



LUIS ALBERTO SALTOS REZABALA

**MECANISMO DE AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA
REDUÇÃO DA SEVERIDADE DA PINTA PRETA DO
TOMATEIRO**

LAVRAS-MG

2022

LUIS ALBERTO SALTOS REZABALA

**MECANISMO DE AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA REDUÇÃO DA
SEVERIDADE DA PINTA PRETA DO TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Eduardo Alves
Orientador

LAVRAS-MG

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rezabala, Luis Alberto Saltos.

Mecanismo de ação de óleos essenciais na redução da
severidade da pinta preta do tomateiro / Luis Alberto Saltos
Rezabala. - 2022.

86 p.

Orientador(a): Eduardo Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Controle alternativo. 2. *Bacillus amyloliquefaciens*. *Thymus
vulgaris*. 3. Indução de resistência. Pinta preta. I. Alves, Eduardo.
II. Título.

LUIS ALBERTO SALTOS REZABALA

**MECANISMO DE AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA REDUÇÃO DA
SEVERIDADE DA PINTA PRETA DO TOMATEIRO**

**MECHANISM OF ACTION OF ESSENTIAL OILS IN DECREASING SEVERITY OF
TOMATO EARLY BLIGHT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 03 de março de 2022.

Dr. Eduardo Alves	DFP-UFLA
Dra. Rafaela Araújo Guimarães	DFP-UFLA
Dr. Fabiano José Perina	Embrapa Algodão



Prof. Dr. Eduardo Alves
Orientador

LAVRAS-MG

2022

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas suas benções.

À minha família por todo o apoio e conselhos que me deram à distância.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao programa de bolsas Brasil PAEC OEA-GCUB, pela oportunidade de cursar o mestrado aqui no Brasil.

Ao professor Eduardo Alves pela orientação e acolhida.

À Dra. Patrícia Ricardino da Silveira pela ajuda, ensino e colaboração no planejamento e condução dos experimentos.

Ao Dr. Silvino Intra Moreira e Dra. Dérica Gonçalves Tavares pelas sugestões e colaboração.

Aos meus amigos de laboratório Adriano Francis Dorigan, Indiara Carol Pinheiro e Gabriella Alves Ramos pela ajuda recebida.

À Ariane Alvarenga, secretaria do programa, por toda ajuda e esclarecimento das minhas dúvidas durante todo o mestrado.

À Joyce de Almeida Alves, diretora do Departamento de Relações Internacionais, pela acolhida, ajuda e guia durante toda minha estada aqui no Brasil.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Muito obrigado!

RESUMO

Atualmente, o uso de ferramentas alternativas ao controle químico tem se tornado uma das opções mais sustentáveis e ambientalmente amigáveis na proteção de culturas contra fitopatógenos. A produção do tomateiro é frequentemente restrita pela pinta preta (PP), uma doença altamente destrutiva causada pelo fungo fitopatógeno *Alternaria* spp. Com base nesse problema, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de óleos essenciais (OEs) e o agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 no controle da PP. Foram testados os efeitos da atividade antifúngica, indução de resistência, promoção do crescimento e produtividade dos OEs de tomilho (*Thymus vulgaris*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e o ACB MBI600 no controle de *A. linariae* no tomateiro. Sob condições *in vitro*, os OEs de tomilho (2000 ppm), capim-limão (2000 ppm), e o ACB MBI600 (500 ppm) inibiram o crescimento micelial de *A. linariae* em 100, 100 e 87.47 %, respectivamente. A menor porcentagem de germinação de conídios foi apresentada no tratamento com OE de tomilho (0.89 %) e OE de capim-limão (1.11 %). O OE de melaleuca mostrou reduzida atividade antifúngica sobre *A. linariae*. A porcentagem de área foliar infectada aos oito dias após a inoculação (DAI) foi 46.78 e 66.29 % menor com pulverizações foliares do OE de tomilho e ACB BMI600, respectivamente, comparada com plantas apenas inoculadas. A severidade final da doença (70 DAI) no tratamento com o ACB MBI600 (36.74 %) e OE de tomilho (42.00 %) foram significativamente inferiores ao tratamento controle (68.81 %) ($P \leq 0.05$). As pulverizações foliares do ACB MBI600 e OE de tomilho induziram a resistência em plantas de tomate, com o incremento da atividade das enzimas relacionadas à defesa; peroxidase, polifenol oxidase e β -1,3-glucanase, apresentando máxima atividade às 144, 192 e 192 horas após a inoculação, respectivamente, e em menor magnitude a fenilalanina amônia-liase. A deposição de calose, acúmulo de lignina e fenóis em tecidos infectados por *A. linariae* melhoraram após a aplicação do ACB MBI600 e OE de tomilho, enquanto o ACB MBI600 aumentou a altura de planta, número de folhas e produtividade. Neste estudo, o ACB MBI600 e OE de tomilho apresentaram alta atividade antifúngica em condições *in vitro*. Enquanto, sob condições *in vivo*, tanto o ACB MBI600 quanto o OE de tomilho estimularam o sistema de defesa de plantas de tomateiro infectadas por *A. linariae*, o qual foi associado com a redução da severidade da PP. Estes resultados indicam que o OE de tomilho e o ACB MBI600 são ferramentas potenciais no manejo da PP do tomateiro.

Palavras-chave: Controle alternativo. *Bacillus amyloliquefaciens*. *Thymus vulgaris*. Indução de resistência. Pinta preta.

ABSTRACT

Currently, the use of alternative tools to chemical control has become one of the most sustainable and eco-friendly options for crop protection against phytopathogens. Tomato production is frequently restricted by early blight (EB), a highly destructive disease caused by the phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. Based on this problem, the present study aimed to evaluate the effect of essential oils (EOs) and the biological control agent (BCA) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 for control of EB. The effect of antifungal activity, resistance induction, growth and productivity of the EOs of thyme (*Thymus vulgaris*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and BCA MBI600 were tested for control of *A. linariae* in tomato plants. Under *in vitro* conditions, the mycelial growth of *A. linariae* was strongly inhibited at 100, 100 and 87.47 % when applied thyme EO (2000 ppm), lemongrass EO (2000 ppm), and BCA MBI600 (500 ppm), respectively. The treatment with thyme EO (0.89%) and lemongrass EO (1.11%) had the lowest percentage of conidia germination. Tea tree EO showed reduced antifungal activity on *A. linariae*. The percent of infected leaf area at eight days after inoculation (DAI), sprayed with thyme EO and BCA MBI600, was 46.78 and 66.29 % lower than the plants only inoculated. The final disease severity (70 DAI) in the treatment with the BCA MBI600 (36.74%) and thyme EO (42.00 %) was significantly lower than the control treatment (68.81%) ($P \leq 0.05$). Foliar spraying with BCA MBI600 and thyme EO induced resistance in tomato plants, with increased activity of defense-related enzymes; peroxidase, polyphenol oxidase and β -1,3-glucanase, showing maximum activity at 144, 192 and 192 hours after inoculation, respectively, and to a minor extent phenylalanine ammonia-lyase. After BCA MBI600 and thyme EO application, callose deposition, lignin, and phenol accumulation in infected tissues by *A. linariae* improved, whereas the BCA MBI600 increased plant height, number of leaves, and yield. In this study, BCA MBI600 and thyme EO showed high antifungal activity *in vitro* conditions. Furthermore, under *in vivo* conditions, both BCA MBI600 and thyme EO stimulated the defense system of tomato plants infected by *A. linariae*, which was associated with reduced severity of EB. These results indicate that thyme EO and BCA MBI600 are potential tools in tomato EB disease management.

Keywords: Alternative control. *Bacillus amyloliquefaciens*. *Thymus vulgaris*. Resistance induction. Early blight.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	A cultura do tomateiro.....	13
2.2	O gênero <i>Alternaria</i> e suas características.....	14
2.3	Pinta preta do tomateiro: o agente causal.....	15
2.4	Controle alternativo de <i>Alternaria</i> spp.....	17
2.4.1	Óleos essenciais (OEs) no controle de doenças de plantas.....	18
2.4.2	Mecanismos de ação dos óleos essenciais.....	21
2.5	Bactérias como agentes de controle biológico.....	22
2.6	Sistema enzimático de defesa.....	23
2.6.1	Peroxidasas.....	25
2.6.2	Polifenol oxidase.....	25
2.6.3	Fenilalanina amônia-liase	26
2.6.4	β -1,3-glucanase	26
2.7	Microscopia aplicada à análise histológica de tecidos vegetais infectados por patógenos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Local da pesquisa.....	28
3.2	Óleos essenciais, agente de controle biológico e fungicidas.....	28
3.3	Obtenção e caracterização molecular do isolado fúngico.....	28
3.4	Manutenção do isolado.....	29
3.5	Ensaio <i>in vitro</i> da atividade antifúngica de óleos essenciais e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBI600 no controle de <i>Alternaria linariae</i>	29
3.5.1	Inibição do crescimento micelial.....	29
3.5.2	Germinação de conídios	33
3.6	Ensaio <i>in vivo</i> da atividade antifúngica do OE de tomilho e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBI600 no controle de <i>Alternaria linariae</i>	34
3.6.1	Preparação do inóculo.....	34
3.6.2	Condições do experimento.....	34
3.7	Análise bioquímica da atividade de enzimas relacionadas à defesa	36

3.7.1	Obtenção dos extratos enzimáticos.....	36
3.7.2	Determinação da atividade enzimática: Peroxidases, Fenilalanina amônia-liase, Polifenol oxidases e β -1,3-glucanase.....	36
3.8	Análise histoquímica de tecidos foliares infectados ou não por <i>Alternaria linariae</i>	37
3.9	Análises estatísticas dos dados.....	38
4	RESULTADOS	40
4.1	Identificação molecular do isolado fúngico.....	40
4.2	Atividade antifúngica <i>in vitro</i> de óleos essenciais e <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> MBI600 no controle de <i>Alternaria linariae</i>	42
4.2.1	Inibição do crescimento micelial.....	42
4.2.2	Germinação de conídios (%).....	45
4.3	Atividade antifúngica <i>in vivo</i> do OE de tomilho e <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> MBI600 no controle de <i>Alternaria linariae</i>	47
4.3.1	Área foliar infectada.....	47
4.3.2	Severidade e área abaixo da curva do progresso da doença.....	47
4.3.3	Parâmetros de crescimento vegetativo.....	50
4.3.4	Parâmetros reprodutivos.....	52
4.3.5	Correlações de Pearson.....	52
4.4	Atividade de enzimas relacionadas à defesa.....	54
4.5	Histoquímica de tecidos foliares infectados ou não infectados por <i>Alternaria linariae</i>	55
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÕES	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é a hortaliça mais importante em termos econômicos do mundo e em relação à produtividade total é o segundo, ficando atrás, apenas da batata (LI et al., 2018). A produção mundial de tomate para o ano 2020 foi de 186.821.216 t, destacando-se a China e a Índia como os maiores produtores, enquanto que o Brasil produziu 3.917.967 t (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2020). O tomate fornece alto valor nutricional a dieta humana, com o aporte de carboidratos, proteínas, lipídios, carotenóides, vitaminas (A e C), minerais e compostos fenólicos (SALEHI et al., 2019).

A produção de tomate é acometida por inúmeras doenças fúngicas, entre elas, a Pinta Preta (PP) do tomateiro, causada por *Alternaria* spp. (FOOLAD; MERK; ASHRAFI, 2008). *Alternaria* spp. são fungos cosmopolitas, que sobrevivem como necrotróficos, saprófagos e a maioria são fitopatógenos (NAGRALE et al., 2016). A PP é uma das doenças mais comuns e destrutivas da cultura do tomateiro, plantadas em ambientes com alta umidade, chuvas e elevadas temperaturas (24 – 29°C) (CHAERANI; VOORRIPS, 2006). Os sintomas característicos da PP em folhas são: manchas de cor marrom a preta com anéis concêntricos e leve depressão no centro da lesão, e nos estádios avançados da doença observa-se severo desfolhamento (SANOUBAR; BARBANTI, 2017). Ocasionalmente, pode causar podridão do coleto em plântulas (*damping off*), lesões nos caules e podridão dos frutos (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017). Em alguns casos, as perdas anuais de rendimento econômico devido à PP foram estimadas até 79% (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017).

O desenvolvimento de variedades de tomate resistentes à PP tem sido limitado pela falta de genes de resistência, por tanto, atualmente o manejo da doença é baseado no uso de práticas culturais e controle químico (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017). A evolução de resistência a fungicidas em fitopatógenos é uma das principais preocupações no manejo sustentável de doenças (HE et al., 2019). O controle químico tem trazido o aparecimento de resistência à fungicidas por pressão de seleção, por exemplo, às estrobirulinas, boscalida e triazóis (AVENOT et al., 2016; MATIĆ et al., 2019; ODILBEKOV et al., 2019). Por tanto, a grande variação genética de *Alternaria* spp. fornece-lhe vantagens para se adaptar e desenvolver populações resistentes aos grupos de fungicidas e ingredientes ativos com alto risco de resistência (PASCHE; WHARAM; GUDMESTAD, 2004).

No que se refere ao controle alternativo de doenças de plantas, atualmente objetiva-se ser realizado através de substâncias alternativas que operem como fungicidas naturais,

biodegradáveis, seguros, e que possam ser usados de forma individual ou em combinação aos fungicidas de natureza sintética (YA-HAN et al., 2019). No contexto de controle alternativo ou não convencional, qualquer outro método de manejo que exclua ou reduza o uso de pesticidas é considerado “alternativo” (SANTOS et al., 2017), como é o uso de óleos essenciais (OEs) e bactérias como agentes de controle biológico (ACB) (TOMAZONI et al., 2017; HENDGES et al., 2020; KGATLE et al., 2020).

Diferentes OEs têm exercido efeitos significativos no controle de doenças causadas por *Alternaria* spp., em várias culturas como: tomate (XU et al., 2016; TOMAZONI et al., 2017; YAKOUBI et al., 2019), fumo (JING et al., 2018), tangerina (PERINA et al., 2019) e grão de bico (GADHI et al., 2020). Os OEs agem através de diferentes mecanismos de ação, seja com a alteração de estruturas celulares ou interrupção de funções e processos biológicos dos fungos (BASAK; GUHA, 2018). Da mesma forma ocorre com *Bacillus amyloliquefaciens*, agente de controle biológico de uma ampla gama de doenças em plantas, especialmente em hortaliças (SARAVANAKUMAR; THOMAS; BANWARIE, 2019). *Bacillus* spp. inibem o crescimento de fitopatógenos através de mecanismos que envolvem a competição por espaço, nutrientes, indução de resistência, produção de antibióticos, enzimas hidrolíticas, sideróforos, formação de biofilmes e degradação de fatores de patogenicidade como toxinas (CAWOY et al., 2011; MILJAKOVIĆ; MARINKOVIĆ; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, 2020). Diferentes compostos antimicrobianos produzidos por *Bacillus* têm sido relatados no controle *in vivo* de doenças foliares, exibindo ação protetiva e curativa contra *Alternaria* spp., assim como a indução de resistência das plantas ao ataque de fitopatógenos (ALI et al., 2016; DIMOPOULOU et al., 2019). Por outro lado, tanto OEs quanto *Bacillus* spp. têm sido relatados por sua alta atividade antifúngica e indução de enzimas associadas à defesa como são a peroxidase (POX) e polifenol oxidase (PPO), melhorando assim, a resposta imune das plantas contra fitopatógenos (RAVEAU; FONTAINE; LOUNÈS-HADJ, 2020).

Devido aos constantes problemas associados ao uso excessivo de pesticidas como contaminação do solo, lençóis freáticos, desequilíbrio ecológico do ambiente, e restrições ou banimento de defensivos químicos, as medidas de controle alternativo tornam-se cada vez mais apropriadas no manejo de doenças nas plantas (RAVEAU; FONTAINE; LOUNÈS-HADJ, 2020). Por isso, o uso de OEs e ACBs como medidas de controle, são uma linha de pesquisa que vai atingindo uma importância transcendental como opções no manejo integrado de doenças. Além disso, ainda são carentes os estudos exploratórios sobre o uso de OEs e ACBs, sobretudo em condições *in vivo*, onde é preciso obter mais informações a respeito do

potencial benéfico destas práticas de controle. Em alguns casos, as medidas alternativas, como o controle biológico, podem atuar como tecnologias equivalentes ao controle químico (O'BRIEN, 2017), e quando são incorporadas ao manejo de doenças podem diminuir as probabilidades de surgimento de populações insensíveis a fungicidas (ARRAIZA et al., 2018).

Baseado na importância tanto sob o ponto de vista econômico quanto social que representa a cultura do tomateiro para o Brasil e o mundo, é necessário adotar medidas eficientes e diversificadas para reduzir os prejuízos causados pela PP. Assim, torna-se importante promover o uso de medidas alternativas como ferramentas de controle, que exibam menor impacto em relação aos fungicidas químicos no manejo sustentável do complexo *Alternaria*, visando à redução de pressão de seleção de indivíduos resistentes e evadindo a perda da eficácia das moléculas químicas disponíveis para o controle da PP do tomateiro. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação de OEs e *B. amyloliquefaciens* no controle de *A. linariae*, e sobre respostas agronômicas e bioquímicas em plantas de tomateiro.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta herbácea anual, que pertence à família Solanaceae. Sua cultura gera ótimos benefícios socioeconômicos para o pequeno, médio e grande produtor, criando inúmeras fontes de empregos (direta e indiretamente), melhorando assim a renda das famílias envolvidas em sua produção (PEIXOTO et al., 2017). A produção de tomate pode ser destinada a dois grandes setores: mercado fresco e indústria. O tomate para consumo fresco, usualmente é produzido em estufas em países como China e a União Européia, enquanto o destinado à indústria é cultivado em campo aberto (LI et al., 2018; GATAHI, 2020). Para o caso do Brasil, a realidade é diferente, onde 99 % da produção de tomate são obtidos de plantações em campo aberto (SAFRA, 2020).

O tomate fornece uma série de compostos nutricionais para a dieta humana, como carboidratos, proteínas, lipídios, carotenóides (licopeno, β -caroteno, fitoeno), vitaminas (A, C, tiamina, riboflavina e niacina), minerais (Fe, P, Ca, Mg, Zn), e compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) (SALEHI et al., 2019). O aumento constante na produção do tomate processado é o resultado do crescimento acelerado da população mundial e também do incremento no consumo per capita de várias maneiras, como: massas, sucos, purê, molho, tomates secos e em pó (SILVA et al., 2016).

Apesar dos benefícios e utilidades significativas do tomate, sua produção é afetada por vírus, bactérias, nematoides e fungos fitopatogênicos, que inclui o agente da pinta preta (PP) do tomateiro, uma doença destrutiva, que provoca perdas de até 79 % da produção de frutos (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2019). Esses problemas estão associados a vários fatores, dentre os quais destacam-se: número limitado de variedades resistentes, práticas culturais ineficazes (FOOLAD; MERK; ASHRAFI, 2008) e, sobretudo, aplicações incorretas de fungicidas de origem sintético -principal ferramenta do controle-, que frequentemente provocam um incremento da pressão de seleção sobre populações de fungos resistentes a certos ingredientes ativos a exemplo da azoxystrobina e boscalida no patossistema batata- e tomate-*Alternaria* spp., respectivamente (TYMON; JOHNSON, 2014; CHAVAN; YUMLEMBAM; SEWAKRAM, 2017). Acrescenta-se a isso a ameaça potencial de produtos químicos no bem-estar dos produtores, consumidores e meio ambiente (ZAFAR; SHAUKAT, 2018).

Por outro lado, existem formas alternativas, embora às vezes limitadas, de controle de doenças como óleos essenciais ou extratos de plantas (HILLEN et al., 2012) e produtos baseados em agentes de controle biológico (p. ex. bactérias), que têm demonstrado ótimos resultados no controle de fitopatógenos (AGRILLO et al., 2019) e que na maioria dos casos, não são usadas no controle de doenças do tomateiro, razão pela qual, ainda é continua a dependência de uso dos agrotóxicos (SOUSA et al., 2017). Ademais, procedimentos associados à sub ou superdosagem, frequência ou forma de aplicação de produtos, têm trazido problemas de perdas de sua eficácia no controle químico de doenças (SOUSA et al., 2017).

2.2. O gênero *Alternaria* e suas características

Historicamente, a primeira descrição do gênero *Alternaria* foi relatada por Ness em 1816, com base na espécie *A. tenuis* (WOUDENBERG et al., 2013). Décadas depois, Sorauer (1896) não fez distinção entre *A. tenuis* e *A. solani*, e se referiu a ambos como *A. solani*, um nome que é considerado até hoje (FOOLAD; MERK; ASHRAFI, 2008). Até o momento, em torno de 300 espécies de *Alternaria* foram identificadas, causando doenças em quase 400 espécies de plantas (MEENA et al., 2016).

Baseado em parâmetros morfológicos e filogenia molecular, o gênero *Alternaria* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes, Ordem Pleosporales e Família Pleosporaceae (LAWRENCE; ROTONDO; GANNIBAL, 2016; SIMMONS, 2007).

Morfológicamente, as espécies de *Alternaria* compartilham características semelhantes. Têm conídios pigmentados multicelulares escuros, com septos longitudinais e transversais, tipicamente dictiosporos, alguns fragmentados, catenulares e outros individuais. Colônias geralmente cinza, esverdeada, verde-oliva escura, marrom-avermelhada escura ou preta (LAWRENCE; ROTONDO; GANNIBAL, 2016). Estroma raramente é formado. Conidióforos macronematosos, mononematosos, simples, irregulares e pouco ramificados, marrons ou marrons pálidos, solitários ou em fascículos. Células conidiogênicas integradas, tornando-se intercaladas, polimétricas, simpodial ou às vezes monométricas. Conídios solitários ou em cadeia, basicamente ovóides, obovóides, cilíndricos, elipsóides próximos, com ou sem septos oblíquos ou longitudinais (PATRIARCA; FERNÁNDEZ-PINTO, 2018). Os septos podem ser espessos, escuros e rígidos, e uma estrutura semelhante a uma célula pode ser formada. Ascomata pequeno, solitário ou agrupado, com erupção superficial na maturidade. Papilas curtas, poucas a muitas ascas por ascoma, basal, cilíndrico e às vezes curvado, com um pedicelo curto (LAWRENCE; ROTONDO; GANNIBAL, 2016).

