01 M (pH = 7,8), 0,05 % (p/v) NBT (nitroblue tetrazolium) dissous dans 100 µL de DMSO (diméthylsulfoxyde) et 10 mM d'azoture de sodium) et vortexé pendant 30 s à 3 200 tr/min (VWR, Radnor, PA, USA). Le mélange a été incubé pendant 1 h, à l'obscurité, à température ambiante. Les échantillons ont été centrifugés à 13 000 × g pendant 2 min à 4 ° C. Après centrifugation, 1,5 ml de surnageant ont été collectés et incubés à 85 °C pendant 10 min dans un bloc chauffant (VWR, Radnor, PA, USA). Les échantillons ont ensuite été placés à 4 ° C pendant 10 min pour arrêter la réaction. L'absorbance (Abs) a été enregistrée à 580 nm à l'aide du spectrophotomètre pour microplaques Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Les résultats ont été présentés en Abs par g de FW.

2.5. Évaluation de la peroxydation lipidique par quantification du MDA

La peroxydation lipidique a été déterminée par la production de malondialdéhyde (MDA), comme décrit par Hodges et al. [41]. Succinctement, 50 mg de tissu en poudre ont été macérés dans 2 ml de TCA 0,1% (p/v) à l'aide d'un mélangeur-broyeur (Retsch MM400, Allemagne) avec une fréquence d'agitation de 30 s⁻¹, dans des conditions froides. Après centrifugation (10 000 × g, 10 min, 4 ° C), 250 µL du surnageant ont été mélangés à 1 000 µL de TCA 20 % (p/v) représentant un contrôle négatif (-TBA), et 250 µL supplémentaires de surnageant ont été ajoutés à 1000 µL de TCA 20 % (p/v) + TBA (acide thiobarbiturique) 0,5 % (p/v) (+TBA). Les échantillons ont été incubés à 95 ° C pendant 30 min dans un bloc chauffant (VWR, Radnor, PA, USA) et réfrigérés sur la glace pendant 10 min pour arrêter la réaction. Les absorbances ont été enregistrées à 600 nm et 532 nm, à l'aide du spectrophotomètre pour microplaques Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (Thermo Fisher, Waltham, MA, États-Unis). Les résultats ont été exprimés en mmol d'équivalents MDA (mmol MDAE) par g de FW. Les MDAE ont été calculées comme suit (1).

MDAE =
$$\frac{(\text{Abdos} + \text{à déterminer} - \text{Abdos} + \text{à déterminer}) - \text{Abs-TBA}}{157\,000} \times 109 \tag{1}$$

2.6. Analyse de l'expression génétique

Pour évaluer les niveaux d'expression des pousses, 100 mg de tissu en poudre ont été utilisés pour extraction d'ARN total, avec NZYol (NZYTech™, Lisbonne, Portugal), selon les directives du fabricant. Après l'isolement de l'ARN, les échantillons ont été traités avec NZY DNase I (NZYTech™, Lisbonne, Portugal), selon les instructions du fabricant et l'ADNc a été synthétisé à l'aide du kit de synthèse d'ADNc NZY First-Strand (NZYTech™, Lisbonne, Portugal), selon les instructions du fabricant. L'ADNc a été dilué dans de l'eau MilliQ et stocké à -20 ° C jusqu'à utilisation. Deux gènes domestiques, l'ubiquitine (ubi) et la tubuline (baignoire) ont été utilisés pour normaliser les niveaux d'expression relatifs (tableau 1). Transcriptions appartenant aux voies de défense biotiques contre le stress, à savoir (a) la synthèse des caroténoïdes : caroténoïde isomérase (crtiso) ; (b) voie phénylpropanoïde : chalcone synthase 1 (chs1), phénylalanine ammoniacale-lyase 5 (pal5); et (c) réponse hormonale : oxophytodienoate réductase 3 (opr3), L'ABA aldéhyde oxydase (aao) et l'aminocyclopropane carboxylate oxydase 3 (aco3) ont été quantifié par RT-qPCR.

Tableau 1. Séquence de l'amorce et température d'hybridation des gènes sélectionnés pour les voies phényl-propanoïdes et hormonales de la tomate.

Gène	Apprêt	Séquence	Recuit Température (° C)	Taille du produit (pb)	Référence
Ubi	Avant	GGACGGACGTACTCTAGCTGAT	60	134	[42]
	Inverse	AGCTTTCGACCTCAAGGGTA			
baignoire	Avant	AACCTCCATTGAGGAGATGTTT	60	180	[42]
	Inverse	TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT			
crtiso	Transférer	GTTTGTAATCTGGGTTTCCAGCA	60	117	[43]
	Inverse	TTGCCTTGTTGGTTTCAAGC			
copain5	Transférer	TGGAGGAGAATTTGAAGAATGCTG	60	136	[43]
	Inverse	TCCCTTTTCCACCACTTGATAGC			
chs1	Avant	ACCAACAAGGTTGCTTTGCC	60	135	[44]
	Inverse	GAGATTCACTGGGTCCACGG			
aao	Avant	CCAGGGCACAAACACAATCAA	60	154	[45]
	Inverse	GTCGTAAATAATATCAGACTG			
opr3	Transférer	ATGGACTCTAATCCACTCAGCCTTG	60	152	[46]
	Inverser	TCACTGCCAAGTCTGCCTGCTTCAG			
aco3	Forward	GAAGGCTATGGAAGCTAATGTGG	60	104	[47]
	Inverse	ATGTGTTTAATTAGCTACGTTTTG			

Les réactions RT-qPCR ont été réalisées à l'aide du thermocycleur CFX96 Touch™ (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Pour chaque réaction, 2,5 µL d'ADNc total premier brin, 10 µL de NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x), ROX plus (NZYTech™, Lisbonne, Portugal), 0,8 µL d'amorce directe et inverse (10 mM), et 5,9 µL d'eau MilliQ ont été utilisés. Les amplifications ont été standardisées comme suit : 95 °C pendant 1 min suivi de 50 cycles de 5 s à 95 °C et 15 s à 60 °C. L'analyse de la courbe de fusion variait de 65 °C à 95 °C avec un incrément de 0,5 °C par cycle de 5 s.

Un mineur PCR en temps réel [34] a été utilisé pour calculer l'efficacité des amorces et déterminer les valeurs Cq des courbes d'amplification.

2.7. Extraction et quantification d'hormones

L'extraction des phytohormones 6-benzylaminopurine (BAP), acide abscissique (ABA), acide gibbérélique 3 (GA3), acide indole-acétique (IAA), acide jasmonique (JA), jasmonate de méthyle (MeJA) et acide salicylique (SA) a été réalisée comme décrit par Van Meulebroek et al. [48]. Pour cela, 100 mg de tissu ont été homogénéisés, par vortex pendant 2 min à 3200 tr/min (VWR, Radnor, PA, USA), avec 1 mL de tampon d'extraction froid (-20 °C) composé de 75 % (v/v) méthanol, 20 % (v/v) d'acide formique et 5 % (v/v) d'eau stérile MilliQ. Les échantillons ont ensuite été soumis à une extraction à froid, pendant 12 h à -20 °C. Après extraction, les homogénats ont été centrifugés (17 000 × g pendant 5 min à 4 °C) et le surnageant a été collecté et conservé à -80 °C. Avant la quantification, 500 µL de surnageant ont été transférés dans Amicon Unités de filtration ultracentrifuges, centrifugées pendant 10 min à 17 000 × g, à 4 °C. Les échantillons ont été collectés et filtrés à travers un filtre seringue en PTFE de 0,2 µm avant quantification.