As espécies de *Alternaria* constituem um grupo de fungos com membros patogênicos de diferentes estilos de vida, isto é, hemibiotróficos e necrotróficos (MEENA et al., 2017). Alguns deles infectam de uma a várias centenas de espécies de plantas, por exemplo: *A. alternata* (ARMITAGE et al., 2020). *Alternaria* spp. pode infectar plantas herbáceas e perenes, incluindo tomate, batata, citros, maçã, brócolis, couve-flor, pêra, morango, fumo, etc. (MEENA et al., 2016). De fato, não causam doenças só no campo, mas também na pós-colheita (PATRIARCA; FERNÁNDEZ-PINTO, 2018).

Membros do gênero *Alternaria* produzem uma enorme quantidade e variedade de toxinas, são registradas atualmente, mais de 70, que agem como armas biológicas para atacar o hospedeiro (DANG et al., 2015) e também algumas produzidas durante a pós-colheita constituem um risco para a saúde do ser humano e dos animais alimentados com produtos contaminados (KUSTRZEBA-WÓJCICKA et al., 2014; ESCRIVÁ et al., 2018). As toxinas de *Alternaria* spp. são divididas em duas categorias: toxinas específicas do hospedeiro (HSTs) e toxinas não específicas do hospedeiro (nHSTs). As HSTs mais comuns produzidas por algumas espécies de *Alternaria* são: alternariol, alternueno, zinniol, ácido tenuazônico, alteriol monometil éter, brefeldina A, tentoxina, curvularina e alterotoxina I, II, III (MEENA et al., 2017). Enquanto, no grupo de nHSTs estão: toxina Ta-ALL, toxina Tb-ALL, toxina ACT, toxina I-AF, toxina II-AF, toxina AK, toxina ACR, toxina ACTG, toxina-AM, destruxina B, maculosina, toxina-AS e toxina-HC (MEENA; SAMAL, 2019).

2.3. Pinta preta do tomateiro: o agente causal

A PP é uma doença amplamente distribuída, destrutiva e comum do tomateiro e de outras solanáceas em todo o mundo (CHAERANI; VOORRIPS, 2006). A doença é mais frequente em áreas com chuvas abundantes, altas temperaturas e elevada umidade relativa (PATEL; SUBRAMANIAN; JHA, 2011). A PP é causada por um complexo de fungos patogênicos do gênero *Alternaria*. Inicialmente, atribuiu-se a *A. solani* como único agente causal da PP no tomateiro, mas na atualidade, sabe-se que a PP pode ser também causada por *A. tomatophila*, *A. alternata*, *A. grandis*, *A. arborescens* e *A. tenuissima* (BESSADAT et al., 2017). Isso levou a estudos de especialização em patogenicidade do hospedeiro, com a conclusão de que o tomate e a batata são suscetíveis a *A. solani*, com a mesma reprodução dos sintomas. Mais tarde, *A. tomatophila* foi relatada como uma espécie cultural e morfológicamente distinta de *A. solani*, e atualmente são espécies que atacam com alta frequência a cultura do tomateiro (FOOLAD; MERK; ASHRAFI, 2008). No Brasil, as espécies *A. solani*, *A. tomatophila* e *A. cretica* são as que apresentam maior ocorrência na

maioria das regiões produtoras de tomate (PEREIRA et al., 2013). Porém, a partir de uma nova classificação filogenética, alguns isolados com esses nomes (*A. solani*, *A. tomatophila* e *A. cretica*) passaram a formar uma única espécie e foram renomeados como *A. linariae* (WOUDENBERG et al., 2014), por tanto, esse é o nome atual de um dos agentes etiológicos da PP do tomateiro.

O fungo pode ser adquirido a partir de sementes e mudas, sobreviver em restos de plantas como saprófago ou persistir no solo por mais de um ano na forma de micélio (SHOAIB; IQBAL, 2018). A PP causa danos a todos os órgãos aéreos da planta (TOMAZONI et al., 2017). É mais frequente em plantas adultas a partir do início da floração. Nesse estágio, as plantas começam a movimentar suas reservas para locais de maior demanda de nutrientes (órgãos reprodutivos), que é quando as folhas mais velhas (órgãos exportadores) começam a ficar carentes de reservas como açúcares e glicoalcalóides, e mais suscetíveis à doença, sendo este fenômeno controlado por eventos de caráter genético. De fato, a susceptibilidade da planta à PP é dependente do estágio de desenvolvimento da planta (ABULEY; NIELSEN, 2017). O fungo também pode infectar plantas novas que crescem em condições ambientais desfavoráveis. A PP tem três estágios distintos de sintomas: tombamento de mudas (cancros e lesões no caule), podridão de frutos e manchas nas folhas (comumente chamada PP) (FOOLAD; MERK; ASHRAFI, 2008).

Os sintomas característicos da PP nas folhas são manchas de cor marrom a preta com anéis concêntricos e com leves depressões no centro da lesão, com tamanho frequente de 1.25 cm de diâmetro (SANOUBAR; BARBANTI, 2017; VAN DER WAALS; KORSTEN; AVELING, 2001). As folhas infectadas com a PP reduzem sua atividade fotossintética, causando baixa produção de energia (AGAMY et al., 2013). Em alguns casos, o desfolhamento é característico, resultado da forte intensidade da doença. Quando a perda das folhas é severa, os frutos sofrem danos por escaldaduras, ao estarem expostos à luz solar (CHAERANI; VOORRIPS, 2006).

Alternaria spp. pode sobreviver no solo, restos de culturas, sementes ou em hospedeiros alternativos através de conídios ou micélio, que servem como fontes de inóculo primário (Figura 1) (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017). O inóculo atinge as superfícies das plantas por efeito do vento ou respingos de água das chuvas (MAMGAIN; ROYCHOWDHURY; TAH, 2013). Sob condições de alta umidade e temperatura, o conídio inicia o processo de germinação e subsequentemente penetração nos tecidos de forma direta ou através de ferimentos (AGRIOS, 2005). Após a penetração da hifa de infecção, os sintomas podem

aparecer entre dois e três dias (período de incubação). Os sintomas podem apresentar-se em folhas, caules e frutos. A esporulação ocorre a partir dos 3-5, após do aparecimento das lesões (CHAERANI; VOORRIPS, 2006). Longos períodos de umidade são requeridos para a esporulação, e os conídios podem também ser produzidos em períodos alternados de condições úmidas e secas. Por fim, os conídios são disseminados pela chuva e o vento, ocorrendo o ciclo secundário da doença, onde novos tecidos são infectados. Por tanto, a PP do tomateiro é por natureza uma doença policíclica (ADHIKARI; OH; PANTHEE, 2017).

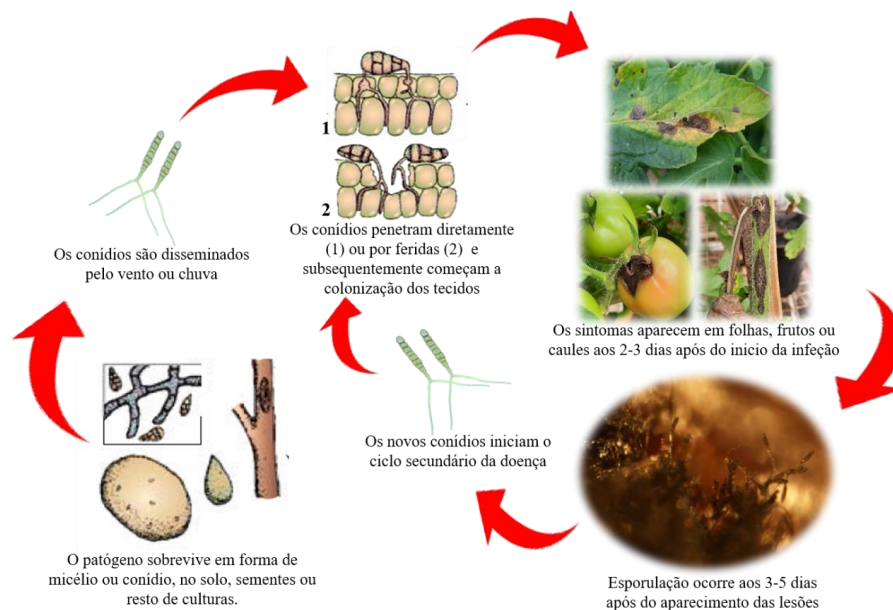


Figura 1. Ciclo da doença da pinta preta do tomateiro.

Fonte: adaptada de AGRIOS (2005).

2.4. Controle alternativo de *Alternaria* spp.

O manejo de doenças de plantas enfrenta grandes desafios devido ao: aumento da demanda total por alimentos seguros e diversificados; redução do potencial de produção agrícola devido à perda da fertilidade do solo; alteração da ecologia dos agro-ecossistemas e aumento de doenças epidêmicas (HE; ZHAN; XIE, 2016). Por outro lado, os fungicidas químicos continuam sendo o método tradicional de controle de doenças, que na maioria dos casos têm sido associados com impactos negativos no meio ambiente, exposição potencial de seres humanos a tais substâncias e deposição de resíduos em frutos (FRANÇA et al., 2018; REX; PRABHU; KUMAR, 2019).

O uso contínuo e inadequado de fungicidas resultou na perda da eficácia de vários produtos químicos (BUTTNER et al., 2017) e entre suas principais consequências, o

desenvolvimento de resistência genética em certos fungos, incluindo *Alternaria* spp. (NIKOLOVA et al., 2017; SAYIDI; NEMATOLLAHI, 2017).

No mundo, as restrições governamentais estão se tornando mais rigorosas para o registro de novos produtos químicos sintéticos, o que promoveu a pesquisa e o desenvolvimento de produtos com menores riscos de contaminação e impacto do meio ambiente, por exemplo, biopesticidas (ALVES, 2007; SHAFI; TIAN; JI, 2017). Embora os métodos de controle sejam classificados de diferentes maneiras, neste contexto, qualquer outro método de controle que exclua o uso de pesticidas é considerado “alternativo”, incluindo estratégias contemporâneas ou não contemporâneas para o manejo de doenças (ALVES, 2007). Métodos alternativos ou não convencionais incluem controle biológico (fungos e bactérias e seus derivados), uso de produtos à base de plantas (óleos essenciais, extratos vegetais), métodos físicos e resistência genética (BETTIOL, 2006; SANTOS et al., 2017).

Atualmente, o propósito do controle de doenças de plantas é procurar novas substâncias que atuem como fungicidas naturais biodegradáveis e seguros como substitutos dos fungicidas convencionais (BETTIOL, 2006; YA-HAN et al., 2019). Portanto, fungicidas à base de plantas são alternativas promissoras por suas propriedades menos tóxicas, sistêmicas e ambientalmente seguras (MAHMOUDI, 2017; MUY-RANGEL et al., 2017).

2.4.1. Óleos essenciais (OEs) no controle de doenças de plantas

Os óleos essenciais (OEs) são misturas químicas altamente complexas de um número variável de substâncias orgânicas, voláteis e lipofílicas, geralmente com sabores e aromas agradáveis produzidos pelas plantas (RIBES et al., 2018). A composição dos OEs varia entre as espécies vegetais, e mesmo dentro da mesma espécie (crescendo em condições ambientalmente diferentes, estádios fenológicos, etc.), tendo diferentes mecanismos de ação (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010). Existe uma extensa gama de compostos naturais extraídos de plantas, incluindo terpenos, aldeídos, ésteres, etc., todos eles com propriedades altamente bioativas (WANG et al., 2019).

As propriedades e funções antifúngicas dos OEs demonstraram controlar fungos fitopatogênicos como *Alternaria* spp. (XU et al., 2016; FRANÇA et al., 2018; JING et al., 2018; PERINA et al., 2019; YAKOUBI et al., 2019; GADHI et al., 2020), *Fusarium* spp. (LÓPEZ-MENESES et al., 2017; NIKOLOVA et al., 2017; SALHI et al., 2019), *Colletotrichum* spp., (WAITHAKA et al., 2017), *Penicillium* sp. (TAO; JIA; ZHOU, 2014),

Aspergillus sp. (ELSAYED; SHABANA, 2018) sob condições *in vitro* e *in vivo* em várias espécies de plantas.

No entanto, são raros os estudos, sobretudo em condições de campo, onde se relatou o uso de óleos essenciais no controle de *Alternaria* spp. como agente etiológico da PP. Entre esses estudos, destaca-se o controle *in vitro* e *in vivo* dos OEs de *Eucalyptus staigeriana*, *E. globulus* e *Cinnamomum camphora* na inibição do crescimento micelial e germinação de esporos, além de reduzir o desenvolvimento de sintomas da PP do tomateiro (TOMAZONI et al., 2017). Estudos semelhantes também foram relatados para o vapor dos OEs de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* sobre a inibição do crescimento micelial, germinação e crescimento da lesão em folhas causado por *Alternaria alternata* em condições *in vitro* (HONG et al., 2018). Resultados similares foram obtidos por Ragupathi et al. (2020), quando foi usado o OE de *Thymus vulgaris*. Enquanto em condições de campo, o OE de *Baccharis ochracea* controlou efetivamente o cancro do caule causado por *Alternaria* em tomateiro (TOMAZONI et al., 2019).

Tomilho (*Thymus vulgaris*): O gênero *Thymus* é um membro da família Lamiaceae, que possui cerca de 400 espécies do tipo aromáticas perenes, ou herbáceas, sempre verde ou semi-verdes, dentro das quais podem encontrar-se várias subespécies, variedades e formas (BORUGĂ et al., 2014). O OE do tomilho tem entre seus principais componentes o timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno, e linalol, sendo o timol e o carvacrol encontrados em porcentagem relativamente mais altos, entre 41.5 % e 7.5 %, respectivamente (BUCHBAUER; ERKIC, 2016).

O OE do tomilho tem sido relatado por ter elevada atividade antimicrobiana, a maioria das vezes fornecidas pelo timol e carvacrol, além de outros compostos fenólicos da sua composição (BEN-JABEUR, MAISSASOMAI-JEMMALI; HAMADA, 2017). Este óleo mostrou uma redução de 64 % na incidência do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em plantas de tomate, assim como a redução (até 30.76 %) da severidade da murcha do tomateiro causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (BEN-JABEUR et al., 2015), resultados semelhantes foram descritos por La Torre et al. (2016) no controle da murcha do tomateiro.

Por outro lado, as aplicações de OE do tomilho em pós-colheita, têm mostrado resultados altamente satisfatórios no controle de fitopatógenos. Quando os frutos de maçãs foram tratados com o OE do tomilho houve uma redução significativa da severidade e incidência do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), além de perceber-se um aumento da expressão

de genes que expressam proteínas relacionadas a patogênese (PRPs), o que sugere um efeito positivo na indução da resistência (BANANI et al., 2018). O efeito antifúngico do tomilho foi também relatado na redução da severidade da antracnose (*C. musae*) em banana, sem mostrar nenhum efeito nas propriedades físico-químicas e sensoriais da fruta (VILAPLANA; PAZMIÑO; VALENCIA-CHAMORRO, 2018).

Capim-limão (*Cymbopogon citratus*): O gênero *Cymbopogon* é parte da família Poaceae, que inclui 140 espécies (GANJEWALAA; LUTHRA, 2010). Os OEs das espécies de *Cymbopogon* estão constituídos principalmente por monoterpenos. Entre os componentes principais que o gênero *Cymbopogon* possui, destaca-se: citral (mistura de geranial e neral), geraniol, citronelol, linalol, elemol, 1,8-cineol, limoneno, β -cariofileno, metil heptanona, geranil acetato e geranil formate (GANJEWALAA; LUTHRA, 2010). *C. citratus* é uma espécie típica que cresce em regiões tropicais e subtropicais do mundo (MAJEWSKA et al., 2019).

O OE de capim-limão tem mostrado alta atividade biológica no controle de uma variada gama de patógenos, incluindo aqueles que afetam as plantas cultivadas (ALI; WEE PHENG; MUSTAFA, 2015; DALCIN et al., 2017; LÓPEZ-MENESES et al., 2017). O uso do OE de capim-limão foi relatado por apresentar eficiência no controle *in vitro* de patógenos como *Alternaria tenuissima* e *Fusarium verticillioides*, inibindo o crescimento micelial e germinação de conídios. Esse controle foi associado ao efeito fungitóxico neural, que é um dos principais componentes do OE de capim-limão (LÓPEZ-MENESES et al., 2017).

Em condições *in vivo*, o OE de capim-limão reduziu a severidade do cretamento gomoso do caule do melão, causado por *Stagonosporopsis cucurbitacearum* a partir de 0.03% a 0.3% da concentração do extrato do óleo (DALCIN et al., 2017). Outra modalidade de controle que apresentou o OE de capim-limão foi através do efeito do vapor em concentração de $28 \mu\text{L L}^{-1}$, diminuindo assim, a antracnose do mamão artificialmente inoculado, sem afetar parâmetros de qualidade dos frutos, e sem perturbar o processo natural de amadurecimento (ALI; WEE PHENG; MUSTAFA, 2015).

Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*): O gênero *Melaleuca* pertence à família Myrtaceae. É um gênero nativo da Austrália e seu uso tem se disseminado como medicinal e cosmético. O OE de melaleuca extraído por destilação de vapor se compõe principalmente de: 1,8-cineole, α -pineno, β -pineno e terpinen-4-ol, os quais possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes (BUCHBAUER; ERKIC, 2016; YASIN et al., 2021). Esses compostos são

parte de terpenos hidrocarbonetos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus alcoóis associados. A atividade biológica do OE de melaleuca é atribuída principalmente pelo seu componente principal; terpinen-4-ol (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

O componente do OE de melaleuca, terpinen-4-ol, causou significativas alterações na morfologia do micélio, permeabilidade celular e mudanças ultraestruturais nas células de *B. cinerea* sob condições *in vitro*, mostrando importante atividade antifúngica (YU et al., 2015). Ademais, isto indica que o OE de melaleuca é um inibidor de importantes vias metabólicas como a via do ácido tricarbóxico e metabolismo de ácidos graxos (XU et al., 2017). Um relato atual demonstrou que o Timorex Gold[®] (i.a. óleo da melaleuca), exibiu alta eficácia e forte poder curativo contra a sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) em banana, agindo sobre as etapas 1, 2, 3 e 4 do desenvolvimento da doença, diferente à testemunha positiva (difenoconazole), que não apresentou controle curativo (REUVENI; SANCHES; BARBIER, 2020).

2.4.2. Mecanismos de ação dos óleos essenciais

Os OEs com seus diferentes mecanismos de ação afetam as estruturas celulares, interrompendo as funções e processos biológicos dos fungos (BASAK; GUHA, 2018). Alguns componentes essenciais, como o eugenol, modificam a morfologia e a integridade da membrana plasmática de *A. alternata*, causando vazamento de componentes celulares, rugas e distorções do micélio, reduzindo assim a capacidade dos fungos de penetrar nas células intactas do hospedeiro (JING et al., 2018). Semelhantemente, em *A. alternata* o micélio adquiriu uma forma enrolada, agregada e parcialmente achatada, quando o fungo cresceu na presença de magnolol (YA-HAN et al., 2019). Outro fenômeno que pode ser observado é a perda da produção de conídios e a indução de condensação do citoplasma. A redução na produção de conídios e/ou esporos pode limitar a propagação de patógenos, reduzindo a carga de esporos na atmosfera e na superfície das plantas (MAHMOUDI, 2017).

Por outro lado, a atividade de monoterpenos oxigenados afeta a síntese da parede celular, bloqueia a atividade enzimática, leva a um rearranjo dos lipídios, e como consequência, alterações nas propriedades e funções da membrana celular (YAKOUBI et al., 2019). Essa afinidade dos alcoóis presentes nos monoterpenos com membranas celulares cria fortes ligações moleculares, com proteínas e glicoproteínas, até causar colapso celular (WANG et al., 2012).

Os OEs constituem uma alternativa promissora aos fungicidas químicos. As misturas de componentes e diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana dos OEs podem reduzir o desenvolvimento de resistência e a probabilidade de origem de novas variantes de certos fungos fitopatogênicos (FONSECA et al., 2017).

2.5. Bactérias como agentes de controle biológico

Nos últimos anos, tem existido um interesse crescente no uso de agentes de controle biológico (ACBs) como uma estratégia alternativa para o manejo de doenças nas culturas (O'BRIEN, 2017; RAGUCHANDER; SARAVANAKUMAR; BALASURRAMANIAN, 2011). O controle biológico inclui o uso de microrganismos antagônicos, incluindo bactérias não patogênicas (CALVO et al., 2016).

Os mecanismos biológicos dos ACBs na supressão de agentes fitopatogênicos incluem mecanismos diretos (antibioses (produção de enzimas líticas e toxinas) e parasitismo) e indiretos (competição por espaço e indução de respostas de defesa do hospedeiro) (CHUNG; KIM, 2005; SINGH, 2014; DIMOPOULOU et al., 2019). Os agentes de controle biológico previnem as perdas da produtividade das culturas por fatores bióticos (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019). Regularmente, os ACBs são altamente específicos para um patógeno e, portanto, são considerados inofensivos para espécies não alvos (O'BRIEN, 2017).

Dentre os ACBs, encontramos o gênero *Bacillus*, o qual abrange uma grande diversidade de espécies e subespécies de bactérias. As espécies de *Bacillus* estão majoritariamente distribuídas na rizosfera. Eles têm alta tolerância térmica, rápido crescimento em culturas líquidas e formam esporos rapidamente (CALVO et al., 2016). Os ACBs baseados em *Bacillus* spp. desempenham um papel fundamental no campo dos biopesticidas. Muitas espécies de *Bacillus* são eficazes contra uma ampla gama fitopatogênicos como fungos, bactérias, vírus e nematoides (RADHAKRISHNAN; HASHEM; ABD-ALLAH, 2017). Além disso, eles são capazes de promover o crescimento das plantas, são indutores de resistência sistêmica, produzem compostos antimicrobianos (lipopeptídeos, antibióticos e enzimas) e competem por fatores de crescimento com outros microrganismos por meio da colonização (SHAFI; TIAN; JI, 2017).

Alguns polipeptídios produzidos pelas espécies de *Bacillus* possuem mecanismos de ação específicos, como bloqueio, distúrbio e formação de cavidades na parede e membrana celular, causando a morte do fungo. Enquanto outros peptídeos estão envolvidos na desintegração de órgãos intracelulares, como ácidos nucleicos e mitocôndrias (ZHAO et al.,

2013). Assim também, alguns outros desempenham um papel importante na biossíntese de certos hormônios (giberelinas), que possuem um papel importante no crescimento das plantas (CHEN et al., 2007). Em alguns casos, quando a planta é atacada por patógenos, os tecidos não infectados adquirem a capacidade de tolerar ataques subsequentes, esse tipo de resposta é conhecida como resistência sistêmica adquirida e é desencadeada por sinalização hormonal (DURRANT; DONG, 2004).

Por outro lado, a colonização de tecidos por bactérias de controle biológico (p. ex. *B. pumilus*) produzem alterações citológicas em plantas que restringem patógenos às células epidérmicas e do córtex, como resultado do fortalecimento das paredes por deposição de calose e compostos fenólicos (BENHAMOU et al., 1996). As enzimas antioxidativas induzem a síntese de lignina, cujo papel é gerar mudanças estruturais que impedem o avanço do patógeno nos tecidos (THILAGAVATHI et al., 2007). Além disso, as espécies de *Bacillus* produzem enzimas com forte atividade lítica, como a quitinase e a β -1-3-glucanase, responsáveis pela degradação da parede celular dos fungos (LEELASUPHAKUL; SIVANUNSAKUL; PHONGPAICHIT, 2006).

Vários representantes de *B. amyloliquefaciens* são encontrados em associação com as raízes e atuam como microrganismos benéficos para o crescimento das plantas (FAN et al., 2017). Atualmente, certas variantes biológicas ou isolados de *B. amyloliquefaciens* são usados como formulações comerciais para promover o crescimento das plantas (HOSSAIN et al., 2015). Porém, outras cepas foram usadas para suprimir efetivamente patógenos de pós-colheita, como *Penicillium digitatum* (HAO et al., 2010; CALVO et al., 2016), *Aspergillus parasiticus* (SIAHMOSHTEH et al., 2018) e sob condições experimentais de campo contra *Phytophthora capsici* e *Fusarium oxysporum* (CHUNG; KIM, 2005), *A. alternata* (KGATLE et al., 2020), *Alternaria panax* (JI et al., 2013), entre outros. Entretanto, pouco é conhecido sobre o efeito de *B. amyloliquefaciens* no controle de *Alternaria* spp., como agentes causais da PP do tomateiro.

2.6. Sistema enzimático de defesa

A resistência de plantas a doenças está associada a uma variada gama de repostas de defesa que atrasam ou interrompem o processo infeccioso do patógeno durante certas etapas da interação planta-patógeno (NGADZE et al., 2012). Os mecanismos de resistência incluem barreiras químicas e físicas pré-existentes ou induzidas que limitam o avanço do patógeno na colonização dos tecidos vegetais (WALTERS, 2010). A ativação de enzimas relacionadas à

defesa constitui um dos principais mecanismos de resposta induzida, como resultado de um evento pós-infecioso de fitopatógenos (VANITHA; NIRANJANA; UMESHA, 2009).

Sabe-se também que a aplicação de OEs tem contribuído ao aumento substancial de enzimas relacionadas à regulação do estresse oxidativo em diversas espécies de plantas. Um exemplo daquilo foi observado em plantas de tomate tratadas com OE de tomilho, as quais experimentaram um acúmulo significativo nos níveis de peroxidases, sendo isto associado a uma redução da intensidade do mofo cinzento (*B. cinerea*) e a murcha por fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*) (BEN-JABEUR et al., 2015). Mudanças no comportamento do sistema antioxidativo enzimático e não enzimático foram também detectadas em plantas de tomate tratadas com o OE de *Ocimum basilicum*, onde destacou-se maior incremento da enzima polifenol oxidase, acompanhado de uma redução de até 18 % da incidência de murcha por *Fusarium* (AKLADIOUS; ISAAC; ABU-TAHON, 2015). Uma abordagem parecida foi também relatada com a aplicação do OE de *Cinnamomum zeylanicum*, que induziu a ativação de enzimas como catalase, ascorbato peroxidase, fenilalanina amônia-liase e peroxidase em plantas de tangerina, mostrando alta atividade antifúngica no controle de *A. alternata* (patotipo tangerina) (PERINA et al., 2019).

Uma grande diversidade de microorganismos tem sido relatada por possuírem mecanismos que estimulam a resistência de plantas contra uma grande gama de fitopatógenos. *B. amyloliquefaciens* é conhecida por ser um ACB com múltiplos mecanismos de ação, incluindo a indução de resistência em várias espécies de plantas cultivadas. Alguns estudos mostraram que *B. amyloliquefaciens* suprimiu o desenvolvimento do mofo cinzento (*Botrytis pelargonii*) e mancha foliar por Alternaria (*A. alternata*) na cultura do pimentão (KAZEROONI et al., 2021). O tratamento com *B. amyloliquefaciens* modulou vários processos físico-químicos, entre eles: redução dos níveis de proteínas, aminoácidos, antioxidantes, H₂O₂ e peroxidação de lipídeos, porém teve um incremento nos níveis de ácido salicílico e açúcares, indicando uma mitigação de efeitos adversos do estresse biótico (KAZEROONI et al., 2021). Por outra parte, quando plantas de pimenta foram inoculadas por *B. amyloliquefaciens*, houve uma melhora no controle da antracnose (*Colletotrichum truncatum*), o qual foi relacionado com um incremento notável das concentrações das enzimas peroxidases, fenilalanina amônia-liase e polifenol oxidase (GOWTHAM et al., 2018). Mesmo que tenham sido pesquisados os efeitos de OEs e ACBs como indutores de resistência, sabe-se pouco sobre o efeito tanto de OEs de tomilho, capim-limão e melaleuca quanto de *B.*

amyloliquefaciens, sobre a indução no incremento de enzimas de defesa em plantas de tomate infectadas com a PP do tomateiro.

2.6.1. Peroxidases

As peroxidases (POXs) são glicoproteínas (polipeptídios com cadeias de 300-350 aminoácidos) sintetizadas no retículo endoplasmático, e que depois são transportadas através do aparato de Golgi, seja ao espaço intercelular ou vacúolo (JOVANOVIĆ et al., 2018). As plantas superiores contêm quatro tipos de POXs: glutathione peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase e a peroxidase secretória clássica (SHIGETO; TSUTSUMI, 2016). A sua atividade afeta vários processos celulares como lignificação da parede celular, defesa da planta, desenvolvimento e germinação (SHIGETO; TSUTSUMI, 2016).

As POXs são oxirredutases que atuam como oxidantes de compostos fenólicos enquanto consomem H_2O_2 e/ou como geradoras de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FRANCOZ et al., 2015; SHIGETO; TSUTSUMI, 2016). A oxidação de compostos fenólicos por H_2O_2 , catalisado pelas POXs resulta na produção de radicais fenoxil, os quais por sua vez são polimerizados ou reduzidos pela Ascorbato no sistema de eliminação de H_2O_2 , POXs-Fenólicos-Ascorbato (JOVANOVIĆ et al., 2018).

2.6.2. Polifenol oxidase

A polifenol oxidase (PPO) de plantas consiste de três domínios que incluem um peptídeo do plastídio N-terminal, um cobre central altamente conservado e uma região C-terminal (BOECKX et al., 2015). A PPO é encontrada principalmente na membrana da tilacóide do cloroplasto, por tanto, pode influenciar a fotossíntese diretamente, além de interagir com a peroxidase, ou no ciclo água-água para facilitar a limpeza de ROS (HASANUZZAMAN et al., 2020).

Frequentemente, os papéis da PPO em plantas tem sido associado à defesa contra herbívoros e patógenos, baseado na separação física da enzima localizada no cloroplasto dos substratos localizados no vacúolo (OMIADZE; MCHEDLISHVILI; ABUTIDZE, 2018). A PPO é uma enzima codificada pelo núcleo que catalisa a oxidação dependente de fenóis a quinona (NGADZE et al., 2012). As quinonas geradas pela PPO são altamente reativas e podem reticular ou alquilar proteínas, levando comumente a formação típica desses pigmentos marrons observados nos tecidos danificados (CONSTABEL; BARBEHENN, 2008), e por isso que, usualmente, seus níveis na planta aumentam quando as plantas experimentam infecções por patógenos (NGADZE et al., 2012). O complexo de proteína-*o*-quinona,

formado como consequência de danos na célula, pode reduzir o valor nutricional dos tecidos, diminuindo a velocidade de avanço do patógeno através da formação de barreiras estruturais (BOECKX et al., 2015).

2.6.3. Fenilalanina amônia-liase

A Fenilalanina amônia-liase (PAL) catalisa a desaminação da fenilalanina para ácido *trans*-cinâmico (cinamato) e amônia, sendo esse primeiro passo da via fenilpropanoide (KONG, 2015). Outros fenilpropanoídeos e seus derivados como flavonóides, isoflavonóides, coumarinas, antiocininas e ligninas são também resultados de subprodutos da desaminação da fenilalanina (KONG, 2015). Por tanto, a PAL é uma das enzimas chaves mais extensivamente estudadas com respeito ao estresse biótico e abiótico, responsável pela síntese de vários metabolitos secundários, em resposta a patógenos, além de fornecer outras funções como proteção contra radiação UV e baixas temperaturas (NGADZE et al., 2012; KIM; HWANG, 2014). A acumulação de ligninas na parede celular e síntese de moléculas de sinalização (acetosiringone) desempenham fundamentais processos de defesa contra patógeno, como a redução do estresse oxidativo (KONG, 2015). A PAL também tem sido envolvida na biossíntese de ácido salicílico, um composto essencial na indução de resistência sistêmica na planta (KIM; HWANG, 2014).

A desaminação da fenilalanina pela PAL é essencial na produção de compostos como o 4-coumaroyl-CoA, seguido da chalcona, o intermediário comum para todos os flavonóides. A chalcona é indispensável na síntese de flavonóides, um dos principais compostos antioxidantes não enzimáticos, responsáveis pela redução de ROS em plantas submetidas a estresse tanto biótico quanto abiótico (BASKAR; VENKATESH; RAMALINGAM, 2018). Os flavonóides na sua estrutura contêm grupos funcionais hidroxila que servem como mediadores da atividade antioxidante, através da limpeza de radicais livres. A prevenção da geração de ROS pelos flavonóides se produz através da supressão de oxigênio singlete, inibição de enzimas produtoras de ROS, ciclooxigenases, lipoxigenases, monooxigenases e xantina oxidase; quelatização de íons metálicos tais como ferro e cobre; e pela reciclagem de outros antioxidantes (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014).

2.6.4. β -1,3-glucanase

A β -1,3-glucanase (GLU) é agrupada na família II das proteínas relacionadas à patogenicidade (PR-proteínas) e representam uma classe abundante de enzimas bem caracterizadas e distribuídas numa variada gama de espécies vegetais (BALASUBRAMANIAN et al., 2012). Elas estão envolvidas em vários processos

fisiológicos associados ao crescimento e desenvolvimento vegetal. Um papel de alto destaque da GLU é a participação na resposta imune da planta a infecções causadas por fungos fitopatogênicos (DZHAVAKHIYA; OZERETSKOVSKAYA; ZINOVYEVA, 2007).

A atividade hidrolítica da GLU, causa a degradação da ligações β -1,3/1,6-glucano das paredes celulares da hifa de fungos parasitas de plantas, liberando moléculas que agem como elicitores nas etapas iniciais do processo infeccioso, induzindo a produção de fitoalexinas e compostos fenólicos (FRANZENER et al., 2018). Por tanto, a GLU é importante na determinação da resistência de plantas a doenças fúngicas (GUPTA; RAVI; SHARMA, 2013).

2.7. Microscopia aplicada à análise histológica de tecidos vegetais infectados por patógenos

As análises de microscopia de luz em plantas são ideais para estudos de diferentes mecanismos que controlam a organização e funcionamento celular. No entanto, os tecidos de plantas apresentam limitada transparência à luz visível, é por isso necessário que os tecidos sejam cortados em secções com espessura reduzida (p. ex. 1-100 μ m), para sua observação (TIMMERS, 2016). As técnicas de microscopia têm mostrado um grande potencial nas pesquisas de interação patógeno-hospedeiro, como a obtenção de informação sobre os mecanismos de resistência e susceptibilidade do hospedeiro (SHETTY et al., 2019)

A microscopia de luz é usada em inúmeras pesquisas relacionadas aos processos de interação planta-patógeno, com o objetivo de identificar a formação de estruturas ou acúmulo de compostos de defesa nas células da planta como respostas ao ataque do patógeno, assim como, a formação de estruturas do patógeno, tanto em interações compatíveis e incompatíveis (LÓPEZ; LUCAS, 2021)

São limitados os estudos onde foram analisados através de microscopia de luz, fenômenos de interação entre planta e fungo fitopatogênicos quando usou-se OEs e bactérias de controle biológico como ferramenta de controle, especialmente nas relações entre o tomateiro e *Alternaria* spp. Até o momento é pouco conhecido sobre os tipos de barreiras bioquímicas (fenóis, ROS, etc.) e físicas (lignina, depósitos de calose, ceras, gomas, etc.) produzidas pelo tomateiro em resposta à infecção por *Alternaria* spp. quando foram tratadas com OEs e bactérias de biocontrole, como *B. amyloliquefaciens*. Por tanto, estes estudos são necessários para a obtenção de dados referentes às respostas induzidas no tomateiro sob a aplicação dessas práticas de controle.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural e casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-Minas Gerais, Brasil, durante o ano 2021.

3.2. Óleos essenciais, agente de controle biológico e fungicidas

Na tabela 1, estão resumidos os dados referentes aos óleos essenciais (OEs), agente de controle biológico (ACB) e fungicidas testados na pesquisa.

Tabela 1. Óleos essenciais, agente de controle biológico e fungicidas químicos comerciais.

OEs*, ACB† e/ou Fungicidas‡	Componente ativo	Fabricante
Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)*	p-cimeno 37-40 % / 1,8-ceneol 1-2 % / canfeno 1 % / mirceno 1-2 % / linalol 3-4 % / timol 45-48 % / limoneno <1 % / α e β -pineno 4-5 %	LASZLO
Capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)*	Mirceno 14-20 % / citronelol <3 % / citronelal <3 % / neral 26-32 % / geranial 32-38 % / linalol 1-2 % / pineno 3-5 % / geraniol 2-3 % / borneol < 3%	LASZLO
Melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>)* Timorex gold®.	Extrato de óleo de <i>M. alternifolia</i> 222.5 g/L (22.25 %)	STK bio-ag Technologies
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Duravel®)†	<i>B. amyloliquefaciens</i> MBI600 (5.5 x 10 ¹⁰ /g) – 110 g/Kg (11 %)	BASF
Tebuconazole (Folicur®)‡	Tebuconazole 200 g/L (20 %)	Bayer
Azoxistrobina (Amistar®)‡	Azoxistrobina 500 g/kg (50.0 %)	Syngenta

* (OE) Óleo essencial; † (ACB) Agente de controle biológico; ‡ Fungicida comercial

Fonte: Do autor (2022).

3.3. Obtenção e caracterização molecular do isolado fúngico

Um isolado de *Alternaria* spp. (Palmeira-PR) de alto potencial agressivo foi fornecido pela Embrapa Hortaliças¹ para o desenvolvimento da pesquisa, sendo logo submetido à caracterização molecular para a identificação da espécie. O DNA genômico foi obtido através

¹ Embrapa hortaliças, Rodovia BR 060 km 9 SN, fazenda Tamandua C.P 218 – 70351-970, Brasília, Distrito Federal.

do protocolo CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) (LESLIE; SUMMERELL, 2006), com modificações. A reação de amplificação foi desenvolvida usando o Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Fisher Scientific AS®, Oslo – Noruega). As regiões dos genes *Alt a1* e *gpd* foram amplificadas com os primers Alt a1 (HONG et al., 2005) e *gpd* (BERBEE; PIRSEYEDI; HUBBARD, 1999), enquanto as regiões da actina (ACT), ATPase da membrana plasmática e calmodulina (CAL), foram amplificadas usando as sequências dos primers desenhados por Lawrence et al. (2013). Os produtos da PCR foram sequenciados pela ACTGene Co. Ltda. (Rio Grande do Sul, Brasil). As sequências de genes para as análises filogenéticas foram obtidas usando o software BLAST no site do GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabela 2). A análise individual e combinada das cinco regiões gênicas e construção da árvore filogenética foram realizadas no software Mega 11.

3.4. Manutenção do isolado

O isolado fúngico cresceu em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) (KASVI®, Laboratórios Conda S.A, Espanha), sendo depois armazenado em geladeira pelo método de Castellani (1967). Para a obtenção de conídios, o fungo foi colocado para crescer em meio de cultura Ágar-Aveia (AA) (40 g de flocos de aveia, 1 L de água destilada, 16 g de ágar). As placas inoculadas foram imediatamente transferidas para BOD e mantidas a 25 °C com luz UV contínua durante 15 dias até o fungo esporular.

3.5. Ensaio *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 no controle de *Alternaria linariae*

3.5.1. Inibição do crescimento micelial

No experimento de inibição do crescimento micelial (ICM) de *Alternaria* spp. foram testadas as concentrações de 500 ppm (0.05 %), 1000 ppm (0.1 %), 2000 ppm (0.2 %) e 4000 ppm (0.4 %) para todos os OEs (tomilho, capim-limão e melaleuca) e o ACB *B. amyloliquefaciens* MBI600 (Tabela 3). No caso dos OEs, estes foram previamente diluídos em Tween 80 (0.01 %), antes de serem acrescentados ao meio de cultura (BDA) (LÓPEZ-MENESES et al., 2017). Os fungicidas tebuconazole e azoxistrobina (controles positivos) foram adicionados em concentrações de 120 ppm (0.012 %) e 1000 ppm (0.1 %), respectivamente, segundo as doses recomendadas pelo fabricante, e apenas água destilada estéril para o controle negativo.

Tabela 2. Isolados de *Alternaria* spp. usados na análise filogenética e seus números de acesso no GenBank

Espécie	Nome anterior	Código do isolado	Tipo	Número de acesso no GenBank				
				Alt a1	GAPDH	Calmodulina	ATPase	Actina
<i>Alternaria calendulae</i>		CBS 224.76; ATCC 38903	T	JQ646414	JQ646330	JQ646229	JQ671895	JQ671720
<i>A. calendulae</i>	<i>Alternaria rosifolli</i>	CBS 116439; EGS 42.197	(T)	KJ718646	KJ717979	-	-	-
<i>A. calendulae</i>		CBS 116650; EGS 30.142	R	KJ718647	KJ717980	-	-	-
<i>A. calendulae</i>		CBS 101498		KJ718645	KJ717978	-	-	-
<i>Alternaria crassa</i>		CBS 116648; EGS 50.180	R	KJ718667	KJ717999	-	-	-
<i>A. crassa</i>		CBS 116647; EGS 46.013	R	KJ718666	KJ717998	-	-	-
<i>A. crassa</i>		CBS 110.38	T	KJ718665	KJ717997	-	-	-
<i>A. crassa</i>		CBS 103.18		KJ718664	KJ717996	-	-	-
<i>A. crassa</i>	<i>Alternaria capsici</i>	CBS 109160; EGS 45.075	(T)	GQ180087	GQ180071	JQ646256	JQ671922	JQ671747
<i>Alternaria grandis</i>		CBS 116695; EGS 44.108	R	KJ718748	KJ718070	-	-	-
<i>A. grandis</i>		CBS 109158; EGS 44.106	T	JQ646425	JQ646341	JQ646249	JQ671915	JQ671740
<i>Alternaria nitrimali</i>		CBS 109163; EGS 46.151	T	JQ646442	JQ646358	JQ646268	JQ671934	JQ671759
<i>Alternaria linariae</i>		CBS 105.41; EGS 07.016	T	KJ718692	KJ718024	-	-	-
<i>A. linariae</i>	<i>Alternaria tabasco</i>	CBS 116441; EGS 45.108	(T)	KJ718696	KJ718028	-	-	-
<i>A. linariae</i>		CPC 21620		KJ718698	KJ718030	-	-	-
<i>A. linariae</i>	<i>Alternaria subcylindrica</i>	CBS 109161; EGS 45.113	(T)	JQ646429	JQ646345	JQ646254	JQ671920	JQ671745
<i>A. linariae</i>		CBS 108.53		KJ718693	KJ718025	-	-	-
<i>A. linariae</i>	<i>Alternaria tomatophila</i>	CBS 109156; EGS 42.156	(T)	JQ646431	JQ646347	JQ646257	JQ671923	JQ671748
<i>A. linariae</i>	<i>A. tomatophila</i>	CBS116704; EGS 44.074	(R)	KJ718697	KJ718029	-	-	-
<i>A. linariae</i>	<i>Alternaria cucumericola</i>	CBS 116438; EGS 41.057	(T)	KJ718695	KJ718027	-	-	-
<i>A. linariae</i>		CBS 107.61		KJ718694	KJ718026	-	-	-
<i>A. linariae</i>	<i>A. cretica</i>	CBS 109164; EGS 46.188	(T)	JQ646426	JQ646342	JQ646250	JQ671916	JQ671741
<i>Alternaria solani</i>	<i>Alternaria viciae-fabae</i>	CBS 116442; EGS 46.162	(T)	KJ718747	KJ718069	-	-	-
<i>A. solani</i>	<i>Alternaria</i>	CBS 111.44; EGS 07.029	(T)	KJ718745	KJ718068	JQ646237	JQ671903	JQ671728

	<i>danida</i>							
<i>A. solani</i>		CBS 111.41		KJ718744	KJ718067	-	-	-
<i>A. solani</i>		CBS 109157; EGS 44.098	R	KJ718746	GQ180080	-	-	-
<i>A. solani</i>		CBS 106.21		KJ718743	KJ718066	-	-	-
<i>Alternaria solani-nigri</i>	<i>Alternaria ascaloniae</i>	CBS 121347; EGS 46.052	(T)	KJ718754	KJ718076	-	-	-
<i>A. solani-nigri</i>		CBS 117101; EGS 51.032	R	KJ718753	KJ718075	-	-	-
<i>A. solani-nigri</i>	<i>Alternaria beticola</i>	CBS 116447; EGS 47.196	(T)	KJ718752	KJ718074	-	-	-
<i>A. solani-nigri</i>	<i>Alternaria glyceriae</i>	CBS 116334; EGS 51.107	(T)	KJ718751	KJ718073	-	-	-
<i>A. solani-nigri</i>	<i>Alternaria herbiculiniae</i>	CBS 116332; EGS 49.180	(T)	KJ718750	KJ718072	-	-	-
<i>A. solani-nigri</i>	<i>Alternaria cyphomandrae</i>	CBS 109155; EGS 40.058	(T)	JQ646444	JQ646360	JQ646270	JQ671936	JQ671761
<i>A. solani-nigri</i>		CBS 113403; EGS 51.106	R	JQ646417	JQ646333	JQ646233	JQ671899	JQ671724
Palmeira-PR								

T: isolado *ex-type*; R: isolado representativo. As letras entre parênteses referem-se a nomes das espécies sinônimas.