L'analyse chromatographique a été réalisée dans un système Shimadzu LC-20 équipé d'un détecteur à réseau de diodes (DAD) de prééminence SPD-M20A et d'un injecteur d'échantillon externe à six ports Rheodyne 7725. Une colonne Luna Omega Polar C18 à phase inversée (150 × 4,6 mm; 5 µm, Phenomenex) avec une colonne de garde (Luna Omega Polar C18 4 × 3,0 mm, Phenomenex) a été utilisée comme phase stationnaire. L'élution a été réalisée en mode gradient avec un mélange d'acide formique à 0,1% (v/v) dans de l'eau ultra pure et du méthanol (60:40, (v/v) pour le solvant A et 40:60 (v/v) pour solvant B, respectivement). Le programme d'élution par gradient a démarré avec 0% de solvant B pendant 9 min. Ensuite, le solvant B a augmenté jusqu'à 100 % en 0,01 min. De 9,01 à 22,0 min, la contribution du solvant B était constante. À 22,0 min, les conditions initiales ont été rétablies en 0,01 min et maintenues pendant 8,0 min pour assurer l'équilibre de la colonne. Le débit a été maintenu à 1,0 mL min⁻¹, le volume d'injection était de 20 µL et la colonne LC a été maintenue à une température ambiante contrôlée (±2 °C). La détection et la quantification des pics ont été effectuées à l'aide du logiciel LabSolutions version 5.60 SP2 (Shimadzu Corporation). L'acide gibbérélique 3 (GA3), la benzyladénine (BAP), l'acide indoleacétique (IAA), l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et le jasmonate de méthyle (MeJA) ont été détectés à l'aide d'une longueur d'onde de 206 nm, tandis que l'acide abscissique (ABA) a été détecté à 254 nm.

La méthode HPLC – DAD proposée a été validée conformément aux lignes directrices de l'ICH pour la validation des procédures analytiques [49]. La linéarité et la portée, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), la précision et l'exactitude ont été évaluées. Les résultats ont été exprimés en ng de chaque hormone par g de FW. Les détails sur les procédures expérimentales et les résultats analytiques sont inclus dans le matériel supplémentaire.

2.8. Analyse statistique

L'expérience a été réalisée deux fois, dans des tests indépendants. Dans chaque essai indépendant, dix pousses par condition/traitement ont été utilisées, pour l'analyse de chaque paramètre. Les comparaisons entre les traitements ont été effectuées à l'aide du test ANOVA unidirectionnel (Graphpad™ Prism 9, San Diego, CA, USA). Pour les comparaisons statistiques, le test de comparaison de Dunnett a été utilisé, avec un intervalle de confiance de 95 %.

3. Résultats

3. Résultats

3.1. *X. euvesicatoria* Quantification

3.1. *X. euvesicatoria* Quantification

La quantification du pathogène a montré que *Xeu* était présent dans toutes les cellules inoculées. La quantification du pathogène a montré que *Xeu* était présent dans toutes les cellules inoculées. Les résultats ont révélé que la NMT était la seule condition expérimentale permettant un traitement. Les résultats ont révélé que la NMT était le seul traitement capable de réduire significativement ($p < 0,05$) la quantité de *Xeu* dans les pousses de tomates (154 fois) lorsque par rapport à toutes les autres conditions (Figure 1). Lorsque l'émulsion EO-eau (XS) ou la formulation (XSNMT) ont été appliquées, aucune différence significative n'a été observée dans la formulation *Xeu* (XSNMT) ont été appliquées, aucune différence significative n'a été observée dans la formulation *Xeu* quantité, par rapport au contrôle (X), 24 h après les traitements.

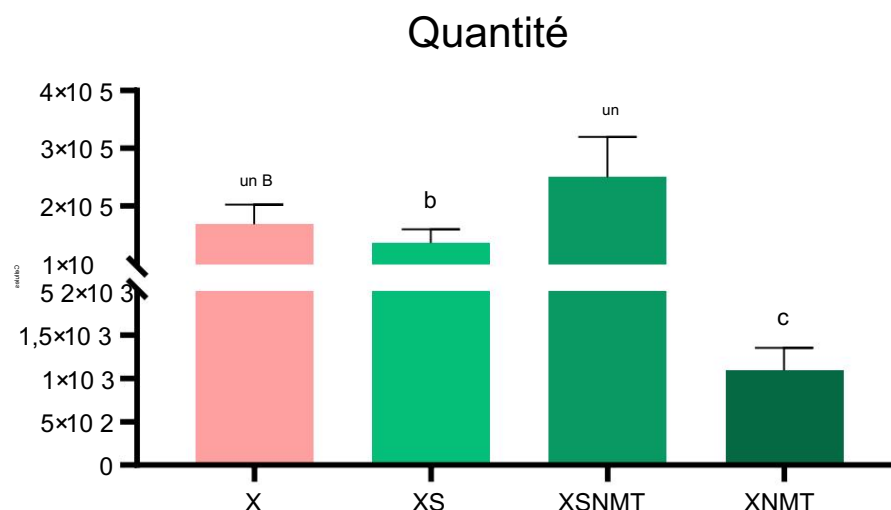


Figure 1. Quantité de *X. euvesicatoria* dans les pousses infectées de *S. lycopersicum*, par q-PCR. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± SD (n = 3). Les moyennes marquées de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Dunnett ($p < 0,05$). X : pousses infectées non traitées ; XS : pousses infectées traitées avec l'émulsion EO-eau ; XSNMT : pousses infectées traitées avec la formulation S. montana EO + NMT ; XNMT : pousses infectées traitées avec la formulation S. montana EO + NMT ; XNMT : pousses infectées traitées avec NMT.

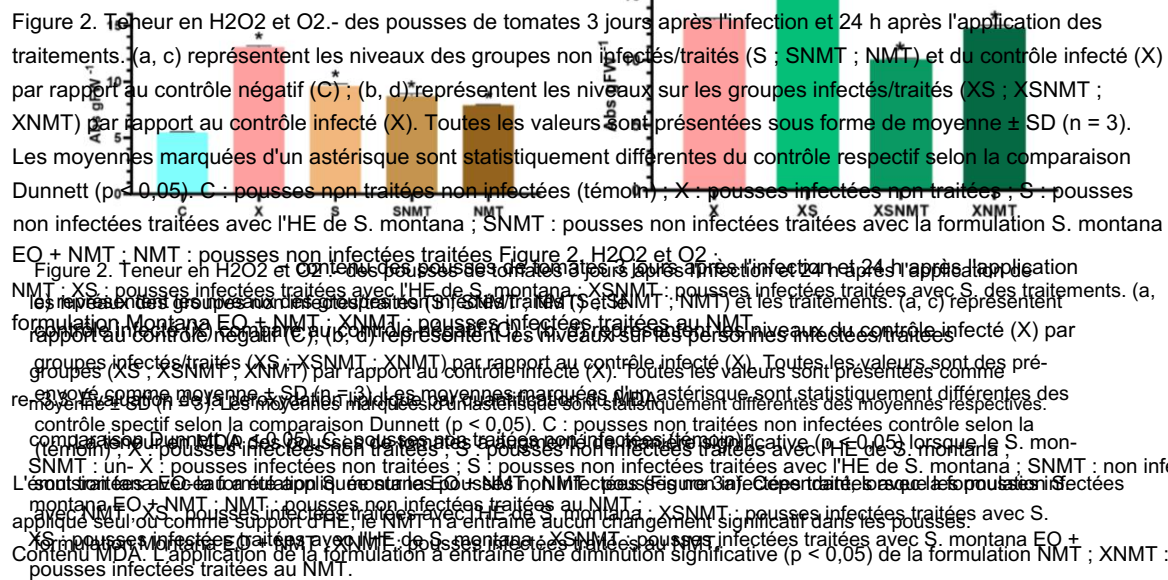
3.2. Contenu en espèces réactives de l'oxygène

3.2. Contenu en espèces réactives de l'oxygène

Le peroxyde d'hydrogène n'a pas montré de changements significatifs lorsque les traitements ont été appliqués soit aux pousses de tomates non infectées (Figure 2a), soit à celles infectées par *Xeu* (X), par rapport au contrôle négatif (C). Cependant, H₂O₂ était significativement réduit ($p < 0,05$) par l'application des trois traitements sur les pousses infectées (Figure 2b). Concernant le radical superoxyde, il a été significativement augmenté par l'application des traitements (émulsion EO-eau, formulation et NMT) sur les pousses non infectées (Figure 2c). De même, les feuilles infectées par *Xeu* présentaient une O₂⁻ significativement plus élevée ($p < 0,05$) (Figure 2c). De même, les feuilles infectées par *Xeu* présentaient une O₂⁻ significativement plus élevée ($p < 0,05$) par rapport au contrôle non infecté (C) (Figure 2c). L'application de l'eau EO entraîne une augmentation significative ($p < 0,05$) de la teneur en O₂⁻ des pousses infectées. L'émulsion a conduit à une augmentation significative ($p < 0,05$) de la teneur en O₂⁻ des pousses infectées (Figure 2d). Cependant, le NMT seul, ou en tant que porteur d'EO, a réduit significativement ($p < 0,05$) les niveaux de radical superoxyde des explants de tomates infectés par *Xeu*, par rapport au contrôle (X).