Tabela 3. Tratamentos com base em óleos essenciais e *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600.

Tratamento	Concentração (ppm)
Tomilho	500
	1000
	2000
	4000
Capim-limão	500
	1000
	2000
	4000
Melaleuca	500
	1000
	2000
	4000
<i>B. amyloliquefaciens</i>	500
	1000
	2000
	4000
Tebuconazole (controle positivo 1)	1000
Azoxistrobina (controle positivo 2)	120
Água destilada (controle negativo)	0

Fonte: Do autor (2022).

Um disco (5 mm Ø) de meio de cultura com crescimento do fungo foi retirado do bordo das colônias de 10 dias de idade e colocado no centro da placa de Petri, repetindo isto para cada um dos tratamentos. As placas foram seladas com filme plástico e incubadas em BOD, a temperatura de 25 °C ± 1 °C.

As avaliações foram realizadas aos oito dias após da inoculação no meio de cultura em placas de Petri, onde se mediram os diâmetros das colônias com paquímetro digital. As avaliações foram realizadas até que as colônias do tratamento controle negativo alcançassem 2/3 da superfície do meio de cultura. A inibição do crescimento micelial (ICM) estimou-se pela equação [1] de Ji et al. (2013).

[1]

$$\text{ICM} = \frac{\text{Ctrl} - \text{Trat}}{\text{Ctrl}} \times 100$$

Onde **Ctrl** é o crescimento da colônia controle negativo e **Trat** é o crescimento da colônia em meio de cultura emendado com OEs, *B. amyloliquefaciens* MBI600 ou fungicidas.

A partir dos dados da ICM foi calculada a concentração média efetiva (EC_{50}), a mesma que foi estimada através da análise não linear da curva dose – resposta, no software Graphpad Prism (versão 6.0).

3.5.2. Germinação de conídios

Na avaliação do efeito dos OEs e *B. amyloliquefaciens* MBI600 na germinação de conídios foram testadas as mesmas concentrações do que para a avaliação da ICM. Alíquotas com as dosagens já mencionadas (na seção de inibição do crescimento micelial) foram acrescentadas ao meio de cultura Batata-Dextrose-Broth (PDB) (KASVI®, Laboratórios Conda S.A, Espanha). Um mL de meio PDB com as doses já mencionadas para cada tratamento (OEs ou *B. amyloliquefaciens*) foi colocado em cada poço de placas para cultivo de tecidos (K12-024, KASVI®). Esse mesmo procedimento foi realizado para os tratamentos controles.

Para a obtenção de conídios, foram acrescentados 5 mL de água destilada estéril às placas com colônias do fungo de 15 dias de idade em estado de esporulação, crescendo em meio de cultura AA. Em seguida, realizou-se a raspagem das colônias com alça de Drigalski para remover os conídios. A suspensão foi filtrada através de uma gaze estéril e ajustou-se a concentração de conídios em 10^5 conídios/mL, usando câmara de Neubauer. Depois, 0.1 mL de suspensão de conídios foram adicionados a cada poço das placas onde achavam-se já depositados os respectivos tratamentos. Imediatamente, as placas foram incubadas em incubadora (TECNAL TE-420) a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e 110 rpm durante 14 horas, sem fotoperíodo. Percorridas as 14 horas foi acrescentado lactoglicerol para deter o crescimento dos tubos germinativos dos conídios. Para a contagem dos conídios, alíquotas de 60 μL de cada tratamento foram colocadas em lâminas microscópicas e levadas para observação e contagem em microscópio (Carl Zeiss Primo Star, Jena, Germany). Foi considerado germinado, o conídio que apresentou um tubo germinativo com comprimento maior à metade do tamanho do conídio. Um total de 150 conídios foi contado, sendo 50 conídios por repetição.

Tanto para o teste de ICM quanto para o teste de germinação de conídios usou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 e 3 repetições, respectivamente. Cada placa de Petri considerou-se uma repetição, da mesma forma cada poço das placas foi considerado uma repetição. Todos os experimentos foram repetidos no tempo, mais uma vez para o teste de ICM e mais duas vezes para o teste de germinação de conídios.

3.6. Ensaio *in vivo* da atividade antifúngica do OE de tomilho e *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 no controle de *Alternaria linariae*

3.6.1. Preparação do inóculo

A preparação do inóculo foi desenvolvida seguindo a metodologia do Marchi, Borges e Mizubuti (2006) com modificações. O isolado fúngico foi cultivado em meio de cultura AA. Aos 15 dias de idade da cultura, adicionou-se 10 mL de água destilada estéril em cada uma das placas, e com auxílio da alça de Drigalski foi feita a raspagem da colônia fúngica para a obtenção da suspensão de conídios. A suspensão de conídios foi filtrada através de gaze estéril e ajustou-se à concentração de 5×10^3 conídios/mL em câmara de Neubauer (MARCHI; BORGES; MIZUBUTI, 2006).

3.6.2. Condições do experimento

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação, nas dependências do DFP da UFLA. O cultivar de tomate Santa Clara, susceptível a *Alternaria* spp. foi utilizado no teste *in vivo* da atividade antifúngica de OEs e *B. amyloliquefaciens* MBI600. Um *screening* inicial foi desenvolvido para a seleção dos tratamentos com maior eficiência de controle. Dessa seleção, foram escolhidos o OE de tomilho, ACB *B. amyloliquefaciens* MBI600 e tebuconazole para o desenvolvimento do experimento. As sementes de tomate foram plantadas em bandejas de isopor de 128 células, e mantidas sob fotoperíodo de 12 horas até a germinação. Aos 15 dias de idade as plantas foram transferidas a vasos de 5 L com substrato para hortaliças (Tropstrato HT; Vida Verde, Campinas, SP), com pH 5.8. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante todo o ciclo da cultura. A irrigação foi fornecida com base nas necessidades hídricas das plantas, mantendo a umidade do substrato em condições de capacidade de campo. A adubação inicial (no transplante) das plantas foi realizada com uma mistura física de superfosfato simples (18P-16Ca-10S) e adubo 04-14-08, a partir da fase de início da floração as plantas foram adubadas com adubo 20-0-20.

Após 20 dias do transplante (ddt), as plantas no estado fenológico V5 foram inoculadas com suspensão de conídios na concentração de 5×10^3 conídios/mL + espalhante adesivo Tween 80 (0,01%), usando um pulverizador manual. Após da inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento com nebulização por 24 horas sob temperatura de 25 °C, umidade relativa ajustada a 95 % e sem fotoperíodo. As plantas foram levadas para casa de vegetação para a avaliação do experimento.

Após 24 horas da inoculação, realizaram-se aplicações foliares dos tratamentos com o OE de tomilho, ACB *B. amyloliquifaciens* MBI600 e tebuconazole nas concentrações de 2000 ppm, 1500 ppm e 1000 ppm, respectivamente. O OE de tomilho e ACB *B. amyloliquifaciens* MBI600 foram aplicados semanalmente, enquanto o tebuconazole foi aplicado em frequências de 14 dias, seguindo as recomendações do fabricante. Após 8 dias da inoculação (após o período de latência) foi calculada a área foliar infectada através do pacote “Pliman” (OLIVOTO, 2021) no software R 4.1.0 (R CORE TEAM, 2021). Além da determinação da área foliar infectada, as plantas foram avaliadas semanalmente utilizando a escala descritiva de Vakalounakis (1983) (Tabela 4).

Tabela 4. Escala descritiva de severidade da doença da pinta preta do tomateiro (VAKALOUNAKIS, 1983).

Nota	Descrição
0	Nenhum sintoma visível na folha.
1	1 -10 % da área foliar afetada.
2	11-25 % da área foliar afetada.
3	26-50 % da área foliar afetada.
4	51-75 % da área foliar afetada.
5	>75 % da área foliar afetada.

As notas registradas nas avaliações de severidade da doença foram convertidas a Índice da Doença (ID) (MCKINNEY, 1923). Esses índices foram usados para a estimação da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) (CAMPBELL; MADDEN, 1990) [2, 3].

[2]

$$ID (\%) = \sum \frac{(f * v)}{(n * x)} x 100$$

Onde, ID = índice da doença; F = número de folhas com determinada nota; v = grau da infecção (nota); n = número total de folhas avaliadas; e x = grau máximo da infecção (nota).

[3]

$$AACPD = \sum_i^{n-1} \left(\frac{X_i + X_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Onde, X_i é a pontuação (nota) da severidade na i -th observação; t_i é o tempo da i -th observação; e n é o número total de observações.

Foram avaliados os parâmetros de crescimento e produtividade: altura da planta (cm), diâmetro do caule (mm), número de folhas, peso fresco e seco das plantas (g), número de frutos, peso de médio de frutos (g), produtividade/planta (kg).

Os tratamentos foram distribuídos num delineamento inteiramente casualizado com seis repetições, onde cada repetição esteve representada por uma planta. O experimento foi repetido mais uma vez no tempo.

3.7. Análise bioquímica da atividade de enzimas relacionadas à defesa

3.7.1. Obtenção dos extratos enzimáticos

As amostras de plantas infectadas ou não foram coletadas às 48, 96, 144 e 192 horas após a inoculação. Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos por meio de homogeneização de 0.3 g de folhas com N_2 líquido em almofariz. Foi adicionado 2 mL de solução de extração, constituída de EDTA 0.1 mM em tampão de fosfato de potássio 0.1 M, pH 6.8, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM e polyvinylpyrrolidone (PVP) 1 %. O homogeneizado foi centrifugado por 20 minutos, a 12.000 g, a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado nas avaliações enzimáticas e nas dosagens de proteína.

3.7.2. Determinação da atividade enzimática: Peroxidases, Fenilalanina amônia-liase, Polifenol oxidases e β -1,3-glucanase

a. Peroxidases

A atividade da peroxidase (POX) foi determinada seguindo-se os procedimentos descritos por Kar e Mishra (1976), com modificações. Alíquotas de 2.5 μ L do extrato enzimático bruto de folhas adicionaram-se a 197.5 mL de uma mistura de reação constituída de tampão fosfato de potássio 70 mM pH 6.8 (137.5 mL), guaiacol 50 mM (30 mL) e H_2O_2 250 mM (30 mL). O acréscimo na absorvância a 480 nm e 30 °C foi medido durante o primeiro minuto da reação pela produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 2.47 $mM^{-1}cm^{-1}$ (CHANCE; MAEHLEY, 1955) e o resultado foi expresso em $mmol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ proteína.

b. Fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) foi determinada de acordo à metodologia de El-Shora (2002), com modificações. Alíquotas de 9 μ L do extrato enzimático

foram adicionadas a 161 μL da mistura de Tris-HCl 40 mM pH 8.8 (110 μL) e L-Fenilalanina 87.5 mM (51 μL), com volume final da reação de 170 μL . A mistura da reação foi incubada a 37 °C por 60 minutos. O aumento na absorbância foi determinado no comprimento de onda de 290 nm em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro, para verificar a formação de ácido trans-cinâmico. Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar $104 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ZUCKER, 1965) e os resultados foram expressos em $\text{mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

c. Polifenol oxidase

A atividade da polifenol oxidase (PPO) foi determinada conforme método descrito por Kar e Mishra (1976), com modificações. Alíquotas de 20 μL do extrato enzimático foram adicionadas a 180 μL de uma mistura de reação constituída de tampão fosfato de potássio 70 mM (140 μL) e catecol 20 mM (40 μL). O aumento na absorbância foi determinado no comprimento de onda de 410 nm em um ensaio colorimétrico no espectrofotômetro durante um período de 10 min a 30 °C. Foi utilizado para os cálculos o coeficiente de extinção molar $2.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHANCE; MAEHLEY, 1955) e os resultados foram expressos em $\text{mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

d. β -1,3-glucanase

A atividade da β -1,3-glucanase (GLU) foi determinada através do método descrito por Lever (1972), com modificações. A reação foi iniciada pelo acréscimo de uma alíquota de 5 μL de extrato enzimático a uma mistura de reação constituída por 57.5 μL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5), 62.5 μL de laminarina ($4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e 125 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (NDS). Essa mistura de reação foi incubada a 45 °C por 60 minutos. Após esse período, a mistura foi incubada a 100 °C por mais 15 min. A reação foi interrompida pela colocação das amostras em banho de gelo. As amostras controles foram preparadas da mesma forma, no entanto, o extrato foi adicionado depois de aquecer a mistura da reação a 100 °C. A leitura da absorbância do produto liberado pela GLU foi obtida em 540 nm no espectrofotômetro, e sua atividade foi expressa em $\Delta\text{Abs min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteína.

3.8. Análise histoquímica de tecidos foliares infectados ou não por *Alternaria linariae*

Para a análise da colonização dos tecidos por *A. linariae*, foram coletadas folhas não sintomáticas (tratamento controle) e sintomáticas com a pinta preta do tomateiro. As amostras foram coletadas em dois tempos: 48 e 192 horas após a inoculação. As secções das folhas foram fixadas em solução de Karnovsky; glutaraldeído 2.5 %, paraformaldeído 2% e tampão cacodilato pH 7.2, 0.05 M + CaCl_2 0.001 M, por 72 horas. Após da fixação, foi feita a

desidratação em série etanólica (25, 50, 75, 90, e 100 % x 2) e incorporação em resina metacrilato (Historesin; Leica).

No processo de infiltração, o álcool 100 % foi substituído pela resina 1:1, as secções foram submetidas ao vácuo durante 5 minutos (3x) e mantidas na geladeira por 24 horas (período mínimo). A resina 1:1 foi substituída pela resina ativada pura e as secções submetidas ao vácuo durante 5 minutos (3x) a cada 10 min. e mantidas na geladeira 72 horas.

Para o emblocamento, foi utilizada a resina de inclusão previamente preparada e refrigerada. Subsequentemente, foram colocadas 2 a 3 gotas de resina de emblocamento no fundo de cada “forma” do histomold, o mesmo que imediatamente foi levado à estufa (60 °C) por 7 – 10 minutos. Depois, as secções do material vegetal foram colocadas por cima da resina da “forma” e novamente adicionaram-se 2 a 3 gotas de resina de emblocamento por cima do material, de modo que ficasse totalmente coberto. O histomold foi levado mais uma vez à estufa (50 °C) por 24 horas. Os blocos foram retirados do histomold, colados com cola Super Bonder na madeira e identificados.

Após a secagem, os blocos foram seccionados no micrótomo, com a obtenção de cortes de 8 µm. Logo, esses cortes foram montados em lâminas de microscópio (25.4 x 76.2 mm). Para a detecção de compostos fenólicos foi usado o reagente cloreto férrico, seguindo o método descrito por Marques e Soares (2021). A presença de calose foi determinada pela coloração dos tecidos com azul de anilina, seguindo o método descrito por Eggert et al. (2014), com modificações. O acúmulo de lignina foi detectado através da coloração com fucsina básica, seguindo o método descrito por Ursache et al. (2018), com modificações. As imagens da resposta dos tecidos das plantas ao fungo foram obtidas em microscópio de Epi-Fluorescência Carl Zeiss MicroImaging Z1 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

3.9. Análises estatísticas dos dados

Inicialmente foram analisados os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos valores médios dos tratamentos. Quando esses pressupostos foram satisfeitos procedeu-se realizar a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltipla de Scott-Knot ($P \leq 0,05$), e em alguns casos o teste de Dunnett ($P \leq 0.05$) para comparação dos tratamentos comuns com as testemunhas. No entanto, quando esses pressupostos não foram atendidos, escolheu-se o teste de Kruskal-Wallis (para K grupos independentes), seguido pelo teste de Dunn-Bonferroni ($P \leq 0.05$). Os experimentos foram repetidos uma vez no tempo com resultados semelhantes. Os valores dos experimentos

repetidos no tempo foram analisados de maneira conjunta, após o teste de homogeneidade das variâncias residuais (Teste F_{\max} de Hartly). Todos os cálculos e análises estatísticas foram realizadas no software *R* 4.1.0 (R CORE TEAM, 2021), nos pacotes estatísticos *ExpDes.pt* e *Tratamentos.ad*.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação molecular do isolado fúngico

A análise filogenética combinada das regiões *Alt a1* e *gpd* agrupou o isolado Palmeira-PR ao clado de *Alternaria linariae*, espécie antes subdivida em *A. tomaphila*, *A. cretica* e *A. subcilíndrica* e atualmente renomeada como *A. linariae* (WOUDENBERG et al., 2014) (Figura 2).

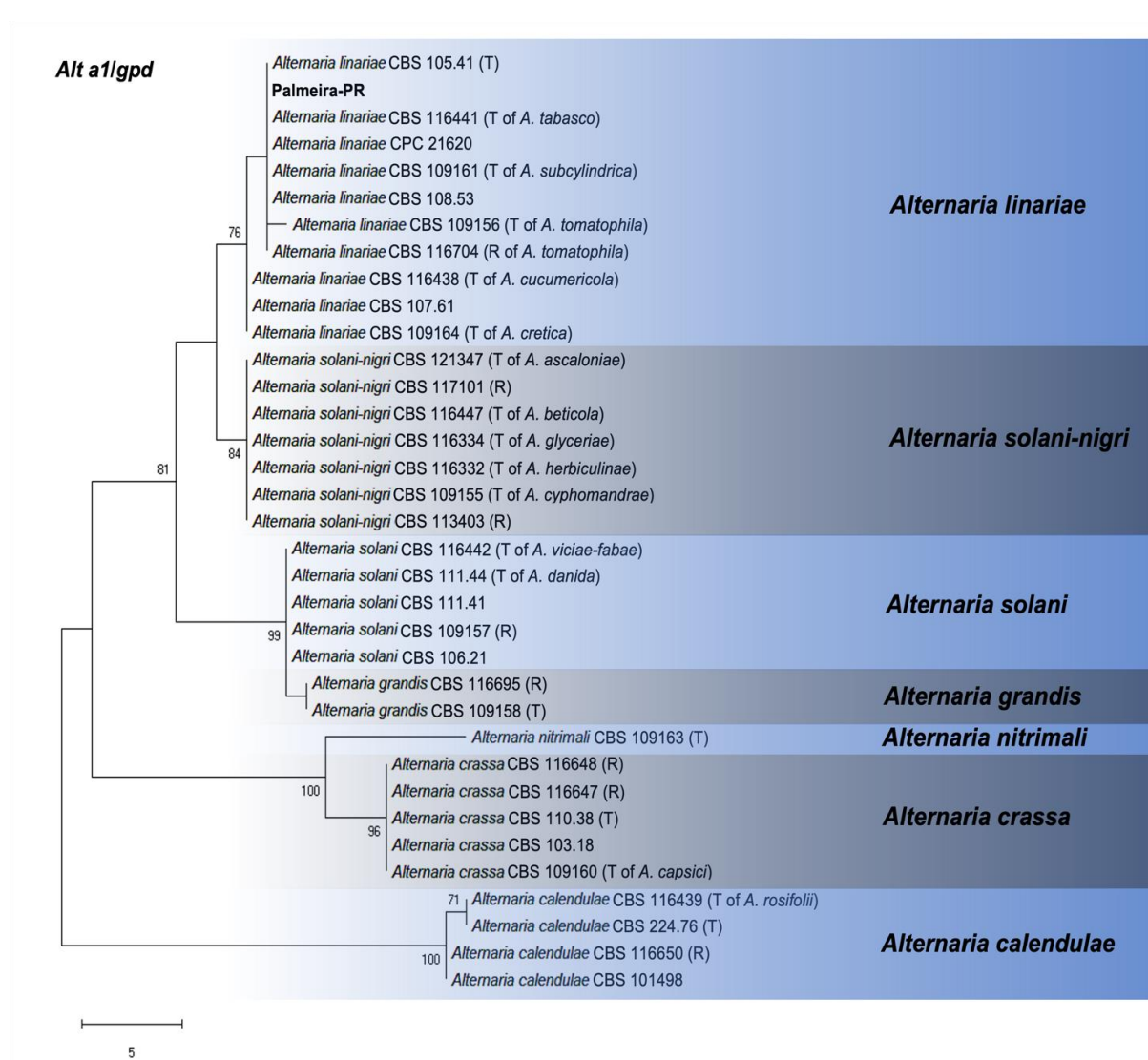


Figura 2. Análise filogenética utilizando *Maximum Parsimony* de isolados de *Alternaria* spp. da secção Porri baseado nas sequências dos genes *Alt a1* e *gpd*. O isolado deste estudo está indicado em negrito. Valores de *bootstrap* $\geq 70\%$ são mostrados nos entrenós da árvore. Isolados de *Alternaria calendulae* foram utilizados como *outgroup*. T: isolado *ex-type*; R: isolado representativo.

Fonte: Do autor (2022).

Embora a análise combinada dos genes *Alt a1* e *gpd* tenha fornecido um agrupamento confiável, a análise combinada dos genes *All a1*, *gpd*, *ATPase*, *Actina* e *Calmodulina* permitiu agrupar com maior suporte (*bootstrap* = 95) o isolado Palmeira-PR junto com outros isolados representativos de *A. linariae* (Figura 3).