3.3. Évaluation de la peroxydation lipidique par quantification du MDA

La teneur en MDA des pousses de tomates a augmenté de manière significative ($p < 0,05$) lorsque le *S. montana* Une émulsion EO-eau a été appliquée sur les pousses non infectées (Figure 3a). Cependant, lorsqu'il est appliqué seul ou en tant que support d'EO, le NMT n'entraîne aucun changement significatif dans le MDA des pousses. L'application de la formulation a entraîné une diminution significative ($p < 0,05$) de la teneur en MDA des pousses infectées par rapport à X (Figure 3b).



(a) **Lipid Peroxidation**

La teneur en MDA des pousses de tomates a augmenté de manière significative ($p < 0,05$) lorsque l'émulsion EO-eau de *S. mon-tana* a été appliquée aux pousses non infectées (Figure 3a). Cependant, lorsqu'il est appliqué seul ou comme support d'EO, le NMT n'entraîne aucun changement significatif dans les pousses. Contenu MDA. L'application de la formulation a entraîné une diminution significative ($p < 0,05$) de la teneur en MDA des pousses infectées par rapport à X (Figure 3b).

(b) **Lipid Peroxidation**

Treatment	MDA Content (μmolMDAE gFW ⁻¹)
C	~1100
X	~1600
S	~1700
SNMT	~1400
NMT	~1350

Treatment	MDA Content (μmolMDAE gFW ⁻¹)
X	~1600
XS	~1200
XSNMT	~750*
XNMT	~1200**

Figure 3: Teneur en MDA des pousses de *S. lycoecus* 3 jours après l'inoculation de X et 24 h après l'application de l'application de traitements. (a) représente les conditions non infectées/non traitées (S, SNMT et NMT) et le contrôle infecté/non traité (X) par rapport au contrôle non infecté/non traité (C) ; (b) de contrôle pré-infecté/non traité (X) par rapport au contrôle positif (X) ; les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD et de moyenne $\pm$ SD (n = 3). Les moyennes marquées d'un « * » sont statistiquement différentes du contrôle respectif, selon la figure 3. Teneur en MDA des pousses de *S. lycoecus* 3 jours après l'inoculation de X et 24 h après selon le test de comparaison Dunnett (le test de comparaison de Dunnett (p < 0,05). C : pousses non infectées/non traitées (témoin négatif) ; X : application de traitements infectées/non traitées (témoin positif) ; S : pousses non infectées/traitées avec l'HE de *S. montana* ; SNMT : pousses infectées/traitées avec l'HE de *S. montana* ; XSNMT : pousses infectées traitées avec *S. montana* EO + NMT ; XNMT : pousses infectées traitées avec NMT. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD avec NMT ; X : pousses infectées traitées avec l'HE de *S. montana* ; XSNMT : pousses infectées traitées avec *S. montana* EO + NMT ; XNMT : pousses infectées traitées avec NMT. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD (n = 3). Les moyennes marquées d'un « * » sont statistiquement différentes du contrôle respectif, selon la formulation le test de comparaison de Dunnett (p < 0,05). C : pousses non infectées/non traitées (témoin négatif) ; X : infecté

3.4.1. Voie phénylpropanoïde

Figure 2 consists of six bar charts (a-f) showing the relative quantity of three genes: *crtiso* (a, b), *pal5* (c, d), and *chs1* (e, f). The y-axis for all charts is 'Relative Quantity'. The x-axis for (a), (c), and (e) shows genotypes C, X, S, SNMT, and NMT. The x-axis for (b), (d), and (f) shows genotypes X, XS, XSNMT, and XNMT. Asterisks (*) indicate significant differences from the control (C or X) at p < 0.05.

(a) *crtiso* (C, X, S, SNMT, NMT)

Genotype	Relative Quantity
C	1.0
X	~2.8*
S	~1.3
SNMT	~0.8
NMT	~1.7

(b) *crtiso* (X, XS, XSNMT, XNMT)

Genotype	Relative Quantity
X	1.0
XS	~0.3*
XSNMT	~0.6*
XNMT	~0.5*

(c) *pal5* (C, X, S, SNMT, NMT)

Genotype	Relative Quantity
C	~1
X	~4
S	~10
SNMT	~4
NMT	~45*

(d) *pal5* (X, XS, XSNMT, XNMT)

Genotype	Relative Quantity
X	1.0
XS	~1.6*
XSNMT	~1.8*
XNMT	~1.8*

(e) *chs1* (C, X, S, SNMT, NMT)

Genotype	Relative Quantity
C	1.0
X	~3.3*
S	~0.6
SNMT	~2.2*
NMT	~2.1*

(f) *chs1* (X, XS, XSNMT, XNMT)

Genotype	Relative Quantity
X	1.0
XS	~0.3*
XSNMT	~0.8
XNMT	~0.9

Figure 4. Niveaux d'expression des gènes liés au système de défense (ertiso) et au phénoylpropanoïde (chs1), représentés par l'BS et l'PCRx (des, e) représentés infectés/traités d'un levain contrôlé positif (X) quantifiés par l'ERT et l'PCR. (a, c, e) infecté/non traité (C) ; (b, d, f) groupes représentés /traités, plus le contrôle positif (X), par rapport au contrôle non infecté (C). Les niveaux des groupes infectés/traités par rapport au contrôle positif (X). Toutes les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD (n = 3). Les moyennes marquées d'un « * » sont statistiquement différentes. Test de comparaison de Dunnett (p < 0,05). C : pousses non infectées et non traitées ; X : pousses infectées non traitées ; S : selon le test comparatif de Dunnett (p < 0,05). C : pousses non infectées et non traitées ; X : infecté pousses non traitées ; S : pousses non infectées traitées avec l'HE de *S. montana* ; SNMT : pousses non infectées traitées avec la formulation *S. montana* EO + NMT ; NMT : pousses non infectées traitées avec NMT ; XS : infecté pousses traitées avec l'HE de *S. montana* ; XSNMT : pousses infectées traitées avec *S. montana* EO + NMT formulation ; XNMT : pousses infectées traitées avec NMT.

Figure 5. Niveaux d'expression des gènes liés aux voies ABA (*aa9*), JA (*opr3*) et éthylène (*acs3*) dans les pousses de tomates, quantifiés par qPCR. Les données sont représentées par les moyennes et les écarts-types. Les groupes non infectés/traités au contrôle négatif (C), par rapport au contrôle négatif (a); (b, d, f) représentent les niveaux du contrôle positif (X) par rapport aux pousses infectées/traitées par rapport au contrôle positif (X). Toutes les valeurs sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ SD (n = 3). Les valeurs marquées d'un astérisque sont statistiquement différentes selon la comparaison Dunnett (n = 3). Les test des fils ($p < 0,05$). C : pousses non infectées et non traitées ; X : pousses infectées non traitées ; S : test des pousses non infectées (p < 0,05). C : pousses non infectées et non traitées ; X : pousses infectées non traitées ; S : pousses non infectées traitées avec l'HE de *Satureja montana* ; SNMT : pousses non infectées traitées à l'HE de *Satureja montana* + NMT traitées à l'HE de *Satureja montana* ; SNMT : pousses non infectées traitées avec *Satureja montana* EO + NMT

formulation; NMT : pousses non infectées traitées au NMT ; XS : pousses infectées traitées avec *Satureja montana* l'HE du Montana; XSNMT : pousses infectées traitées avec la formulation *Satureja montana* EO + NMT ; XNMT : pousses infectées traitées avec NMT.