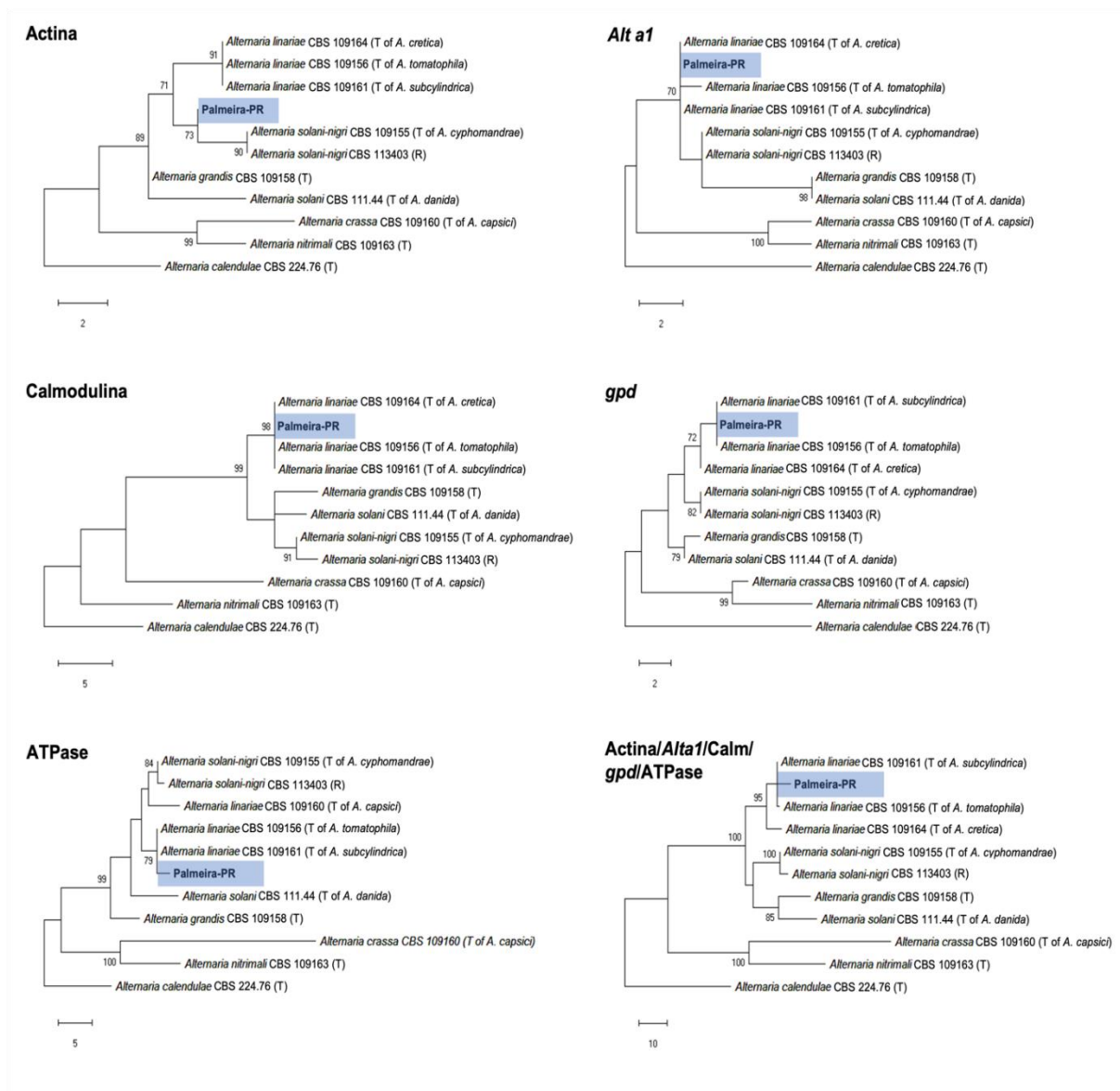


Figura 3. Análise filogenética utilizando *Maximum Parsimony* de isolados de *Alternaria* spp. O isolado deste estudo está indicado em negrito. Valores de *bootstrap* $\geq 70\%$ são mostrados nos entrenós da árvore. *Alternaria calendulae* (CBS 224.76) foi utilizado como *outgroup*. T: isolado *ex-type*; R: isolado representativo.

Fonte: Do autor (2022).

4.2. Atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais e *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 no controle de *Alternaria linariae*

4.2.1. Inibição do crescimento micelial

A inibição do crescimento micelial de *A. linariae* apresentou diferenças significativas ($P \leq 0.05$) pelo efeito dos óleos essenciais (OEs) e o agente de controle biológico (ACB) *B. amyloliquefaciens* MBI600 (Tabela 5), e diferiu de acordo com as concentrações, existindo também diferenças significativas na interação OE ou *B. amyloliquefaciens* MBI600 x concentração.

Tabela 5. Efeito de óleos essenciais e *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 na inibição do crescimento micelial (%) de *Alternaria linariae*.

Tratamento	Concentração (ppm)			
	500	1000	2000	4000
Tomilho	72.26 b+	66.28 b*+	100.00 a*+	100.00 a*+
Capim-limão	20.85 c*+	32.86 c*	100.00 a*+	100.00 a*+
<i>B. amyloliquefaciens</i>	87.47 a+	85.45 a+	85.13 b +	84.93 b+
Melaleuca	10.93 d*+	11.14 d*+	4.97 c*+	1,92 c*+
Tebuconazole (1000 ppm)	79.83			
Azoxistrobina (120 ppm)	37.04			

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0.05$). Médias seguidas de * e + se diferem do tebuconazole e azoxistrobina (controles), respectivamente, pelo teste de Dunnet ($P \leq 0.05$).

Fonte: Do autor (2022).

O ACB MBI600 e o OE de tomilho apresentaram controle sobre o crescimento micelial de *A. linariae* a partir de 500 ppm, com redução de 87.47 e 72.26 %, respectivamente, e não diferiram do tebuconazole (79.83 %; controle positivo 1) ($P \leq 0.05$), mas foram superiores à azoxistrobina (37.04 %; controle positivo 2) (Tabela 5 e Figura 4). O OE de capim-limão apresentou alto nível de controle a partir da concentração de 2000 ppm com 100 % de inibição do crescimento micelial (Tabela 5 e Figura 4). Na concentração de 2000 ppm tanto o OE de tomilho quanto o OE de capim-limão foram superiores em relação ao tebuconazole e azoxistrobina, enquanto ACB MBI600 manteve um nível semelhante de controle em relação ao tebuconazole até a concentração de 4000 ppm. Por outra lado, o OE de Melaleuca apresentou o menor nível de inibição do crescimento micelial com valores entre 10.93 e 1.92 % nas concentrações de 500 ppm e 4000 ppm, respectivamente (Tabela 5 e Figura 4).

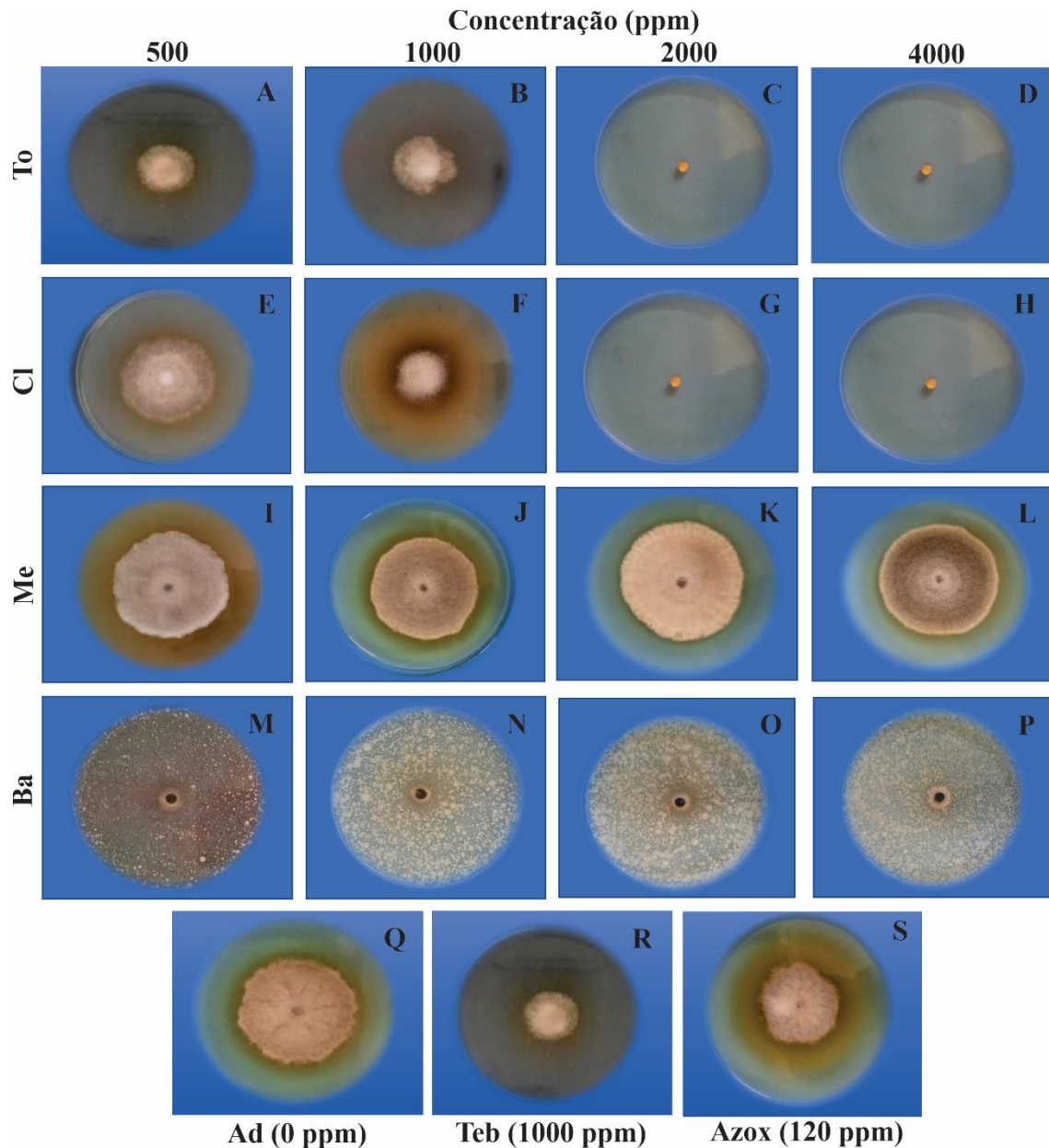


Figura 4. Fotografias de placas de Petri com o teste de crescimento micelial de *Alternaria linariae* em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) contendo diferentes concentrações de óleos essenciais (OEs) e o agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. (A-D) Colônias de *A. linariae* de 8 dias de idade, crescendo sobre meio de cultura BDA, contendo OE de tomilho (*Thymus vulgaris*); (E-H) OE de capim-limão (*Cymbopogon citratus*); (I-L) OE de Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*); e (M-P) o ACB MBI600, em concentrações de 500 a 4000 ppm. (Q-S) Tratamentos controles: Ad (água destilada; Controle negativo), Teb (tebuconazole; controle positivo 1) e Azox (azoxystrobina; controle positivo 2).

Fonte: Do autor (2022).

O OE de tomilho inibiu o crescimento micelial de *A. linariae* à medida que houve aumento da sua concentração, atingindo o controle máximo (100 %) na concentração de 2000 ppm, o qual foi explicado através do ajuste de regressão quadrática (Figura 5). Por sua

vez, o comportamento do OE de capim-limão foi semelhante ao OE de tomilho, onde a porcentagem de controle absoluto foi também alcançada na concentração de 2000 ppm. No entanto, as concentrações abaixo de 1000 ppm apresentaram deficiência no controle. Pelo contrário, o ajuste de regressão linear mostrou que o OE de melaleuca reduziu o controle do crescimento micelial conforme aumentaram as concentrações. Por fim, ACB MBI600 mostrou um controle alto e constante (entre 87.47 e 84.93 %) em todas as concentrações testadas, sem que existissem diferenças associadas ao efeito das concentrações (Figura 5).

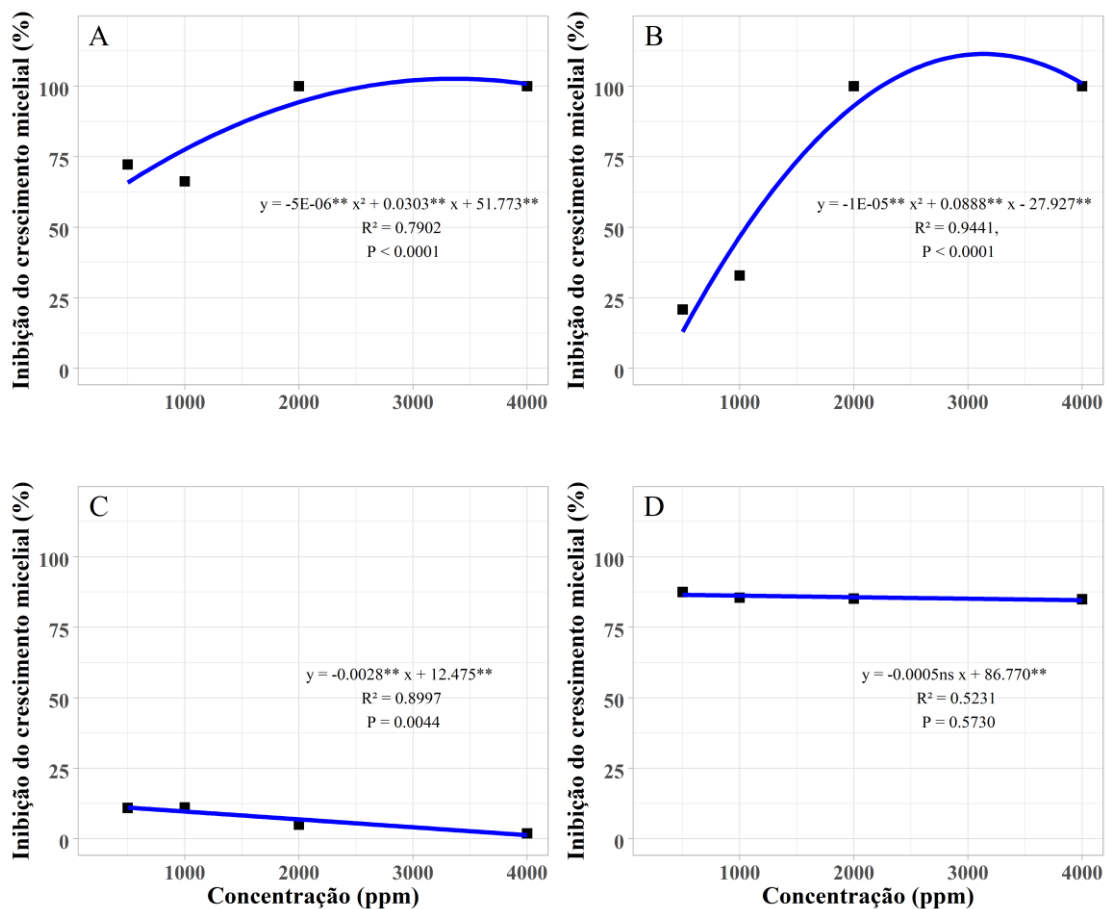


Figura 5. Análise de regressão da relação concentração-inibição do crescimento micelial de *Alternaria linariae* dos diferentes óleos essenciais (OEs) e o agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. OEs de (A) tomilho, (B) capim-limão, (C) melaleuca e (D) ACB MBI600. Resultados representam as médias dos valores de dois experimentos independentes ($n = 10$). ** significância estatística dos coeficientes dos modelos de regressão pelo teste F ($P \leq 0.01$). ns valores não significativos para os coeficientes dos modelos de regressão pelo teste F ($P > 0.05$). R^2 coeficiente de determinação.

Fonte: Do autor (2022).

A concentração média efetiva (EC_{50}) mais baixa que inibiu o crescimento micelial de *A. linariae* foi apresentada por ACB MBI600 (30.55 ppm), enquanto que os OEs de tomilho e capim-limão precisaram de uma EC_{50} de 270 e 1129 ppm, respectivamente, para terem um controle efetivo do crescimento micelial sob condições *in vitro*. Por outro lado, o OE de melaleuca requereu da EC_{50} mais alta (1981 ppm), sem ter apresentado efetiva capacidade de controle (Figura 6).

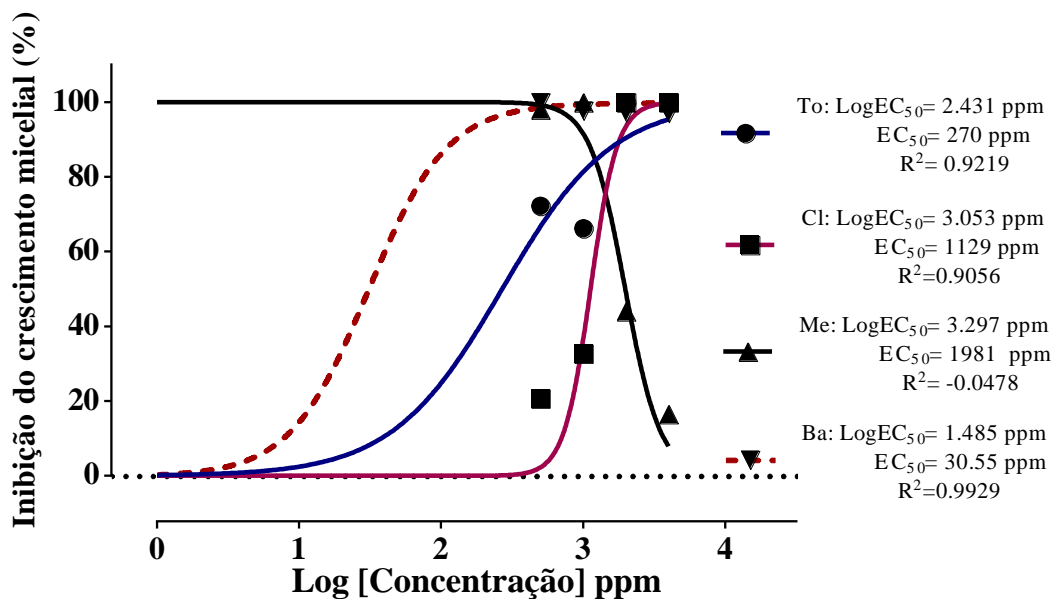


Figura 6. Concentração média efetiva (EC_{50}) de óleos essenciais (OEs) e o agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 no controle de *Alternaria linariae* em condições *in vitro*. Curvas de dose-resposta dos OEs de tomilho (To), capim-limão (Cl), melaleuca (Me) e o ACB MBI600 (Ba), estimadas a partir dos valores de inibição do crescimento micelial com as concentrações de 0, 500, 1000, 2000 e 4000 ppm, transformadas para o $\log(X)$.

Fonte: Do autor (2022).

4.2.2. Germinação de conídios (%)

A porcentagem de germinação de conídios apresentou diferenças significativas ($P \leq 0.05$) sob o efeito dos OEs e suas concentrações. Tanto o OE de tomilho quanto o OE de capim-limão mostraram o maior nível de controle da germinação desde a menor concentração testada (500 ppm). Assim, a germinação de conídios com o OE de tomilho e capim-limão foi de 7.78 até 0.89 % e de 15.30 até 1.11 %, nas concentrações de 500 ppm a 4000 ppm, respectivamente, com controle significativamente superior às testemunhas químicas, cuja porcentagem da germinação foi de 81.39 e 79.60 % para tebuconazole e azoxistrobina, respectivamente (Figura 7).

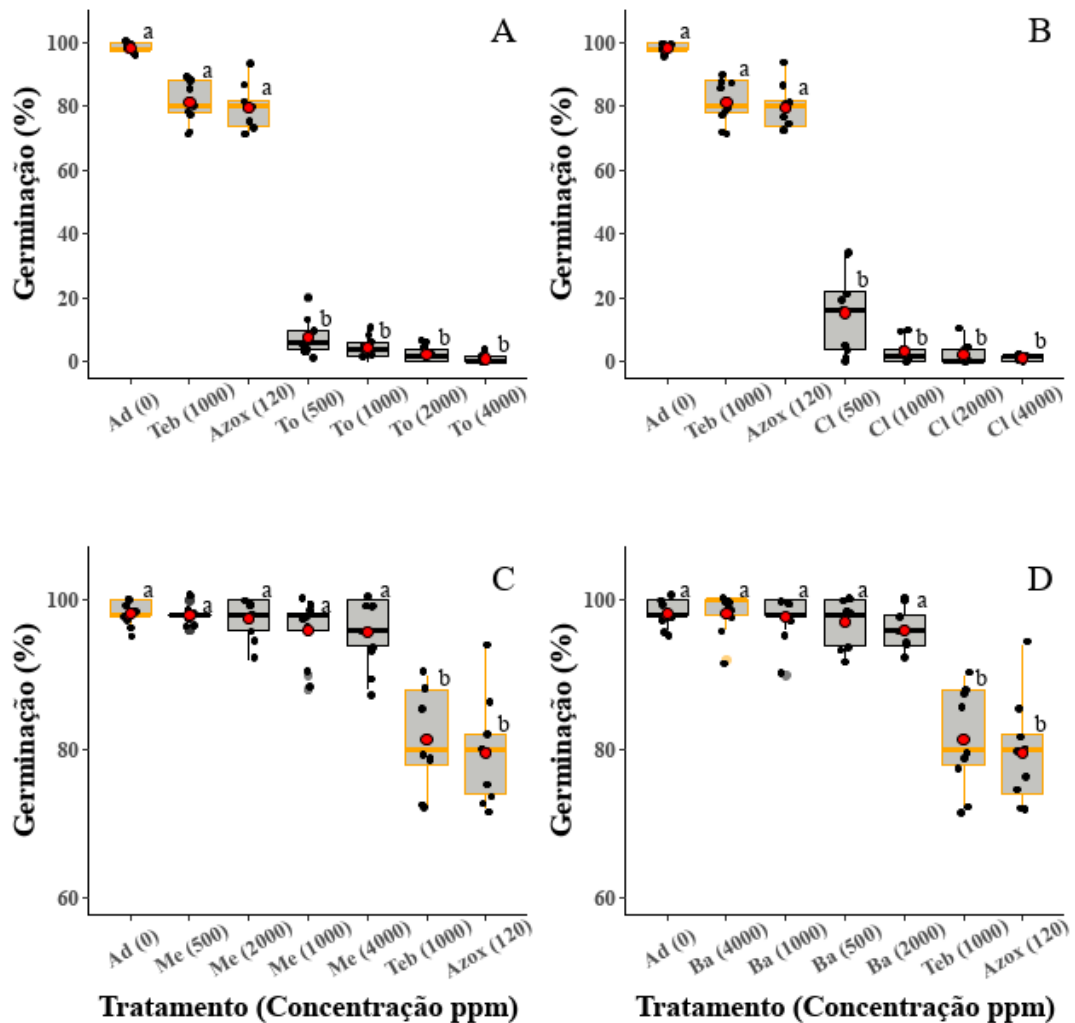


Figura 7. Boxplot da porcentagem de germinação de conídios de *Alternaria linariae* sob efeito de diferentes óleos essenciais (OEs) e o agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. (A) tomilho (To), (B) capim-limão (Cl), (C) melaleuca (Me) e (D) ACB MBI600 (Ba). Teb (tebuconazole; controle positivo 1), Azox (azoxistrobina; controle positivo 2) e Ad (água destilada; controle negativo). Letras iguais nas caixas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$) com ajuste do p -valor segundo o teste de Dunn-Bonferroni ($P \leq 0.05$). Caixas da cor preta e laranja representam os tratamentos comuns (diferentes concentrações de OEs ou o ACB MBI600) e tratamentos controles, respectivamente. Pontos em negrito representam a distribuição dos valores de três experimentos independentes ($n = 9$), enquanto os pontos em vermelho indicam a média dos tratamentos.