3.5. Quantification des

hormones La méthode HPLC-DAD validée a été appliquée pour déterminer le profil des phytohormones dans les pousses de tomates soumises aux différentes conditions. Dans ce contexte, les niveaux d'IAA des pousses non infectées traitées avec la formulation EO + NMT ont augmenté de manière significative ($p < 0,05$) (Figure 6a). L'application de formulations NMT et EO + NMT sur les pousses de tomates infectées a également entraîné une augmentation significative de la teneur en IAA (Figure 6b). Quant à GA3, ABA, JA et MeJA, aucun changement significatif n'a été observé dans les échantillons par rapport aux contrôles respectifs (C et X) (Figure 6c – j). Les niveaux de BAP et de SA ont également été évalués, bien qu'ils soient inférieurs au seuil minimum de quantification.

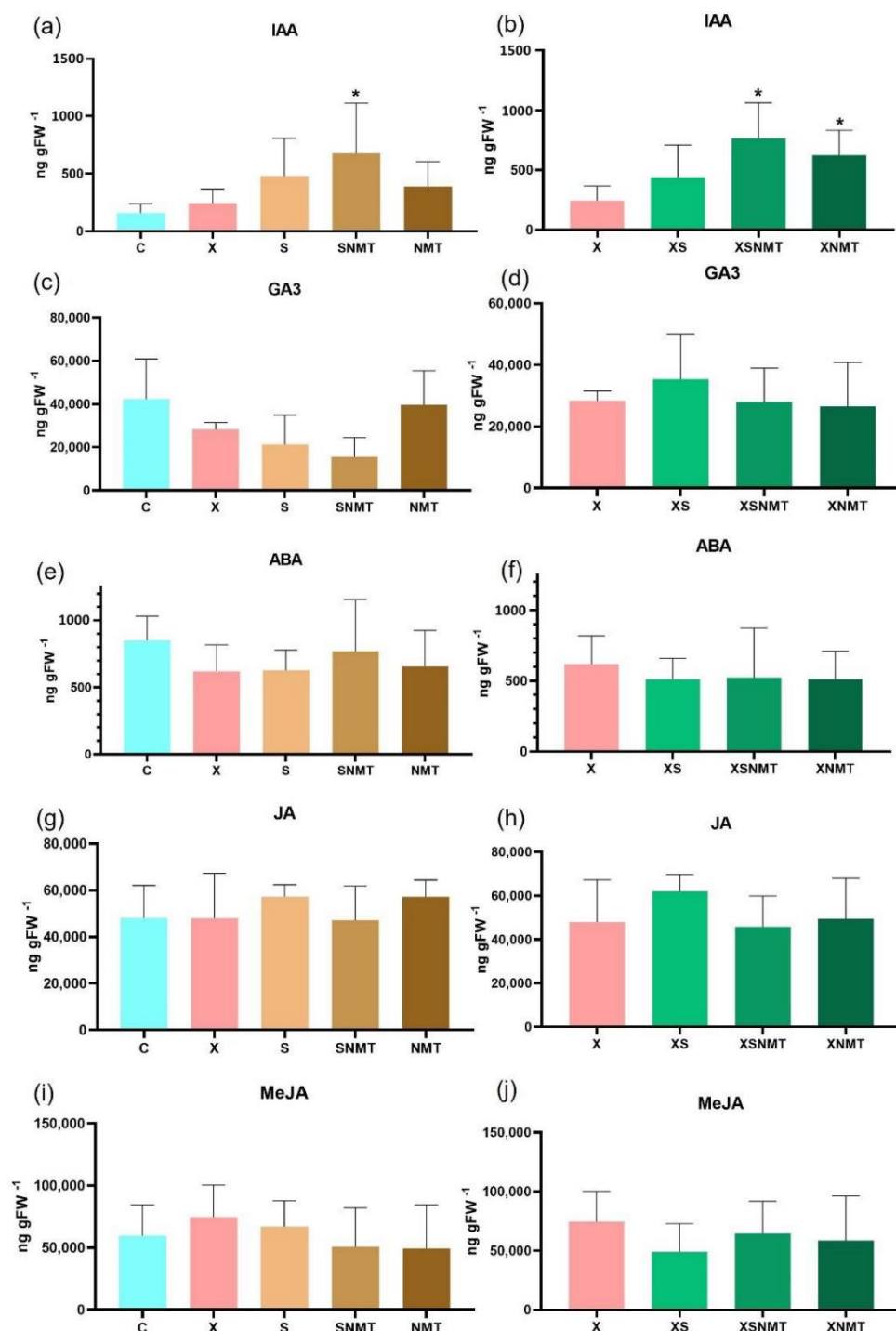


Figure 6. Quantification phytohormonale de l'IAA (a, b) ; GA3 (c,d); ABA (e,f); JA (g,h); et MeJA (i,j) par

HPLC-PAPA. (a,c,e,g,i) représentent les niveaux sur les groupes non infectés/traités et le contrôle positif (X) par rapport au contrôle négatif (C) ; (b, d, f, h, j) représentent les niveaux de groupes infectés/traités par rapport au contrôle positif (X). Toutes les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD ($n = 3$). Les moyennes marquées d'un « * » sont statistiquement différentes du contrôle respectif selon le test de comparaison de Dunnett ($p < 0,05$). C : pousses non infectées et non traitées ; X : pousses infectées non traitées ; S : pousses non infectées traitées avec l'HE de *S. montana* ; SNMT : pousses non infectées traitées avec la formulation *S. montana* EO + NMT ; NMT : pousses non infectées traitées au NMT ; XS : pousses infectées traitées avec l'HE de *S. montana* ; XSNMT : pousses infectées traitées avec la formulation *S. montana* EO + NMT ; XNMT : pousses infectées traitées au NMT.

4. Discussion

Les stratégies actuelles de lutte contre la maladie de BS chez la tomate reposent toujours sur des composés à base de Cu. L'émergence de *Xanthomonas* résistants au Cu sur le terrain [50] a accéléré la recherche d'alternatives viables. En outre, les politiques de l'UE en matière d'agriculture biologique tendent vers le remplacement du Cu par des composés biodégradables et sans danger pour l'environnement. Par conséquent, la NMT et les formulations contenant d'autres produits antimicrobiens naturels apparaissent comme des outils prometteurs pour intégrer les stratégies de gestion des maladies, en raison de leurs propriétés antimicrobiennes [12]. Cependant, il existe quelques difficultés dans l'application de ces composés sur le terrain, notamment dans le cas des HE, en raison de leur dégradation rapide et de la forte volatilité de la phase organique [51].

Les HE d'autres *Satureja* spp. ont déjà été testés contre d'autres *Xanthomonas* spp. [23]. Nos résultats montrent que, 24 h après l'inoculation de Xeu, l'HE de *S. montana* dans une émulsion aqueuse, ou intégrée dans la NMT sous forme de formulation, n'était pas capable de réduire la quantité de Xeu sur les pousses de tomates ; cela peut être dû au taux de libération contrôlée de l'EO par le NMT, qui peut avoir une influence significative sur l'activité antimicrobienne à court terme de ces matériaux [52]. Cependant, Oliveira-Pinto et al. [12] ont démontré les propriétés antimicrobiennes de cette formulation EO-NMT dans une étude à plus long terme. Il est intéressant de noter que le NMT seul était capable de réduire considérablement la densité cellulaire de Xeu, ce qui est conforme à ce qui a été rapporté par Oliveira-Pinto et al. [12] concernant le potentiel antimicrobien du NMT contre Xeu et confirme le potentiel de cette nanoargile en tant qu'agent de contrôle du Xeu en agriculture (Figure 1). Le potentiel antimicrobien des nanoargiles NMT dans la littérature est généralement associé à leur combinaison avec des composés organiques ou avec des métaux (par exemple, [53, 54]). En agriculture, le NMT a été principalement exploré comme outil de distribution de composés organiques, à savoir les EO [55,56]. Cependant, leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens capables d'intégrer des stratégies de gestion des maladies des plantes reste peu exploré. Nos données démontrent clairement que ces composés minéraux sont des produits prometteurs agissant seuls (ou comme supports) pour contrôler la BS.

Nos données indiquent également que le NMT et la formulation possèdent une activité antioxydante à court terme dans les pousses infectées par Xeu, réduisant à la fois les radicaux H_2O_2 et superoxyde (Figure 2). Les HE de *S. montana* ont également réduit le H_2O_2 , ces résultats étant alignés sur les activités antioxydantes attribuées aux HE de *S. montana* par Miladi et al. [57]. Ces réductions de la teneur en ROS des pousses infectées ont finalement conduit à une réduction des dommages oxydatifs des lipides, via une réduction de la teneur en MDA des cellules de tomate (Figure 3). Il est intéressant de noter que l'application de traitements sur les pousses de tomates non infectées a entraîné une augmentation de la teneur en superoxyde (Figure 2), ce qui a entraîné un niveau plus élevé de dommages lipidiques (Figure 3). Cela suggère que, lorsqu'elles sont appliquées à des pousses saines, les formulations NMT, EO + NMT et l'EO de *S. montana* pourraient agir comme éliciteurs de défense, déclenchant des réponses de défense des plantes contre les agents pathogènes bactériens. Lucas et coll. [58] ont rapporté que les HE d'autres espèces (par exemple, citronnelle, clou de girofle, cannelle, citronnelle, eucalyptus, thym et thé) pourraient agir comme éliciteurs de défense chez les plantes. Bien que les mécanismes moléculaires d'action de ces HE restent flous, il est ici démontré qu'il existe une activation des voies oxydatives. De plus, l'augmentation de la teneur en ROS n'a pas entraîné de dommages lipidiques lorsque la formulation NMT ou EO + NMT a été appliquée aux pousses non infectées (Figure 3). Ces données montrent que le

NMT joue un rôle protecteur contre les dommages lipidiques causés par la surproduction de ROS. D'autres études sont nécessaires pour explorer les voies de signalisation et métaboliques déclenchées en réponse à l'application de NMT ou d'EO, ainsi que leur potentiel en tant qu'atténuateurs de stress et produits préventifs dans les systèmes de production végétale.

Concernant la régulation de la voie phénylpropanoïde, il y a eu une régulation positive de *chs1* dans les pousses infectées par Xeu (X). Une réponse similaire s'est produite lorsque la formulation EO + NMT a été appliquée aux pousses non infectées. Le NMT a régulé positivement les deux gènes de cette voie (Figure 4), soulignant le rôle central de la voie phénylpropanoïde dans l'infection à *Xanthomonas*, comme indiqué précédemment par Du et al. [59], et Oliveira-Pinto et al. [43], et corroborant l'hypothèse selon laquelle, lorsqu'elle est appliquée à des hôtes non infectés, la NMT agit comme un éliciteur de défense, amorçant les défenses immunitaires des plantes.

L'infection par Xeu et l'application de la formulation ont favorisé une augmentation des transcriptions *aao*, tandis que le NMT a réduit les mêmes transcriptions (Figure 5). Malgré cette régulation négative de *aao*, la quantification de l'ABA n'a révélé aucun changement dans la teneur en ABA sur les pousses non infectées (Figure 6c). Ainsi, la régulation négative de *aao* n'était pas suffisante pour supprimer l'ensemble de la voie, entraînant une réduction de l'ABA. Cependant, lorsqu'ils ont été appliqués aux pousses infectées, les traitements ont été incapables de réduire immédiatement les niveaux d'*aao* et n'ont donc pas supprimé la voie ABA, ce qui est confirmé par la quantification HPLC (Figure 6d). Les plantes soumises à un stress biotique produisent de l'éthylène et de l'JA, en cas de nécrose [60]. Les résultats montrent que la nanoargile a régulé positivement l'*opr3* (voie JA), qui est fondamentale dans la suppression des infections bactériennes. Cependant, l'augmentation des transcriptions liées à JA ne s'est pas accompagnée d'une accumulation de JA, ou de son conjugué ester méthylique (MeJA), dans les pousses (Figure 6e, g), ce qui suggère qu'un mécanisme post-traductionnel est en place, régulant la production de JA. De plus, les niveaux de GA3 (l'une des formes les plus bioactives d'acide gibbérélique) n'ont subi aucun changement significatif du fait de l'application de traitements ou de la présence d'agents pathogènes (Figure 6i, j). Ce manque de réponse GA pourrait être dû au fait que cette hormone joue un rôle plus important contre les pathogènes nécrotrophes (par exemple *Erwinia amylovora*) en médiateur de la réponse JA/ET (61).

L'accumulation de transcrits *opr3* par l'application de traitements sur les pousses infectées peut indiquer que les augmentations observées dans la voie ABA (Figure 5b) n'étaient pas suffisantes pour supprimer le rôle de JA et faciliter l'infection par *Xanthomonas*, comme rapporté par Long et al. [62]. L'éthylène joue un rôle clé dans les défenses des plantes contre les agents pathogènes bactériens, ses niveaux augmentant lorsque les plantes sont soumises à un stress biotique [63] et de faibles niveaux d'éthylène sont connus pour augmenter la sensibilité d'*Arabidopsis thaliana* à *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* [64]. De plus, Guan et al. [65] ont rapporté que les lignées mutantes d'*A. thaliana* présentant une production déficiente d'ACC présentaient également une susceptibilité accrue à l'infection par *Pseudomonas syringae*. L'IAA est connue pour stimuler la production d'éthylène dans les tissus végétaux en favorisant la synthèse de l'ACC et de l'ACC oxydase (66). Ainsi, l'augmentation significative des niveaux d'IAA observée lorsque l'EO-NMT a été appliqué aux pousses non infectées (Figure 6a) et lorsque l'EO-NMT ou le NMT seul ont été appliqués aux pousses infectées (Figure 6b), pourrait s'expliquer par une activation de la voie de synthèse de l'éthylène, via l'ACC et l'ACC oxydase. Cependant, les transcrits *aco3* n'ont été régulés positivement que par l'application de la formulation dans les pousses non infectées (Figure 5c), ce qui suggère que d'autres transcrits de la voie de biosynthèse de l'éthylène (*aco1*) pourraient jouer un rôle plus pertinent dans la synthèse de l'éthylène en réponse à l'application d'EO, qui est actuellement à l'étude.

5. Conclusions

En conclusion, la NMT réduit fortement l'infection bactérienne des pousses de tomate, tout en diminuant les niveaux d'expression des gènes liés à la défense, en réduisant la production de ROS et en protégeant la tomate contre les dommages oxydatifs, contribuant ainsi à améliorer l'état de santé global des pousses. De plus, d'autres traitements (formulation/émulsion EO-eau) peuvent agir comme éliciteurs de défense, améliorant la production de ROS et régulant positivement les voies hormonales et phénylpropanoïdes dans les pousses non infectées. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la NMT est un outil prometteur pour la gestion à court terme de Xeu chez la tomate, tandis que le

Les formulations EO et EO + NMT de *S. montana* pourraient mieux agir en tant qu'éliciteurs de défense et leur rôle dans la prévention des maladies doit donc être mieux exploré. D'autres études sur les plantes sont nécessaires pour évaluer correctement le potentiel de ces produits pour des applications sur le terrain et pour clarifier l'utilisation potentielle de ces composés comme éliciteurs de défense.

Documents supplémentaires : Les informations complémentaires suivantes peuvent être téléchargées à l'adresse : <https://www.mdpi.com/article/10.3390/applnano3030009/s1>, Tableau S1 : Chiffres analytiques de mérite obtenus avec la méthodologie HPLC-DAD proposée pour la quantification des phytohormones ; Tableau S2 : Valeurs de récupération de la méthodologie proposée pour la quantification des phytohormones dans les extraits de feuilles de tomate (n = 3 pour chaque concentration). La référence [67] est citée dans les documents supplémentaires.

Contributions des auteurs : Conceptualisation, PRO-P., NM-P., RMOFS, MF-F. et CS ; culture de pousses de tomates, PRO-P., soutenue par NM-P. ; quantification des hormones, PRO-P., RLG et EC, soutenus par CGA et MCBSMM ; toutes les autres analyses, PRO-P., prises en charge par NM-P. ; rédaction - préparation du projet original, PRO-P., soutenu par NM-P. Tous les auteurs ont lu et accepté la version publiée du manuscrit.