Fonte: Do autor (2022).

Por outro lado, a maior porcentagem de germinação de conídios foi observada nos tratamentos com o OE de melaleuca e o ACB MBI600. O primeiro apresentou uma germinação $\geq 96\%$, similar ao ACB MBI600 ($\geq 96\%$), o que indicou a menor capacidade para inibir a germinação de conídios, com efeitos inferiores às testemunhas químicas.

4.3. Atividade antifúngica *in vivo* do OE de tomilho e *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 no controle de *Alternaria linariae*

4.3.1. Área foliar infectada

Todas as plantas de tomate inoculadas com *A. linariae* apresentaram sintomas da pinta preta (PP) do tomateiro aos 3 dias após a inoculação (DAI). No entanto, a área foliar infectada aos 8 DAI apresentou diferenças estatísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre os tratamentos avaliados. A menor porcentagem de área foliar infectada foi observada nas plantas tratadas com tebuconazole, ACB MBI600 e tomilho com 6.99, 12.70 e 20.07 %, respectivamente, e foram diferentes das plantas do controle negativo (inoculadas e tratadas com água destilada), as quais mostraram a maior porcentagem da área foliar infectada (37.71 %) (Figura 8).

4.3.2. Severidade e área abaixo da curva do progresso da doença

A partir dos 7 DAI, as plantas de tomate começaram ter diferentes comportamentos na severidade da doença (PP) ao longo do ciclo da cultura. As plantas tratadas com o OE de tomilho e o ACB MBI600 mantiveram a expressão dos sintomas e severidade da doença a níveis de ≈ 20 %, até os 50 DAI, semelhante ao tebuconazole (controle químico) e significativamente diferente as plantas inoculadas e tratadas apenas com água, que apresentaram nesse tempo de avaliação cerca de 50 % de severidade da doença (Figura 9; A-E). A partir desse período de avaliação, as plantas mostraram um incremento importante na severidade da doença até os 70 DAI, onde os tratamentos diferiram estatisticamente entre si ($P \leq 0.05$). O tratamento químico apresentou 27.50 % no índice final da doença, com baixo nível de desfolhamento, enquanto o índice da doença para os tratamentos com base ao ACB MBI600 e o OE de tomilho foram de 36.74 e 42.00 %, respectivamente, também com baixo nível de desfolhamento. Entretanto, as plantas tratadas apenas com água mostraram cerca de 70 % do índice final da doença, com severo nível de desfolhamento (Figura 9E).

Por fim, a intensidade acumulada da doença no tempo foi expressa como AACPD, e os valores mais altos foram registrados para as plantas inoculadas que não receberam tratamento, com AACPD de 2366. Por sua vez, as plantas tratadas com o OE de tomilho e ACB MBI600 apresentaram uma AACPD em média de 1176 e 1020, respectivamente, enquanto o tebuconazole mostrou a menor AACPD (877), ou seja, a menor intensidade da doença no final do ciclo da cultura (Figura 9F).

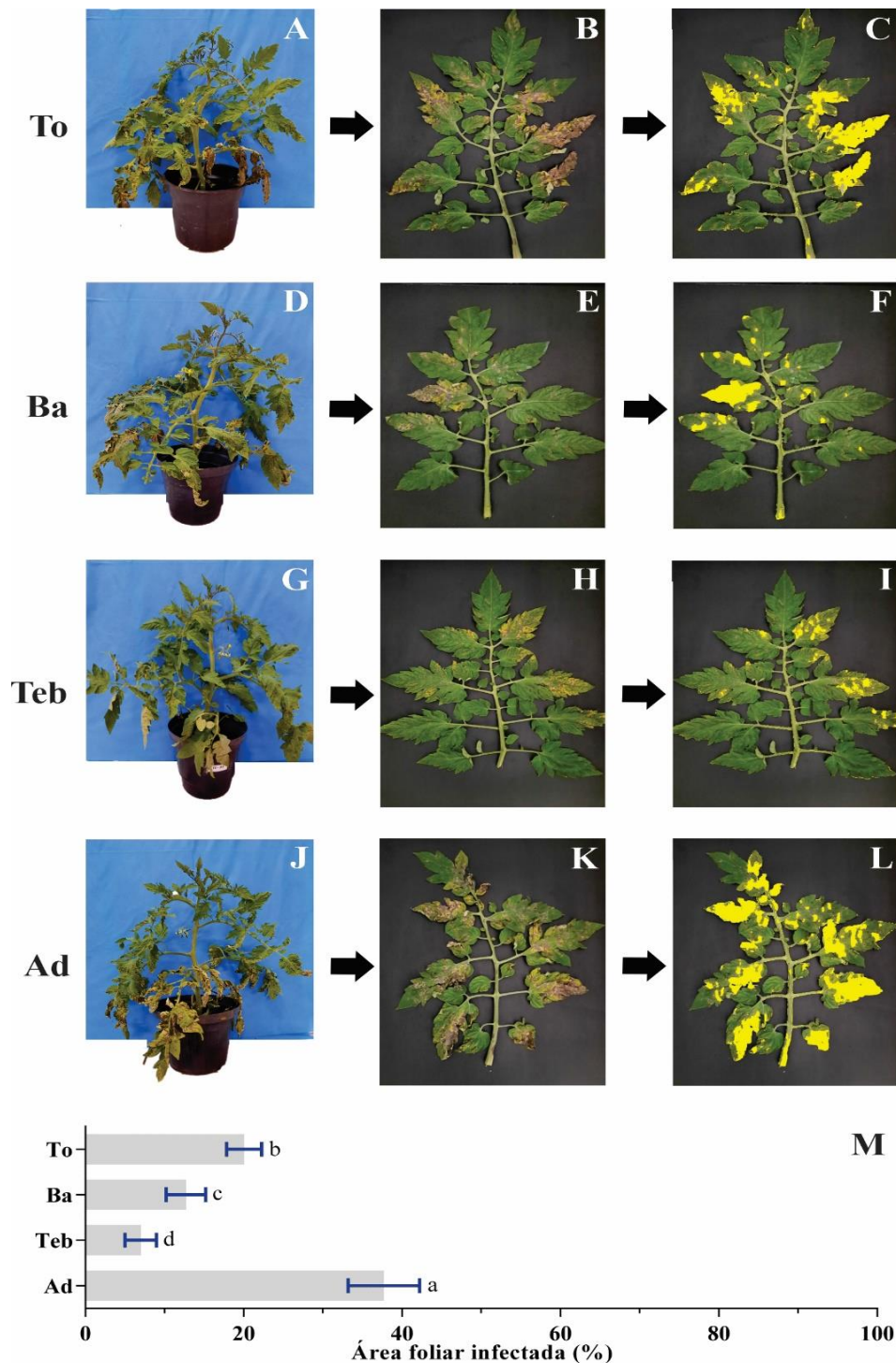


Figura 8. Fotografia da área foliar infectada por *Alternaria linariae* em plantas de tomate (cv. Santa Clara) tratadas com o óleo essencial (OE) de tomilho e o agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. Plantas de tomate com sintomas da pinta preta 8 dias após a inoculação, tratadas com OE de (A) tomilho (To), (D) ACB MBI600 (Ba), (G) tebuconazole (Teb) e (J) água destilada (Ad). (B, E, H e K) sintomas e área foliar infectada da terceira folha e (C, F, I e L) estimativa da área foliar infectada em plantas tratadas com To, Ba, Teb, e Ad, respectivamente. (M) Barras com letras diferentes são significativamente diferentes entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($P \leq 0.05$).

Fonte: Do autor (2022).

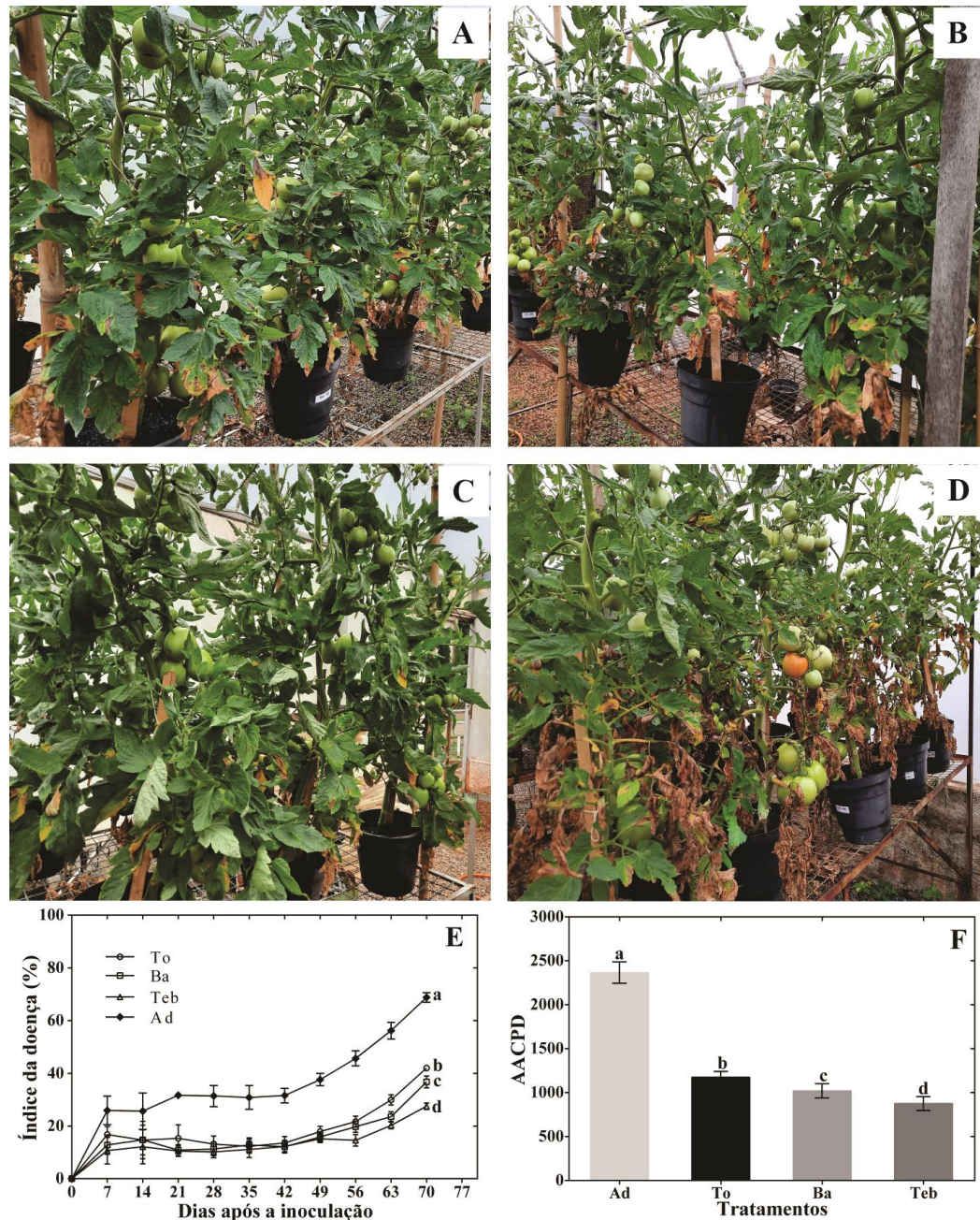


Figura 9. Fotografias de plantas de tomate cv. “Santa Clara” com sintomas da pinta preta (PP) aos 50 dias após a inoculação (DAI) com *Alternaria linariae*, e tratadas com: (A) o agente de controle biológico (ACB) *B. amyloliquifaciens* MBI600, (B) óleo essencial (OE) de tomilho, (C) tebuconazole e (D) água. (E) Curva do progresso da doença da PP do tomateiro ao longo do ciclo da cultura e índice (severidade) final da doença. Valores representam a média do índice de doença avaliada semanalmente. Os índices da doença na última semana de avaliação (70 DAI) seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0.05$). (F) Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Valores médios da AACPD são o resultado do índice acumulado da doença. Barras com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0.05$). Tratamentos: OE de tomilho (To); ACB MBI600 (Ba); tebuconazole (Teb); água destilada (Ad).

Fonte: Do autor (2022).

4.3.3. Parâmetros de crescimento vegetativo

A altura das plantas apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($P \leq 0.05$). As plantas tratadas com o ACB MBI600 e tebuconazole mostraram médias com maior altura de planta, 139.23 e 135.31cm, respectivamente, seguido pela altura das plantas tratadas com o OE de tomilho (128.78 cm). Entretanto, as plantas controle alcançaram 120.44 cm de altura média. No caso do diâmetro do caule, as plantas que receberam tratamentos com base ao OE de tomilho, ACB MBI600, e tebuconazole mostraram maiores diâmetros de caule, quando foram comparados com as plantas apenas tratadas com água (Tabela 6).

O número de folhas variou de maneira significativa ($P \leq 0.05$) de acordo com os tratamentos estudados. As plantas pulverizadas com o ACB MBI600 e tebuconazole mantiveram um total de 12.83 e 13.5 folhas no final do ciclo da cultura, com mínimo desfolhamento, enquanto as plantas tratadas com OE de tomilho conservaram em média 11.50 folhas. Entretanto, o número de folhas foi negativamente afetado nas plantas tratadas apenas com água, com um registro de apenas 6.83 folhas, e isto foi traduzido em severo desfolhamento (Tabela 6).

A resposta das plantas de tomate aos diferentes tratamentos afetou o peso úmido das plantas ($P \leq 0.05$). O maior peso das plantas (675 g) foi expresso pelas plantas tratadas com tebuconazole, seguido das plantas tratadas com o ACB MBI600 e o OE de tomilho com 543.92 e 466.75 g, respectivamente, os quais foram estatisticamente diferentes dos valores observados em plantas que não receberam tratamento, com média apenas de 328.58 g. Um comportamento semelhante foi obtido com o peso seco, onde as plantas pulverizadas com tebuconazole, o ACB MBI600 e o OE de tomilho apresentaram maior peso seco de plantas quando comparados com plantas tratadas apenas com água destilada (Tabela 6).

Tabela 6. Respostas nos parâmetros de crescimento vegetativo e reprodutivos da cultura do tomateiro sob a aplicação do óleo essencial (OE) de tomilho e do agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 no controle da pinta preta causada por *Alternaria linariae*.

Tratamento ^w	Parâmetros do crescimento vegetativo ^t					Parâmetros reprodutivos ^v		
	Altura de planta (cm) ± SD ^x	Diâmetro de caule (mm) ± SD	Número de folhas ± SD	Peso úmido de planta (g) ± SD	Peso seco de planta (g) ± SD	Peso de fruto (g) ± SD	Número de frutos/planta ± SD	Produtividade/planta (Kg) ± SD
OE de Tomilho	128.78±4.99 ^b ^y	16.17±0.66 ^a	11.50±0.52 ^c	466.75±120.07 ^c	97.88±28.95 ^b	125.91±9.56 ^a	18.67±2.67 ^a	2.34±0.32 ^a
<i>B. amyloliquefaciens</i> MBI600	139.23±3.56 ^a	16.00±0.87 ^a	12.83±0.83 ^b	543.92±93.83 ^b	110.95±29.84 ^b	131.11±5.48 ^a	19.67±1.72 ^a	2.58±0.27 ^a
Tebuconazole	135.31±4.37 ^a	16.17±0.78 ^a	13.50±0.52 ^a	675.00±128.78 ^a	130.16±28.98 ^a	132.39±5.92 ^a	19.33±2.71 ^a	2.55±0.36 ^a
Água	120.44±6.95 ^c	13.98±0.82 ^b	6.83±0.94 ^d	328.58±64.92 ^d	68.82±14.30 ^c	100.82±7.56 ^b	17.50±1.45 ^a	1.76±0.13 ^b
CV (%) ^z	3.91	6.98	6.52	20.83	25.82	5.96	11.6	12.3

^t Os parâmetros vegetativos, altura e diâmetro de caule foram avaliados aos 50 dias após a inoculação (DAI), enquanto o número de folhas, peso úmido e seco de planta foram avaliados no final do ciclo da cultura (70 DAI).

^v Os valores dos parâmetros reprodutivos são o resultado das colheitas acumuladas até o final do ciclo da cultura (70 DAI).

^w Tratamentos testados: as pulverizações foliares do óleo essencial de tomilho e o ACB *B. amyloliquefaciens* MBI600 foram aplicados nas concentrações de 2000 e 1500 ppm, em intervalos de 7 dias. O tebuconazole foi aplicado em frequências de 15 dias, na concentração de 1000 ppm, segundo as recomendações do fabricante. A água (controle negativo) foi também aplicada em intervalos de 7 dias.

^x SD, é o desvio padrão da média dos valores de dois experimentos diferentes ($n = 12$).

^y Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0.05$).

^z CV, coeficiente de variação de Pearson.

Fonte: Do autor (2022).

4.3.4. Parâmetros reprodutivos

O número de frutos não foi afetado pelo efeito dos tratamentos, no entanto, o peso médio de frutos apresentou diferenças significativas ($P \leq 0.05$). Observou-se que as plantas tratadas com o ACB MBI600 e OE de tomilho mostraram pesos de frutos de 131.11 e 125.91 g, respectivamente, e não diferiram estatisticamente ao tebuconazole (132.39 g), não entanto, as plantas tratadas com água registraram uma queda considerável nessa variável, com pesos de frutos de 100.82 g (Tabela 6).

Na soma acumulada das colheitas, as plantas de tomate tratadas com o ACB MBI600 e o OE de tomilho tiveram uma produtividade de 2.58 e 2.34 kg, respectivamente, semelhante estatisticamente ao tebuconazole (2.55 kg) ($P \leq 0.05$), sem apresentar prejuízos na produtividade. Por outro lado, as plantas tratadas apenas com água exibiram uma produtividade de 1.76 kg, o que significou uma perda na produtividade de 32 % (Tabela 6).

4.3.5. Correlações de Pearson

As variáveis epidemiológicas como o índice da doença e AACPD tiveram correlação negativa significativa com os parâmetros de crescimento e produtividade. Tanto o índice da doença quanto a AACPD afetaram o desenvolvimento do diâmetro de caule, altura de planta, peso úmido e seco de planta e número de folhas, ou seja, quanto maiores foram o índice da doença e AACPD, menores valores foram expressos nos parâmetros já mencionados (Tabela 7).

As características reprodutivas como peso médio de frutos e produtividade por planta foram afetadas negativamente pelo incremento dos parâmetros epidemiológicos, apresentando alto índice de correlação (Tabela 7).

A variável altura de planta afetou o número de folhas, e por sua vez, esta teve influência sobre o peso úmido e seco de planta. Por outro lado, tanto o peso de frutos quanto a produtividade por planta, estiveram associados ao número total de folhas. Por fim, a produtividade por planta teve alta dependência tanto do número de frutos quanto do peso de frutos (Tabela 7).

Tabela 7. Média, desvio padrão e correlações com intervalos de confiança entre variáveis associadas aos parâmetros de crescimento vegetativo, reprodutivo e epidemiológicos.

Variável	<i>M</i>	<i>SD</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Diâmetro de caule	15.58	1.41									
2. Altura de planta	130.94	8.73	0.47** [.21, .66]								
3. Peso úmido de planta	503.56	162.43	0.50** [.25, .69]	0.58** [.36, .74]							
4. Peso seco de planta	101.96	34.02	0.50** [.26, .69]	0.52** [.28, .70]	0.94** [.90, .97]						
5. Número de folhas	11.17	2.72	0.64** [.44, .79]	0.74** [.58, .85]	0.71** [.53, .83]	0.62** [.41, .77]					
6. AACPD	1360.28	603.08	-0.64** [-.79, -.44]	-0.71** [-.83, -.54]	-0.71** [-.82, -.53]	-0.63** [-.78, -.42]	-0.95** [-.97, -.91]				
7. Índice da doença	43.77	15.61	-0.62** [-.77, -.41]	-0.72** [-.83, -.55]	-0.74** [-.85, -.58]	-0.65** [-.79, -.45]	-0.95** [-.97, -.92]	0.98** [.96, .99]			
8. Número de frutos/planta	18.79	2.27	-0.01 [-.29, .28]	0.32* [.04, .55]	0.23 [-.06, .48]	0.20 [-.09, .45]	0.34* [.06, .57]	-0.34* [-.57, -.06]	-0.33* [-.56, -.05]		
9. Produtividade/planta	2.31	0.43	0.42** [.16, .63]	0.62** [.40, .77]	0.50** [.25, .69]	0.43** [.16, .63]	0.75** [.59, .85]	-0.75** [-.86, -.60]	-0.74** [-.84, -.57]	0.81** [.68, .89]	
10. Peso de fruto	122.56	14.73	0.73** [.57, .84]	0.67** [.47, .80]	0.57** [.35, .74]	0.50** [.25, .68]	0.85** [.75, .92]	-0.87** [-.93, -.78]	-0.86** [-.92, -.76]	0.20 [-.09, .46]	0.74** [.58, .85]

M e *SD* representam a média e desvio padrão, respectivamente. Os valores entre colchetes indicam o intervalo de confiança de 95% para cada correlação.

* indica $P < 0.05$, ** indica $P < 0.01$.

Fonte: Do autor (2022).

4.4. Atividade de enzimas relacionadas à defesa

O tratamento das plantas de tomate com o OE de tomilho e o ACB MBI600 não induziram um incremento significativo na atividade da peroxidase (POX) nas primeiras 96 horas após a inoculação (HAI) quando comparado com as plantas apenas inoculadas. No entanto, às 144 HAI, a atividade enzimática induzida pelo OE de tomilho e o ACB MBI600 foi superior em relação às plantas apenas inoculadas em 43.30 e 35.95 %, respectivamente. As plantas pulverizadas com tebuconazole e não inoculadas exibiram baixa atividade da POX durante todo o tempo de avaliação (Figura 10A).

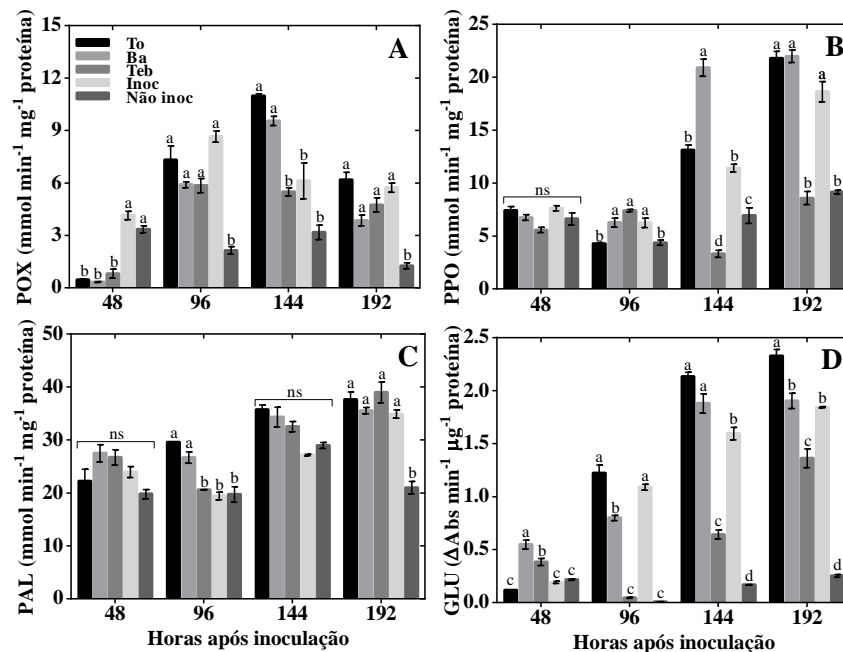


Figura 10. Atividade de enzimas de defesa em plantas de tomate tratadas com o óleo essencial (OE) de tomilho e o agente de controle biológico (ACB) *B. amyloliquefaciens* MBI600 após a inoculação com *Alternaria linariae*. (A) Peroxidase (POX), (B) Polifenol oxidase (PPO), (C) Fenilalanina amônio-liase e (D) β-1,3-glucanase (GLU). As barras representam atividade enzimática de plantas tratadas com o OE de tomilho (To), o ACB MBI600 (Ba), Tebuconazole (Teb), plantas inoculadas (Inoc) e plantas não inoculadas (Não inoc). Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0.05$). Valores representam a média de absorbância nos diferentes tempos de coleta e as barras de desvio indicam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2022).

O OE de tomilho e o ACB MBI600 não promoveram o aumento da atividade da PPO nas primeiras 48 HAI, enquanto às 96 HAI as plantas tratadas com o ACB MBI600, tebuconazole e apenas inoculadas foram superiores ao OE de tomilho em 42.30, 25.05 e 24.80 %, respectivamente. Às 144 HAI, o ACB MBI600 promoveu um aumento significativo da atividade PPO, sendo superior em 37.15 e 43.33 % em relação aos tratamentos com OE de tomilho e plantas apenas inoculadas, respectivamente. Por outro lado, no final do período de

avaliação (192 HAI) não houveram diferenças estatísticas entre tratamentos com a aplicação de OE de tomilho, o ACB MBI600 e plantas apenas inoculadas. Entretanto, a atividade enzimática da PPO nas plantas tratadas com tebuconazole e plantas não inoculadas foram significativamente inferiores em 60.90 e 58.39 %, respectivamente, em relação ao tratamento com o ACB MBI600 (Figura 10B).

O comportamento da atividade enzimática da fenilalanina amônio-liase (PAL) teve um aumento constante ao longo do tempo, mas nem sempre apresentou diferenças estatísticas nos diferentes tempos de avaliação. Às 48 HAI não houve diferenças entre os tratamentos, no entanto, às 96 HAI o OE de tomilho e o ACB MBI600 melhoraram a atividade da PAL e foram superiores em relação às plantas apenas inoculadas em 30.30 e 27.28 %, respectivamente. Entretanto, não houve diferenças estatísticas às 144 HAI. Às 192 HAI os tratamentos com OE de tomilho, ACB MBI600, tebuconazole e plantas apenas inoculadas não apresentaram diferenças estatísticas entre si, mas foram superiores às plantas não inoculadas em 47.98, 45.97, 43.02 e 41.87 %, respectivamente (Figura 10C).

As plantas tratadas com o ACB MBI600 apresentaram um aumento de 65.20 % na atividade da β -1,3-glucanase (GLU) em relação às plantas apenas inoculadas às 48 HAI. Às 96 HAI, a GLU exibiu a maior atividade em plantas tratadas com o OE de tomilho, mas sem apresentar diferenças estatísticas em relação às plantas apenas inoculadas. Entretanto, às 144 HAI, a atividade da GLU nas plantas tratadas com OE de tomilho e ACB MBI600 foram superiores às plantas apenas inoculadas em 25.16 e 15.21 %, respectivamente. O OE de tomilho induziu a máxima atividade da GLU às 192 HAI, sendo superior ao tratamento com o ACB MBI600 e plantas apenas inoculadas em 18.45 e 20.69 %, respectivamente. A atividade de GLU foi menor no tratamento com tebuconazole e plantas não inoculadas durante a maior parte do tempo de avaliação do experimento (Figura 10D).

4.5. Histoquímica de tecidos foliares infectados ou não infectados por *Alternaria linariae*

A aplicação do ACB MBI600 e o OE de tomilho em plantas de tomate afetadas pela PP induziram maior acumulação de compostos fenólicos. O acúmulo desses compostos de defesa começou a se expressar às 48 HAI (24 horas após o tratamento) e se manteve até as 192 HAI (Figura 11), enquanto que as plantas apenas inoculadas e não inoculadas (controles) apresentaram baixa presença de fenóis. Por outro lado, as plantas tratadas o ACB MBI600 e o OE de tomilho apresentaram maior preservação dos tecidos infectados comparado com plantas apenas inoculadas, as quais exibiram alta destruição dos tecidos infectados (Figura 11).

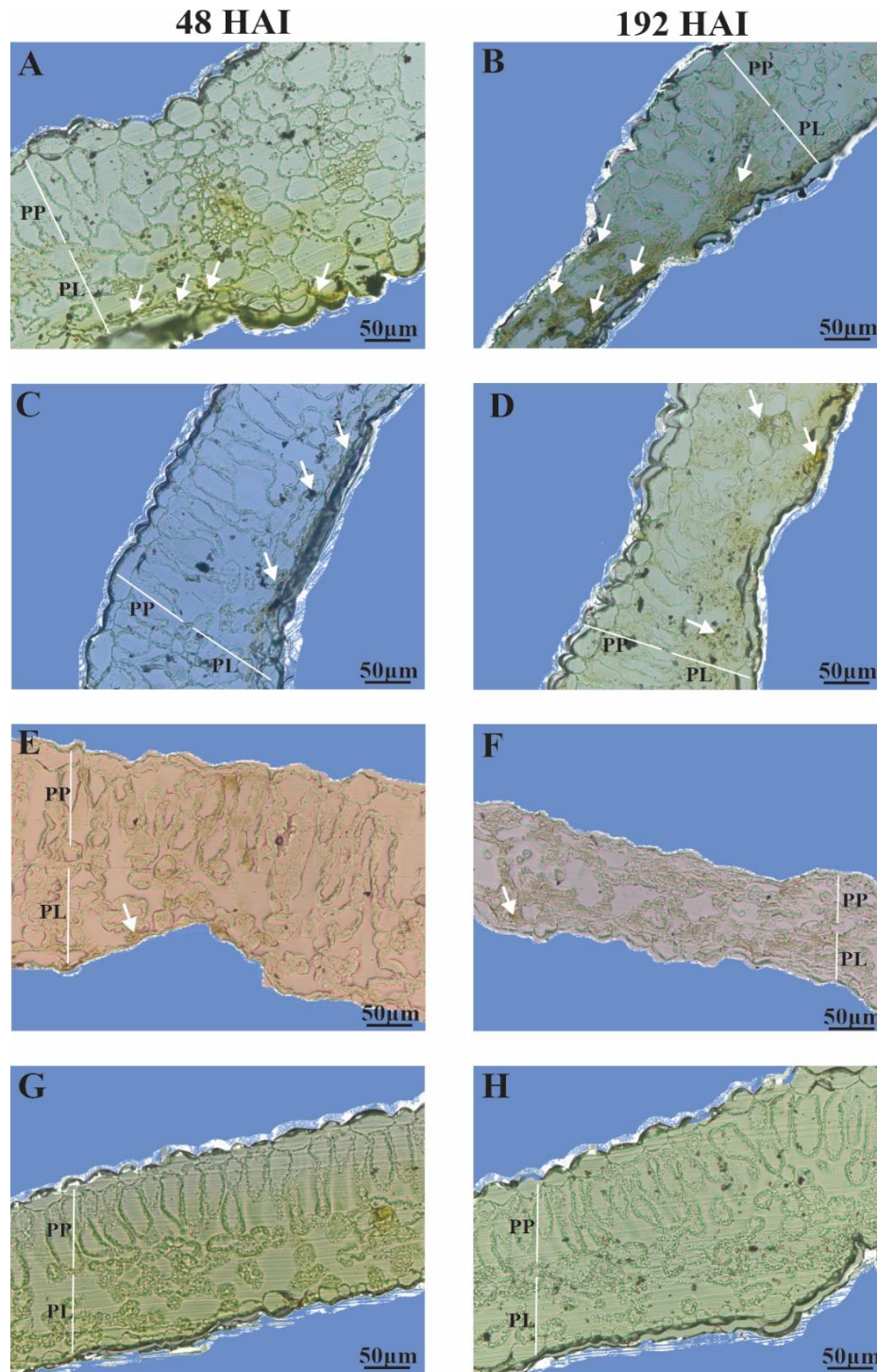


Figura 11. Fotomicrografias mostrando o acúmulo de compostos fenólicos em tecidos foliares de plantas de tomate infectadas com *Alternaria linariae* (48 e 192 horas após a inoculação (HAI)), e tratadas com o óleo essencial (OE) de tomilho e o agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. Micrografias de secções foliares transversais (8 µm de largura) previamente emblocados em historesina. Tratamentos: **A-B**, ACB MBI600; **C-D**, OE de tomilho; **E-F**, plantas apenas inoculadas; **G-H**, plantas não inoculadas. Setas indicam a acumulação de compostos fenólicos (coloração entre café e amarelo escuro) depois da coloração com cloreto férrico. PP e PL indicam os tecidos do parênquima paliádico e lacunoso, respectivamente.

Fonte: Do autor (2022).

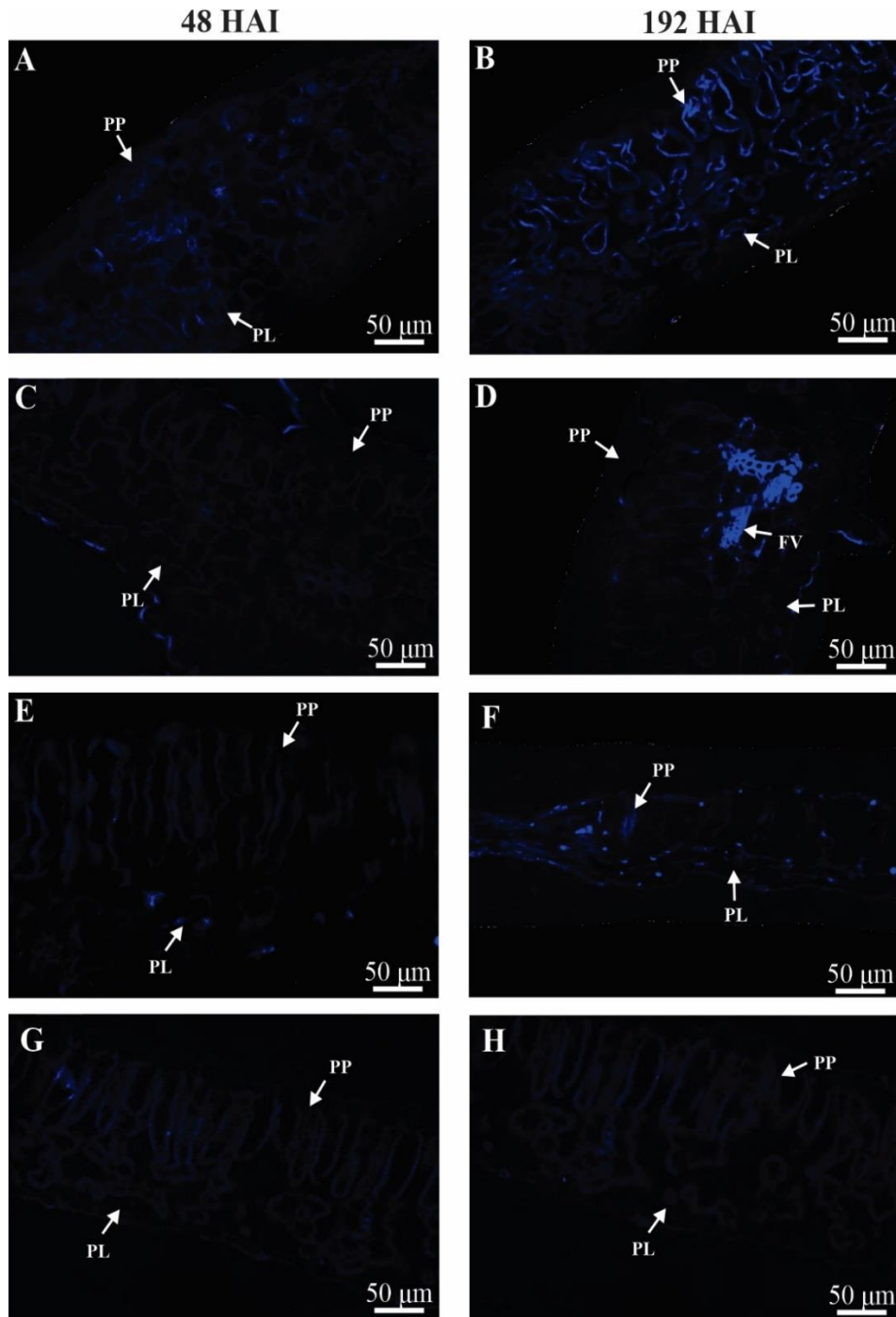


Figura 12. Imagens de epifluorescência mostrando a deposição de calose em tecidos foliares de plantas de tomate infectadas com *Alternaria linariae* (48 e 192 horas após a inoculação (HAI)), e tratadas com o óleo essencial (OE) de tomilho e o agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. Micrografias de epi-fluorescência de seções foliares transversais (8 µm largura) previamente emblocados em historesina. Tratamentos: **A-B**, ACB MBI600; **C-D**, OE de tomilho; **E-F**, plantas apenas inoculadas; **G-H**, plantas não inoculadas. Regiões de tecido foliar com alta intensidade de fluorescência indicam maior acúmulo de calose depois da coloração com azul de anilina (0.005 %) e sob observação no filtro azul: Zeiss 49 (excitação = 365 nm; emissão 445/50 (420-470 nm)). PP e PL indicam os tecidos do parênquima paliçádico e lacunoso, respectivamente. FV, feixe vascular.

Fonte: Do autor (2022).

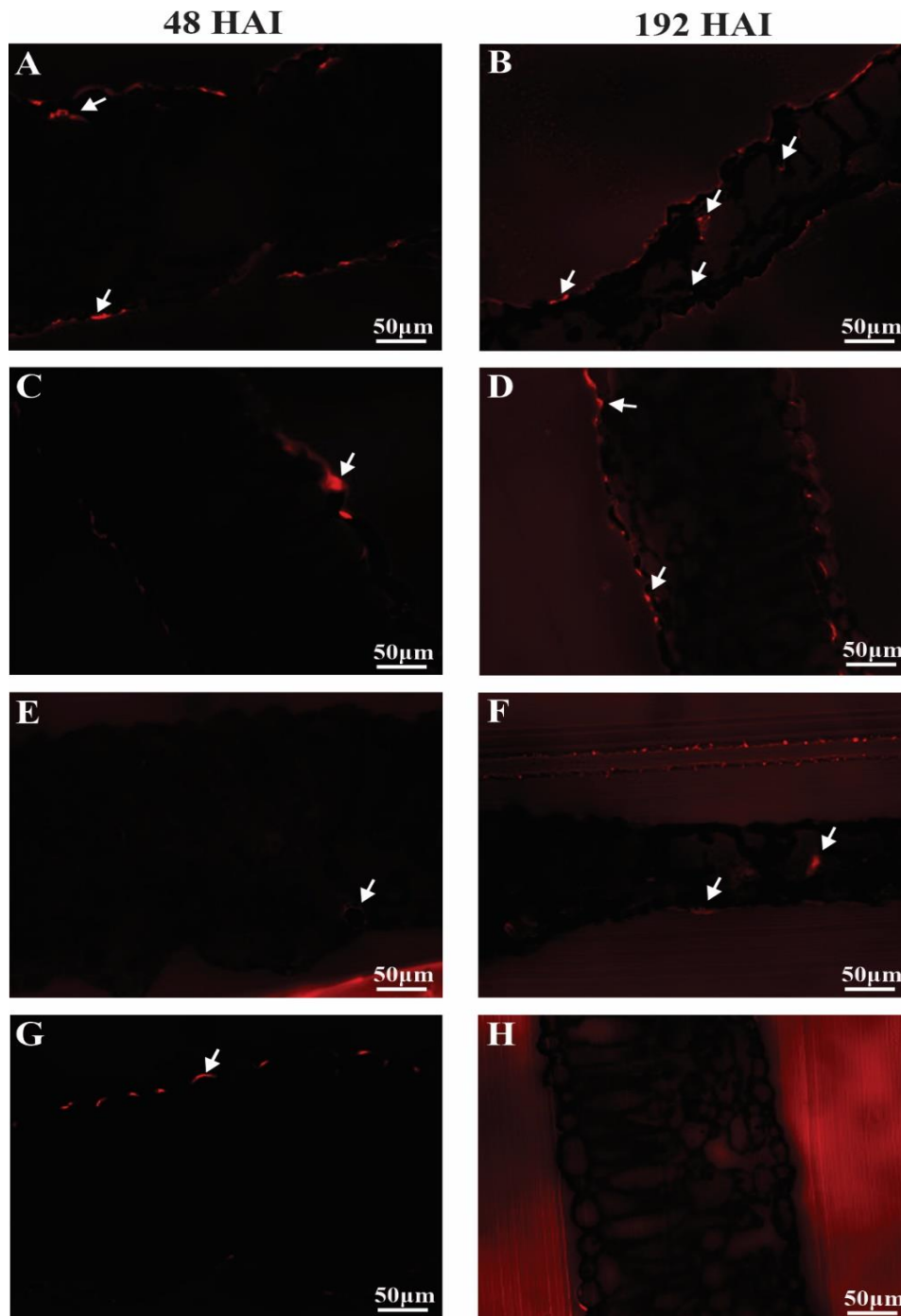


Figura 13. Imagens de epifluorescência do acúmulo de lignina em tecidos foliares de plantas de tomate infectadas com *Alternaria linariae* (48 e 192 horas após a inoculação (HAI)), tratadas com o óleo essencial (OE) de tomilho e o agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. Micrografias de epi-fluorescência de secções foliares transversais (8 μ m largura) previamente emblocados em historesina. Tratamentos: **A-B**, ACB MBI600; **C-D**, OE de tomilho; **E-F**, plantas apenas inoculadas; **G-H**, plantas não inoculadas. Regiões de tecido foliar com alta intensidade de fluorescência indicam maior acúmulo de lignina depois da coloração com fucsina básica e sob observação no filtro vermelho: Zeiss 45 (excitação = 560/40 (540-580 nm); emissão 630/75 (592,5-667,5 nm).

Fonte: Do autor (2022).

O acúmulo de calose foi observado com maior intensidade (fluorescência) em plantas tratadas com o ACB MBI600 a partir das 48 HAI, enquanto as plantas sob tratamento de OE de tomilho e controles apresentaram acúmulo de calose em níveis extremamente baixos (Figura 12). Essa deposição de calose foi ainda maior às 192 HAI em plantas tratadas com o ACB MBI600, e especialmente mais abundante nas células do parênquima paliçádico. O tratamento com OE de tomilho também induziu alta presença de calose às 192 HAI e foi superior às plantas apenas inoculadas. Entretanto, as plantas não inoculadas, não exibiram acúmulo desse composto associado à defesa das plantas contra fitopatógenos.

A presença de lignina foi induzida pela aplicação do ACB MBI600 e do OE de tomilho, e observada a partir das 48 HAI, enquanto quase não foi expressa em plantas apenas inoculadas. A maior fluorescência nos tecidos pela presença de lignina foi notada às 192 HAI, sendo o tratamento com o ACB MBI600 que mostrou maior fluorescência nos tecidos, produto do acúmulo deste composto fenólico (Figura 13). Essa resposta foi superior às plantas tratadas com o OE de tomilho. Nas plantas apenas inoculadas, o acúmulo de lignina foi muito reduzido, e pelo contrário, nos tecidos foliares de plantas não inoculadas não houve detecção de lignina às 192 HAI.

5. DISCUSSÃO

Os óleos essenciais (OEs) e agentes de controle biológico (ACBs) têm sido propostos como ferramentas alternativas e eco-amigáveis no controle de fitopatógenos (ELANCHEZHIAN et al., 2018; MILJAKOVIĆ; MARINKOVIĆ; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, 2020; RAVEAU; FONTAINE; LOUNÈS-HADJ, 2020). Os diferentes componentes químicos dos OEs apresentam múltiplos mecanismos de ação, alterando vários processos biológicos dos fungos (BASAK; GUHA, 2018). Enquanto ACBs como *Bacillus amyloliquefacienes*, diversos mecanismos como indução de resistência e promoção do crescimento, incrementam a tolerância ao estresse biótico e contribuem de maneira eficiente ao controle de doenças de plantas (RADHAKRISHNAN; HASHEM; ABD-ALLAH, 2017; KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019). Por tanto, essas formas de controle, tornam-se práticas confiáveis, de amplo espectro e sustentável no manejo de doenças (SHAFI; TIAN; JI, 2017; ARRAIZA et al., 2018; GOWTHAM et al., 2018).

Neste estudo, os OEs de tomilho e capim-limão reduziram eficientemente o crescimento micelial de *Alternaria linariae* sob condições *in vitro*. A eficácia de controle de fitopatógenos do OE de tomilho e capim-limão tem sido associado ao efeito dos seus principais componentes; o timol (KOWALCZYK et al., 2020) e citral (mistura de genieral e neral), respectivamente (LÓPEZ-MENESES et al., 2017), constituindo compostos de alta atividade antifúngica (SELLAMUTHU et al., 2013; MOHAMMAD; EL-NAHAS; EDRIS, 2019) .