Financement : Cette recherche a été financée par le Fonds européen d'investissement à travers le Programme opérationnel COMPETE 2020 pour la compétitivité et l'internationalisation (POCI) et par les fonds nationaux de la Fondation portugaise pour la science et la technologie (FCT) (02/SAICT/2017, Réf. PTDC/BAAAGR/31131/2017, Acronyme EOIS-CropProt). Les Fonds Nationaux à travers le FCT (Portugal) ont également financé ce travail dans le cadre de GreenUPorto, unité de recherche FCUP : projets UIDB/05748/2020 et UIDP/05748/2020 ; Unité de recherche CITAB, UTAD : projet UIDB/04033/2020 ; Unité de recherche LAQV-REQUIMTE (UIDB/QUI/50006/2020). De plus, NM-P. a été financé par une bourse de thèse SFRH/BD/138187/2018.

Déclaration de disponibilité des données : les auteurs fourniront des données sur demande.

Remerciements : Les auteurs tiennent à remercier le professeur Fernando Tavares du laboratoire de MDE (FCUP, Porto, Portugal) pour avoir fourni la souche bactérienne et les techniques de culture bactérienne utilisées dans ce travail.

Conflits d'intérêts : Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

Les références

- Liao, YY; Strayer-Scherer, AL; Blanc, J.; Mukherjee, A.; De La Torre-Roche, R.; Ritchie, L.; Colee, J.; Vallad, GE; Freeman, JH; Jones, JB Oxyde de nano-magnésium : Un nouveau bactéricide contre *Xanthomonas perforans* tolérant au cuivre, provoquant la tache bactérienne de la tomate. *Phytopathologie* 2019, 109, 52-62. [Référence croisée]
- Liao, YY; Huang, Y.; Carvalho, R.; Choudhary, M.; Da Silva, S.; Colee, J.; Huerta, A.; Vallad, GE; Freeman, JH; Jones, JB; et coll. Nanomatériau d'oxyde de magnésium, une alternative aux bactéricides commerciaux au cuivre : gestion des maladies bactériennes des taches bactériennes de la tomate à l'échelle du champ et accumulation totale et biodisponible de métaux dans le sol. *Environ. Sci. Technologie*. 2021, 55, 13561-13570. [Référence croisée]
- Qiao, K.; Liu, Q.; Huang, Y.; Xia, Y.; Zhang, S. Gestion des taches bactériennes de la tomate causées par *Xanthomonas perforans* résistant au cuivre à l'aide d'un composé à petites molécules, le carvacrol. *Protection des cultures*. 2020, 132, 105114. [Réf. croisée]
- Smith, SL; Campos, MG; Ozcan, A.; Mendis, SC; Jeune, M.; Myers, MOI; Atilola, M.; Doomra, M.; Twinin, Z.; Johnson, par exemple ; et coll. Formulation thérapeutique multifonctionnelle de surface, souterraine et systémique (MS3T) pour le contrôle du chancre des agrumes. *J. Agric. Chimie alimentaire*. 2021, 69, 10807-10818. [Référence croisée]
- El Miz, M.; Salhi, S.; Chraïbi, I.; El Bachiri, A.; Fauconnier, ML; Tahani, A. Caractérisation et étude d'adsorption du thymol sur bentonite à piliers. *Ouvrez J. Phys. Chimique*. 2014, 4, 98-116. [Référence croisée]
- De Oliveira, LH; Trigueiro, P.; Souza, JSN; de Carvalho, MS; Osajima, JA; da Silva-Filho, CE; Fonseca, MG Montmorillonite avec des huiles essentielles comme agents antimicrobiens, emballages, répulsifs et insecticides : un aperçu. *Surf sur les colloïdes. B* 2022, 209, 112186. [Référence croisée]
- Yenduri, R. Nanoclays : Une nouvelle voie pour l'administration de médicaments. *CE Pharmacol. Toxicol. ECO* 2019, 2, 20-22.
- Rawat, K.; Agarwal, S.; Tyagi, A.; Verma, A.; Bohidar, HB Cytotoxicité dépendante du rapport d'aspect et propriétés antimicrobiennes de nanoargile. *Appl. Biochimie. Biotechnologie*. 2014, 174, 936-944. [Référence croisée]
- Giannakas, A. Na-Montmorillonite vs Montmorillonite organiquement modifiée en tant que nanosupports d'huile essentielle pour les films d'emballage actifs nanocomposites de polyéthylène basse densité extrudés par fusion avec une activité antioxydante contrôlable et de longue durée. *Nanomatériaux* 2020, 10, 1027. [CrossRef]
- Tsakalias, IS; Loukidi, A.; Chatzimichailidou, S.; Salmas, CE; Giannakas, AE; Achilias, DS Effet des nanohybrides de montmorillonite/huile essentielle Na et organo-modifiés sur la cinétique de la polymérisation radicalaire in situ du styrène. *Nanomatériaux* 2021, 11, 474. [CrossRef]

11. Mérimos, D. ; Mansilla, AY; Casalongué, Californie ; Alvarez, VA Préparation, caractérisation et tests in vitro des activités antimicrobiennes des nanoargiles et de leur capacité élicitrice. J. Agric. Chimie alimentaire. 2018, 66, 3101-3109. [\[Référence croisée\]](#)
12. Oliveira-Pinto, PR ; Mariz-Ponte, N. ; Torres, A. ; Tavares, F. ; Fernandes-Ferreira, M. ; Sousa, RM; Santos, l'huile essentielle de C. Satureja montana L., la montmorillonite et la nanoformulation réduisent l'infection par Xanthomonas euvesicatoria, modulant les voies rédox et hormonales des plants de tomates. Sci. Hortique. 2022, 295, 110861. [\[Réf. croisée\]](#)
13. Hanif, MA; Nisar, S. ; Khan, GS ; Mushtaq, Z. ; Zubair, M. Huiles essentielles. Dans Essential Oil Research, 1ère éd.; Malik, S., éd.; Springer : Berlin, Allemagne, 2019 ; p. 3-17.
14. Franz, C. ; Novak, J. Sources d'huiles essentielles. Dans Manuel des huiles essentielles, 1ère éd. ; Baser, KSC, Buchbauer, G., éd. ; CRC Press : Boca Raton, FL, États-Unis, 2020 ; pp. 41-83.
15. Homme, A. ; Santacroce, L. ; Jacob, R. ; Jument, A. ; Man, L. Activité antimicrobienne de six huiles essentielles contre un groupe d'agents pathogènes humains : une étude comparative. Pathogènes 2019, 8, 15. [\[CrossRef\]](#)
16. Guo, F. ; Chen, Q. ; Liang, Q. ; Zhang, M. ; Chen, W. ; Chen, H. ; Yun, Y. ; Zhong, Q. ; Chen, W. Activité antimicrobienne et proposition Mécanisme d'action du linalol contre Pseudomonas fluorescens. Devant. Microbiol. 2021, 12, 49. [\[Réf. croisée\]](#)
17. Ozogul, Y. ; Kuley, E. ; Ucar, Y. ; Ozogul, F. Impacts antimicrobiens des huiles essentielles sur les pathogènes d'origine alimentaire. Pat récent. Alimentaire Nutr. Agricole. 2015, 7, 53-61. [\[Référence croisée\]](#)
18. Ju, J. ; Xie, Y. ; Guo, Y. ; Cheng, Y. ; Qian, H. ; Yao, W. L'effet inhibiteur des huiles essentielles végétales sur les bactéries pathogènes d'origine alimentaire présentes dans les aliments. Critique. Révérend Food Sci. Nutr. 2019, 59, 3281-3292. [\[Référence croisée\]](#)
19. Granata, G. ; Stracquandano, S. ; Leonardi, M. ; Naples, E. ; Malandrino, G. ; Cafiso, V. ; Stefani, S. ; Geraci, C. Huiles essentielles d'origan et de thym encapsulées dans des nanoparticules de chitosane en tant qu'agents antimicrobiens efficaces contre les agents pathogènes d'origine alimentaire. Molécules 2021, 26, 4055. [\[CrossRef\]](#)
20. Elshafie, HS; Grul'ová, D. ; Baranova, B. ; Caputo, L. ; De Martino, L. ; Sedlak, V. ; Camele, I. ; De Feo, V. Activité antimicrobienne et composition chimique de l'huile essentielle extraite de Solidago canadensis L. poussant à l'état sauvage en Slovaquie. Molécules 2019, 24, 1206. [\[Référence croisée\]](#)
21. Della Pepa, T. ; Elshafie, HS; Capasso, R. ; De Feo, V. ; Camele, I. ; Nazzaro, F. ; Scognamiglio, MR; Caputo, L. Activité antimicrobienne et phytotoxique des huiles essentielles d'Origanum heracleoticum et d'O. majorana poussant dans le Cilento (sud de l'Italie). Molécules 2019, 24, 2576. [\[CrossRef\]](#)
22. Kotan, R. ; Cakir, A. ; Dadasoglu, F. ; Aydin, T. ; Cakmakci, R. ; Ozer, H. ; Kordali, S. ; Mete, E. ; Dikbas, N. Activités antibactériennes des huiles essentielles et extraits des espèces turques Achillea, Satureja et Thymus contre les bactéries phytopathogènes. J. Sci. Agriculture alimentaire. 2010, 90, 145-160. [\[Référence croisée\]](#)
23. Kotan, R. ; Dadaso "glu, F. ; Karagoz, K. ; Cakir, A. ; Ozer, H. ; Kordali, S. ; Cakmakci, R. ; Dikbas, N. Activité antibactérienne de l'huile essentielle et des extraits de Satureja hortensis contre les bactéries phytopathogènes et leur utilisation potentielle comme désinfectants pour les semences. Sci. Hortique. 2013, 153, 34-41. [\[Référence croisée\]](#)
24. Costa, P. ; Medronho, B. ; Gonçalves, S. ; Romano, A. Les cyclodextrines améliorent l'activité antioxydante de l'huile essentielle. Cultures ind. Prod. 2015, 70, 341-346. [\[Référence croisée\]](#)
25. Cui, H. ; Wang, Y. ; Li, C. ; Chen, X. ; Lin, L. Efficacité antibactérienne de l'huile essentielle de Satureja montana L. encapsulée dans un hydrogel de polysaccharide soluble de méthyl-β-cyclodextrine/soja et son évaluation en tant que conservateur de viande. LWT 2021, 152, 112427. [\[CrossRef\]](#)
26. Cadena, Manitoba; Preston, directeur général ; Van der Hoorn, RA; Flanagan, Caroline du Nord ; Townley, HE ; Thompson, IP Améliorer l'activité de l'huile essentielle de cannelle par encapsulation de nanoparticules pour contrôler les agents pathogènes des graines. Cultures ind. Prod. 2018, 124, 755-764. [\[Référence croisée\]](#)
27. Chouhan, S. ; Sharma, K. ; Guleria, S. Activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles : état actuel et perspectives futures. Médicaments 2017, 4, 58. [\[CrossRef\]](#)
28. Saucedo-Zuñiga, JN ; Sánchez-Valdes, S. ; Ramirez-Vargas, E. ; Guillen, L. ; Ramos-deValle, LF; Graciano-Verdugo, A. ; Uribe-Calderón, JA; Valera-Saragossa, M. ; Lozano-Ramirez, T. ; Rodríguez-González, JA; et coll. Libération contrôlée d'huiles essentielles à l'aide de nanoargiles laminaires et de composites poreux halloysite/huile essentielle dans un réservoir de film multicouche. Tapis mésoporeux microporeux. 2021, 316, 110882. [\[Réf. croisée\]](#)
29. Catara, V. ; Cubero, J. ; Pothier, JF; Bosis, E. ; Bragard, C. ; Dermic, E. ; Holeva, MC; Jacques, MA; Petter, F. ; Pruvost, O. ; et coll. Tendances en matière de diagnostic moléculaire et d'études sur la diversité des Xanthomonas réglementés en phytosanitaire. Microorganismes 2021, 9, 862. [\[Référence croisée\]](#)
30. Horvath, DM; Décrochage, RE ; Jones, JB ; Pauly, MH; Vallad, GE; Dahlbeck, D. ; Staskawicz, BJ; Scott, JW La résistance transgénique confère un contrôle efficace sur le terrain de la maladie bactérienne des taches chez la tomate. PLoS ONE 2012, 7, e42036. [\[Référence croisée\]](#)
31. Décrochage, RE ; Jones, JB ; Minsavage, GV Durabilité de la résistance de la tomate et du poivron aux xanthomonades provoquant des taches bactériennes. Ann. Révérend Phytopathol. 2009, 47, 265-284. [\[Référence croisée\]](#)
32. Potnis, N. ; Timilsina, S. ; Strayer, A. ; Shantharaj, D. ; Barak, JD; Paret, ML; Vallad, GE; Jones, JB Tache bactérienne de la tomate et du poivron : diverses espèces de Xanthomonas présentant une grande variété de facteurs de virulence posant un défi mondial. Mol. Pathologie végétale. 2015, 16, 907-920. [\[Référence croisée\]](#)
33. Jones, JB ; Zitter, TA; Momol, TM; Miller, SA Compendium des maladies et ravageurs de la tomate, American Phytopathological Society ; APS Presse : St. Paul, MN, États-Unis, 2014.
34. Egel, DS; Jones, JB ; Minsavage, GV ; Creswell, T. ; Ruhl, G. ; Maynard, E. ; Marchino, C. Distribution et caractérisation des souches de Xanthomonas provoquant des taches bactériennes sur la tomate dans l'Indiana. Programme de protection des végétaux. 2018, 19, 319-321. [\[Référence croisée\]](#)

35. Rojas, M. ; Peña, M. ; Peña-Vera, MJ; Sulbaran, M. ; Pérez, E. ; Velasquez, CL Caractérisation et détermination des profils de résistance aux antimicrobiens et aux métaux des souches de *Xanthomonas* isolées des milieux naturels. *J.Anal. Pharma. Rés.* 2019, 8, 55-60.
[\[Référence croisée\]](#)
36. Moretti, C. ; Amatulli, MT ; Buonauro, R. Test basé sur PCR pour la détection de *Xanthomonas euvesicatoria* provoquant la tache bactérienne du poivron et de la tomate. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009, 49, 466-471. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
37. Zhao, S. ; Fernald, RD Algorithme complet pour la réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel. *Cell Rep.* 2005, 12, 1047-1064.
[\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
38. Alexieva, V. ; Serguiev, I. ; Mapelli, S. ; Karanov, E. L'effet de la sécheresse et du rayonnement ultraviolet sur les marqueurs de croissance et de stress chez pois et blé. *Environnement des cellules végétales.* 2001, 24, 1337-1344. [\[Référence croisée\]](#)
39. Gajewska, E. ; Sklodowska, M. Effet du nickel sur la teneur en ROS et les activités enzymatiques antioxydantes dans les feuilles de blé. *BioMétaux* 2007, 20, 27-36. [\[Référence croisée\]](#)
40. Costa-Santos, M. ; Mariz-Ponte, N. ; Dias, MC; Moura, L. ; Marques, G. ; Santos, C. Effet de *Bacillus* spp. et *Brevibacillus* sp. sur la photosynthèse et le statut redox de *Solanum lycopersicum*. *Horticulturae* 2021, 7, 24. [\[CrossRef\]](#)
41. Hodges, DM; DeLong, JM; Forney, CF; Prange, RK Amélioration du test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique pour estimer la peroxydation lipidique dans les tissus végétaux contenant des anthocyanes et d'autres composés interférents. *Planta* 1999, 207, 604-611. [\[Référence croisée\]](#)
42. Lovdal, T. ; Lillo, C. Sélection de gènes de référence pour la normalisation quantitative de la PCR en temps réel chez la tomate soumise à un stress azoté, froid et lumineux. *Anal. Biochimie.* 2009, 387, 238-242. [\[Référence croisée\]](#)
43. Oliveira-Pinto, PR ; Mariz-Ponte, N. ; Sousa, RMOF; Torres, A. ; Tavares, F. ; Ribeiro, A. ; Cavaco-Paulo, A. ; Fernandes-Ferreira, M. ; Santos, huile essentielle de *C. Satureja montana*, nanoparticules de zéine et leur combinaison en tant que stratégie de biocontrôle pour réduire les maladies bactériennes sur les plants de tomates. *Horticulturae* 2021, 7, 584.
[\[CrossRef\]](#)
44. Mariz-Ponte, N. ; Mendès, RJ ; Sario, S. ; De Oliveira, JF; Mélo, P. ; Santos, C. Les plants de tomates utilisent des voies antioxydantes non enzymatiques pour faire face à une irradiation UV-A/B modérée : une contribution à l'utilisation des UV-A/B en horticulture. *J. Physiol. végétal.* 2018, 221, 32-42. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
45. Horváth, E. ; Csiszár, J. ; Gallé, Á.; Pauvre, P. ; Szepesi, Á.; Tari, I. Le durcissement avec l'acide salicylique induit des changements dépendants de la concentration dans la biosynthèse de l'acide abscissique de la tomate sous stress salin. *J. Physiol. végétal.* 2015, 183, 54-63. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
46. Niwa, T. ; Suzuki, T. ; Takebayashi, Y. ; Ishiguro, R. ; Higashiyama, T. ; Sakakibara, H. ; Ishiguro, S. L'acide jasmonique facilite l'ouverture des fleurs et le développement des organes floraux grâce à l'expression régulée positivement du facteur de transcription SIMYB21 dans la tomate. *Biosci. Biotechnologie. Biochimie.* 2018, 82, 292-303. [\[Référence croisée\]](#)
47. Soleil, Q. ; Liu, L. ; Zhang, L. ; Lv, H. ; Lui, Q. ; Guo, L. ; Zhang, X. ; Li h.; Ren, S. ; Zhang, N. ; et coll. La mélatonine favorise la biosynthèse des caroténoïdes de manière dépendante de l'éthylène dans les tomates. *Scie végétale.* 2020, 298, 110580. [\[Réf. croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
48. Van Meulebroek, L. ; Bussche, JV; Steppe, K. ; Vanhaecke, L. Chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse Orbitrap haute résolution pour le profilage métabolomique de l'état phytohormonal endogène du plant de tomate. *J. Chromatogr. A* 2012, 1260, 67-80. [\[Référence croisée\]](#)
49. PCI. Ligne directrice tripartite harmonisée de l'ICH : Validation des procédures analytiques : texte et méthodologie Q2 (R1) ; PCI : Genève, Suisse-terrain, 2005.
50. Lai, YR ; Lin, CH; Chang, CP; Ni, HF; Tsai, WS; Huang, CJ Distribution des variantes du gène de résistance au cuivre de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* et *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. *Protection de l'usine. Sci.* 2021, 57, 206-216. [\[Référence croisée\]](#)
51. Wu, YW; Soleil, SQ ; Zhou, Q. ; Tao, JX ; Noda, I. Analyse de corrélation IR 2D dépendante de la volatilité de la médecine traditionnelle chinoise Préparation 'Huile de Fleur Rouge' de différents fabricants. *J. Mol. Structure.* 2008, 882, 107-115. [\[Référence croisée\]](#)
52. Tunç, S. ; Duman, S. Préparation de films nanocomposites antimicrobiens actifs de méthylcellulose/carvacrol/montmorillonite et enquête sur la libération de carvacrol. *LWT* 2011, 44, 465-472. [\[Référence croisée\]](#)
53. Roy, A. ; Joshi, M. ; Butola, BS Performance antimicrobienne des monofilaments nanocomposites de polyéthylène renforcés de métal nanoparticules décorées de montmorillonite. *Surf sur les colloïdes. B.* 2019, 178, 87-93. [\[Référence croisée\]](#)
54. Lui, Y. ; Fei, X. ; Li, H. Nanocomposites à base de carboxyméthylcellulose renforcés de montmorillonite et d' ϵ -poly-L-lysine pour emballage alimentaire actif antimicrobien. *J.Appl. Polyme. Sci.* 2020, 137, 48782. [\[Réf. croisée\]](#)
55. Hong, SI ; Rhim, JW Activité antimicrobienne des nanoargiles organiquement modifiées. *J. Nanosci. Nanotechnology.* 2008, 8, 5818-5824.
[\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
56. de Souza, AG; Dos Santos, NMA; Torin, RFS ; Rosa, DS Propriétés antimicrobiennes synergiques de l'huile essentielle de Carvacrol et de la montmorillonite dans des films d'amidon biodégradables. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 164, 1737-1747. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
57. Miladi, H. ; Ben Slama, R. ; Mili, D. ; Zouari, S. ; Bakhrouf, A. ; Ammar, E. Composition chimique et activités cytotoxiques et antioxydantes de l'huile essentielle de *Satureja montana* L. et son potentiel antibactérien contre *Salmonella* spp. souches. *J. Chem.* 2013, 2013, 275698. [\[Réf. croisée\]](#)
58. Lucas, GC; Alves, E. ; Pereira, RB; Perina, FJ ; Souza, RMD Activité antibactérienne des huiles essentielles sur *Xanthomonas vesicatoria* et contrôle des taches bactériennes sur la tomate. *Pesqui. Agropécu. Bras.* 2012, 47, 351-359. [\[Référence croisée\]](#)
59. Du, H. ; Wang, Y. ; Yang, J. ; Yang, W. Analyse comparative du transcriptome de lignées de tomates résistantes et sensibles en réponse à infection par *Xanthomonas perforans* race T3. *Devant. Scie végétale.* 2015, 6, 1173. [\[Réf. croisée\]](#)
60. Pieterse, CM; Van Loon, LC Voies de défense des plantes indépendantes de l'acide salicylique. *Tendances Plant Sci.* 1999, 4, 52-58. [\[Référence croisée\]](#)
61. Bari, R. ; Jones, JD Rôle des hormones végétales dans les réponses de défense des plantes. *Plante Mol. Biol.* 2009, 69, 473-488. [\[Référence croisée\]](#)

-
62. Long, Q. ; Xie, Y. ; Hé., Li, Q. ; Zou, X. ; Chen, S. L'acide abscissique favorise l'accumulation d'acide jasmonique et joue un rôle clé dans les agrumes développement du chancre. *Devant. Scie végétale*. 2019, 10, 1634. [\[Réf. croisée\]](#)
63. Ecker, JR; Davis, RW Les gènes de défense des plantes sont régulés par l'éthylène. *Proc. Natl. Acad. Sci. États-Unis* 1987, 84, 5202-5206. [\[Référence croisée\]](#)
64. Norman-Setterblad, C. ; Vidal, S. ; Palva, ET Les voies de signal en interaction contrôlent l'expression des gènes de défense chez Arabidopsis en réponse aux enzymes dégradant la paroi cellulaire d'*Erwinia carotovora*. *Mol. Interaction entre les microbes végétaux*. 2000, 13, 430-438. [\[Référence croisée\]](#)
65. Guan, R. ; Su, J. ; Meng, X. ; Li, S. ; Liu, Y. ; Xu, J. ; Zhang, S. La régulation multicouche de l'induction de l'éthylène joue un rôle positif dans la résistance d'Arabidopsis contre *Pseudomonas syringae*. *Physiol végétal*. 2015, 169, 299-312. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
66. Chae, HS; Cho, GY ; Parc, MON ; Lee, MC ; Eun, MON ; Kang, BG ; Kim, WT Les échanges hormonaux entre l'auxine et l'éthylène régulent différenciellement l'expression de deux membres de la famille des gènes de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase dans le riz (*Oryza sativa* L.). *Physiol des cellules végétales*. 2000, 41, 354-362. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
67. Communauté européenne. Décision de la Commission du 12 août 2002 mettant en œuvre la directive 96/23/CE du Conseil concernant les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats. Désactivé. *J.Eur. Commun*. 2002, 221, 8-36.