O OE de tomilho foi relatado por inibir o crescimento micelial de *A. solani* por acima de 80 %, em condições *in vitro* (RAGUPATHI et al., 2020), enquanto porcentagens inibição absoluta (100 %) foram encontradas neste estudo, quando as concentrações foram superiores a 2000 ppm, o que indica que a capacidade de controle é dependente das doses, o que esteve em concordância com os resultados de Hong et al. (2018), onde a inibição do crescimento micelial de *A. alternata* melhorou de acordo com o incremento das doses. No que se refere à porcentagem de germinação de conídios, baixos índices de germinação (< 8 %) foram observados, e não houve variações significativas de acordo com as concentrações avaliadas. Isto foi semelhante ao relatado por Hong et al. (2018), cujas porcentagens de germinação conídios foram mínimas (< 20 %) sob o efeito do OE de tomilho. O provável mecanismo de ação do OE de tomilho no crescimento fúngico, especificamente do timol, foi associado à alteração do metabolismo de ácidos graxos, incluindo o ergosterol da parede celular (KOWALCZYK et al., 2020). Além desses efeitos, existe um incremento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e do estresse oxidativo, o qual causa um decrescimento na matriz de

polímeros extracelulares (KOWALCZYK et al., 2020). Evidências adicionais, sugerem que, a elevada concentração de monoterpenos oxigenados (timol) e hidrocarbonetos monoterpênicos (p-cimeno) esteve relacionada à atividade antifúngica do OE de tomilho sobre fungos fitopatógenos (MOGHADDAM; MEHDIZADEH, 2020).

O OE de capim-limão inibiu na sua totalidade o crescimento micelial em concentrações por acima de 2000 ppm, enquanto a germinação foi também controlada de maneira altamente eficiente, similar ao OE de tomilho. A alta inibição do crescimento micelial e germinação de conídios de *A. tenuissima* e *Fusarium verticillioides* já foram relatados para o OE de capim-limão em condições *in vitro* (LÓPEZ-MENESES et al., 2017). Por sua vez, o OE de capim-limão reduziu o crescimento micelial de *A. solani* até 84 % (SOWMYA et al., 2021), enquanto porcentagens de controle absoluto foram observadas em *A. alternata* (MOUMNI et al., 2021). Semelhantes níveis na redução do crescimento micelial foram vistos no controle de *Stagonoporsis cucurbitacearum*, agente causal do crestamento gomoso do caule do melão (DALCIN et al., 2017), isto mostra, não só a eficácia antifúngica do OE de capim-limão no controle de diferentes espécies de *Alternaria*, senão também de outros gêneros de fungos. O OE de capim-limão tem sido considerado um agente antifúngico multisítio, que exerce atividade biológica sobre diferentes estruturas celulares (MOHAMMAD; EL-NAHAS; EDRIS, 2019), com alteração da morfologia do micélio, incremento da permeabilidade da membrana celular (ZHOU; TAO; JIA, 2014) e decrescimento no conteúdo de lipídios e ergosterol (TAO; OUYANG; JIA, 2014).

Por outro lado, mesmo que o OE de melaleuca tenha sido relatado eficiente no controle de vários fitopatógenos, por exemplo, *Botrytis cinerea* (YU et al., 2015), neste estudo não foram observados importantes porcentagens de inibição do crescimento micelial, nem no controle da germinação de conídios em condições *in vitro*, pelo contrário, houve redução no controle com o aumento das concentrações testadas.

O ACB *B. amyloliquefaciens* MBI600 ofereceu altos porcentagens de inibição do crescimento micelial ($\geq 85\%$), e seu nível de controle não foi afetado pelas concentrações testadas, sendo em alguns casos superior aos tratamentos com OEs. A importante eficácia no controle deste ACB poderia estar associada à possível ação antimicrobial de lipopeptídeos cíclicos extracelulares, cuja ação antifúngica tem sido bem documentada (CHOWDHURY et al., 2015). Assim, as propriedades surfactantes e antimicrobiais do isolado SR1 de *B. amyloliquefaciens* foram relatadas por inibir o crescimento de *A. solani* sob condições *in vitro* (NANJUNDAN et al., 2019). Nessas mesmas condições, o crescimento de *A. alternata* foi

suprimido pelo efeito da atividade de enzimas hidrolíticas extracelulares de *B. amyloliquefaciens*, que causou a quebra, enrugamento e deformação das hifas do fungo (KAZEROONI et al., 2021). No nosso estudo, o ACB MBI600, não interrompeu a germinação dos conídios, no entanto, assim que ocorreu a germinação dos conídios, os tubos germinativos foram colonizados pelo ACB, sendo observado um vazamento do conteúdo celular (protoplasma), com a queda do crescimento do tubo germinativo. Esse mecanismo de *Bacillus* spp. foi associado a atividade de peptídeos cíclicos (iturinas), cujas caudas hidrofóbicas se inserem e interagem com as membranas celulares, formando poros, que induzem a degradação das células e suas organelas (ZHAO et al., 2013; SHAFI; TIAN; JI, 2017).

As aplicações foliares do OE de tomilho e o ACB MBI600 reduziram os sintomas e índice da doença da pinta preta (PP) do tomateiro. As plantas que receberam esses tratamentos mantiveram um estado de sanidade superior do que plantas tratadas apenas com água, as quais mostraram significativa destruição da área foliar. O OE de tomilho tem apresentado controle efetivo de patógenos em pós-colheita (BANANI et al., 2018; VILAPLANA; PAZMIÑO; VALENCIA-CHAMORRO, 2018), enquanto que em condições *in planta*, foi eficiente na redução da severidade do mofo cinzento (*B. cinerea*) e murcha do tomateiro causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (BEN-JABEUR et al., 2015), porém, não existem suficientes dados disponíveis no controle da PP, por tanto, este estudo seria um dos primeiros em mostrar o alto potencial no controle da PP. A análise ultraestrutural, demonstrou que a atividade antifúngica das substâncias fenólicas do OE de tomilho previne o crescimento e reduz a viabilidade fúngica, além de prevenir a penetração nos tecidos de frutos de tangerina por causar interferência na membrana e parede celular (PERINA et al., 2015).

Comumente, as rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR, por suas siglas em inglês) como *B. amyloliquefaciens*, são incorporadas ao solo via *drench* no controle de fitopatógenos associados ao solo, no entanto, com menos frequência são realizadas aplicações foliares para o controle de doenças da parte aérea da planta. Estudos prévios relataram que a aplicação de *B. amyloliquefaciens* ao solo, mostrou proteção significativa (71 %) contra a antracnose na cultura do pimentão (GOWTHAM et al., 2018), do mesmo modo, o mofo cinzento (*Botrytis pelargonii*) e mancha de alternaria (*A. alternata*) foram também suprimidos em plantas de pimentão tratadas com *B. amyloliquefaciens* (KAZEROONI et al., 2021). Entretanto, a aplicação foliar pré e pós-inoculação de filtrados de culturas de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* reduziram o tamanho e frequências das lesões causadas por várias espécies

Alternaria em plantas de *Impatiens walleriana* (planta modelo) em 68 % e 81 %, respectivamente, sugerindo-se uma atividade de controle tipo preventivo e curativo (ALI et al., 2016), isto demonstra que, as aplicações na parte aérea podem oferecer valores significativos na redução dos sintomas causadas por *Alternaria* spp, assim como foi observado neste estudo, no qual, o índice da doença da PP foi reduzida até 54 %. De tal modo, as aplicações foliares, poderiam ter vantagens práticas como: facilitar o processo e diminuir o tempo de aplicação de produtos com base de *Bacillus* spp., com resultados altamente satisfatórios.

O tratamento com o OE de tomilho não forneceu um incremento significativo no desenvolvimento vegetativo das plantas quando comparado com o ACB MBI600. Este último propiciou importantes efeitos na promoção do crescimento (altura de planta, peso úmido e seco de planta) e sobre todo, incremento da produtividade, sem apresentar diferenças com o tebuconazole. Isto indica que, as aplicações foliares do ACB MBI600, além de melhorar a sanidade das plantas infectadas com a PP, poderiam contribuir para a melhoria no desempenho da cultura em condições de estresse biótico. Estudos prévios demonstraram que a inoculação com *B. amyloliquefaciens* incrementou o crescimento e sanidade das plantas afetadas por *A. alternata* e *B. pelargonii* no pimentão (KAZEROONI et al., 2021). O aumento da biomassa e atributos de crescimento também melhoraram significativamente em plantas de tomateiro inoculadas com *B. amyloliquefaciens* RWL-1 sob a infecção de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SHAHZAD et al., 2017). Essa promoção do crescimento e redução da murcha do tomateiro causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foram também observadas por Maung et al. (2017) em plantas tratadas com *B. amyloliquefaciens* YI. O efeito na promoção do crescimento tem sido associado à produção de ácido indolacético (AIA) por vários isolados de *B. amyloliquefaciens* (IDRIS et al., 2007; JI et al., 2021). Este hormônio está envolvido na alongação, divisão e diferenciação celular, estimulando o desenvolvimento geral da planta (BUNSANGIAM et al., 2021). A produção de giberelinas e ácidos orgânicos por *B. amyloliquefaciens* RWL-1 forneceu também uma melhora no crescimento e indução de resistência ao estresse biótico e abiótico (SHAHZAD et al., 2016). Por outro lado, a estimulação das métricas de crescimento observadas em plantas de pimentão inoculadas com *B. amyloliquefaciens* esteve associada à melhora na absorção de nutrientes (KAZEROONI et al., 2021). O anteriormente exposto, permite inferir que, a ampla gama de metabólitos secundários, hormônios de crescimento e compostos orgânicos produzidos por *Bacillus* spp. poderiam explicar que, a possível produção de algum desses compostos pelo ACB MBI600,

estimulou o crescimento vegetal nas plantas de tomate avaliadas no nosso estudo. Por outro lado, embora *Bacillus* spp. tenha mostrado efeitos altamente importantes na promoção do crescimento e controle de várias doenças em plantas, poucos trabalhos chegaram a avaliar o efeito sobre a produtividade do tomateiro infectado pela PP. Por tanto, os resultados apresentados neste estudo indicam que a aplicação do ACB MBI600 incrementa a produtividade do tomateiro. Isto corrobora com os resultados obtidos por Elanchezhyan et al. (2018), onde foi observado que a aplicação via *drench* + pulverização foliar de *B. amyloliquefaciens* FZB24 incrementaram a produtividade no tomateiro quando infectado com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, com resultados semelhante à testemunha química. A consistência desses dados suporta o alto potencial na promoção da produtividade que o isolado MBI600 ofereceu no presente estudo, apontando ser considerado um forte complemento e/ou equivalente do controle químico no manejo da PP do tomateiro, além de poder ser uma ferramenta conveniente na prevenção do desenvolvimento de resistência à fungicidas por populações de *Alternaria* spp. consideradas agentes etiológicos da PP.

A indução de resistência sistêmica induzida (ISR, por suas siglas em inglês) é um mecanismo de resistência ativa dependente de barreiras físico-químicas elicitadas por agentes de origem biótica ou abiótica (ELANCHEZHIAN et al., 2018). Assim, a ISR tem sido elicitada pela aplicação de diferentes indutores (elicitors) de origem biológica, incluindo PGPR e em menor número de relatos, OEs de plantas (CHOWDHURY et al., 2015; ARRAIZA et al., 2018). Dentre esses mecanismos que contribuem à melhora da defesa das plantas contra o ataque de fitopatógenos encontra-se o incremento da atividade de enzimas relacionadas à defesa (VANITHA; NIRANJANA; UMESHA, 2009). No presente estudo, a aplicação do ACB MBI600 e o OE de tomilho elicitaram o incremento da atividade da peroxidase (POX), polifenol oxidase (PPO) e β -1,3-glucanase (GLU), e em menor magnitude a fenilalanina amônia-liase (PAL). Vários isolados da PGPR *B. amyloliquefaciens* (p. ex: FBZ24, FZB42, YTB1407, SQRT3 e MBI600) elicitaram ISR através da ativação de enzimas e genes relacionados à defesa contra uma ampla gama de fitopatógenos (CHOWDHURY et al., 2015; LI et al., 2017; ELANCHEZHIAN et al., 2018; GOWTHAM et al., 2018; DIMOPOULOU et al., 2019; WANG et al., 2020). Entretanto, o OE de tomilho também foi relatado por desencadear esse efeito (BILL et al., 2014; BEN-JABEUR et al., 2015; BANANI et al., 2018).

Estudos prévios relataram que *B. amyloliquefaciens* FBZ24 induziu a atividade das enzimas POX, PPO e PAL, o qual foi associado ao controle da murcha do tomateiro causada

por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (ELANCHEZHIAN et al., 2018), enquanto plantas de pimentão inoculadas com *B. amyloliquefaciens* mostraram também um incremento da POX, PPO, PAL e GLU no controle da antracnose (*Colletotrichum truncatum*) (GOWTHAM et al., 2018). *B. subtilis* induziu a melhora dos níveis da PAL em plantas de tomateiro no controle da mancha bacteriana e podridão mole causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, respectivamente (CHANDRASEKARAN; CHUN, 2016; CHANDRASEKARAN et al., 2017). Por sua vez, a aplicação do OE de tomilho induziu o incremento da atividade da POX no tomateiro, o que esteve relacionado à redução da severidade da doença do mofo cinzento (*B. cinerea*) e murcha do tomateiro (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) (BEN-JABEUR et al., 2015). Similarmente, o tratamento OE de tomilho e cobertura de quitosana aumentou a expressão da POX, PAL, GLU e quitinase no controle da antracnose em abacate (*Persea americana*) (BILL et al., 2014). Em pós-colheita, o OE de tomilho desencadeou a resposta de defesa em frutos de maçã (*Malus domestica*), ativando o sistema enzimático de defesa e incrementando os níveis transcricionais de mRNA do gene *PR-8* (que codifica a quitinase), com contribuição na redução do mofo cinzento causado por *B. cinerea* (BANANI et al., 2018).

Além dos efeitos na ativação de enzimas relacionadas à defesa, *B. amyloliquefaciens* foi relatado por elicitar a expressão de genes (*PR-1a*, *LOX*, *ERF1*, *PDF1.2*) ativados pelas vias de sinalização dependentes do ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico/etileno (AJ/ET) (WU et al., 2018; WANG et al., 2020). Essas vias de sinalização foram em alguns casos relatadas como antagonistas (VAN WEES; VAN DER ENT; PIETERSE, 2008; WANG et al., 2020), embora também haja relatos onde, ambas as vias de sinalização (SA e JA/ET), agem em sinergismo (NIU et al., 2011; DIMOPOULOU et al., 2019).

No nosso estudo, a alta atividade da POX em plantas tratadas com o ACB MBI600 e o OE de tomilho poderia ter controlado e mantido os níveis de ROS em concentrações relativamente menos tóxicas nas plantas infectadas por *A. linariae*. O excesso de H₂O₂ pode levar a um incremento da atividade da POX (CHANDRASEKARAN; CHUN, 2016), a mesma que pode atuar como co-substrato na oxidação de compostos fenólicos enquanto consome H₂O₂ (FRANCOZ et al., 2015; SHIGETO; TSUTSUMI, 2016). Por sua vez, a PPO comumente interage com a POX para promover a limpeza de ROS (HASANUZZAMAN et al., 2020). No nosso estudo, ambas enzimas tiveram um comportamento muito semelhante ao longo do tempo, o que aponta o possível sinergismo entre essas duas enzimas. A PPO é também importante na oxidação de compostos fenólicos, formando quinonas, as quais podem

reticular ou alquilar proteínas (CONSTABEL; BARBEHENN, 2008). Esse complexo proteína-*o*-quinona, reduz o valor nutricional celular, diminuindo a velocidade de avanço dos patógenos nos tecidos (BOECKX et al., 2015).

No nosso estudo, embora a atividade da PAL não tenha sido significativa em alguns dos tempos de avaliação, sua atividade incrementou ao longo tempo e foi frequentemente superior em tratamentos com o OE de tomilho e o ACB MBI600. Essa melhora na atividade da PAL, pode ter elicitado a síntese do AS, e assim, à indução de resistência sistêmica (WU et al., 2019). A PAL, através da desaminação da fenilalanina produz a formação de ácido *trans*-cinâmico, precursor da biossíntese de AS (DZHAVAKHIYA; OZERETSKOVSKAYA; ZINOVYEVA, 2007), ademais, é uma enzima responsável pela ativação da via dos fenilpropanoides, importante na síntese de fenóis (KONG, 2015).

Nossos resultados também indicam que o OE de tomilho e o ACB MBI600 induziram uma alta atividade da GLU ao longo do tempo quando foram aplicados a plantas de tomate infectadas por *A. linariae*. A atividade hidrolítica da GLU desempenha um papel importante na degradação das ligações β -1,3/1,6-glucano das paredes de fungos parasitas de plantas, inibindo seu crescimento e liberando grandes quantidades de elicitores, os quais induzem a sínteses de fitoalexinas e compostos fenólicos (BALASUBRAMANIAN et al., 2012; FRANZENER et al., 2018). Tais fatos poderiam ter contribuído à melhora da resistência e o controle da PP em plantas de tomate infectadas por *A. linariae*.

Os tratamentos com base ao ACB MBI600 e o OE de tomilho induziram a acumulação de fenóis, calose e lignina. Esse efeito foi observado a partir das 48 horas após a inoculação (HAI), e mantido ao longo do tempo (até 192 HAI), sendo superior aos tratamentos controles. A indução da resistência por PGPR envolveu processos relacionados à melhora na deposição de calose e lignificação de tecidos, o que estimulou a formação de barreiras estruturais que pode ter limitado o desenvolvimento do patógeno nos locais da infecção (KLOEPPER; RYU; ZHANG, 2004; LU; ZHOU; CHEN, 2017; WU et al., 2019). Frequentemente, a deposição de calose e compostos fenólicos inicialmente ocorre abaixo dos sítios de formação do apressório fúngico (CHOWDHURY et al., 2015). No entanto, a deposição de calose pode ser observada em locais distais da área das epidermes foliar à medida que ocorre o avanço da colonização (SHETTY et al., 2009). Tal fato está em concordância ao nosso estudo, onde a deposição de calose, inicialmente foi observada nos tecidos próximos a epidermes, progredindo para as células do mesófilo e finalmente (192 HAI) encontrado espalhado em todo o tecido da seção transversal da lâmina foliar. O OE de tomilho incrementou o conteúdo de compostos

fenólicos em plantas de tomate infectadas pelo mofo cinzento (*B. cinerea*) e murcha do tomateiro (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) e isso foi associado ao incremento da produção de ROS, mediado pela atividade da POX (BEN-JABEUR et al., 2015). A acumulação de compostos fenólicos pelo efeito da aplicação de OEs teve um efeito significativo no incremento da atividade antioxidante em plantas de mirtilo (WANG; WANG; CHEN, 2008). Por tanto, nossos resultados indicam que o acúmulo de lignina e compostos fenóis nos tecidos foliares de tomate infectados com *A. linariae* e tratados com o ACB MBI600 e OE de tomilho provavelmente esteve relacionado com a alta atividade da POX e PPO (ELANCHEZHIAN et al., 2018).

Por fim, no nosso trabalho foi observado que o OE de tomilho e o ACB MBI600 mostraram alta atividade antifúngica e efeitos na indução de resistência, através da ativação de enzimas de defesa, assim como outras mudanças bioquímicas associadas ao acúmulo de compostos fenólicos, calose e lignina em plantas de tomate infectadas por *A. linariae*. Isso torna ao OE de tomilho e ao ACB MBI600 em produtos com efeitos múltiplos e altamente potenciais no controle da PP, com amplas expectativas que possam ser inseridos nos programas de rotação com fungicidas químicos, o que poderia contribuir grandemente na luta contra a resistência à fungicidas atualmente usados no controle da PP como são as estrobilurinas e boscalidas.

6. CONCLUSÕES

Os óleos essenciais (OEs) de tomilho, capim-limão e o agente de controle biológico (ACB) *Bacillus amyloliquefaciens* BMI600 reduziram substancialmente o crescimento micelial e a germinação de conídios de *A. linariae* sob condições *in vitro*.

A aplicação do ACB BMI600 e o OE de tomilho reduziram a severidade da pinta preta (PP) e ativaram o sistema enzimático de defesa em plantas de tomate infectadas com *A. linariae* sob condições de casa de vegetação.

O ACB BMI600 mostrou efeitos múltiplos quando aplicados a plantas infectadas com *A. linariae*, isto é: indução de resistência, promoção do crescimento e produtividade, tornando-se um produto altamente potencial no controle da PP do tomateiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABULEY, I. K.; NIELSEN, B. J. Evaluation of models to control potato early blight (*Alternaria solani*) in Denmark. **Crop Protection**, v. 102, p. 118–128, 2017. doi: 10.1016/j.cropro.2017.08.012.
- ADHIKARI, P.; OH, Y.; PANTHEE, D. R. Current Status of Early Blight Resistance in Tomato : An Update. **International Journal of Molecular Science**, v. 18, p. 1–22, 2017. doi: 10.3390/ijms18102019.
- AGAMY, R.; ALAMRI, S.; MOUSTAFA, M. F. M.; HASHEM, M. Management of tomato leaf spot caused by *Alternaria tenuissima* wiltshire using salicylic acid and agrileen. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 15, n. 2, p. 266–272, 2013.
- AGRILLO, B.; MIRINO, S.; TATÈ, R.; GRATINO, L.; GOGLIETTINO, M.; COCCA, E.; TABLI, N.; NABTI, E.; PALMIERI, G. An alternative biocontrol agent of soil-borne phytopathogens: A new antifungal compound produced by a plant growth promoting bacterium isolated from North Algeria. **Microbiological Research**, v. 221, n. November 2018, p. 60–69, 2019. doi: 10.1016/j.micres.2019.02.004.
- AGRIOS, G. N. Plant Pathology. In: **Plant Pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 922. 2005.
- AKLADIOUS, S. A.; ISAAC, G. S.; ABU-TAHON, M. A. Induction and resistance against Fusarium wilt disease of tomato by using sweet basil (*Ocimum basilicum* L) extract. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 95, n. 4, p. 689–701, 2015. doi: 10.4141/cjps-2014-127.
- ALI, A.; WEE PHENG, T.; MUSTAFA, M. A. Application of lemongrass oil in vapour phase for the effective control of anthracnose of “Sekaki” papaya. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 6, p. 1456–1464, 2015. doi: 10.1111/jam.12782.
- ALI, G. S.; EL-SAYED, A. S. A.; PATEL, J. S.; GREEN, K. B.; ALI, M.; BRENNAN, M.; NORMAN, D. *Ex vivo* application of secreted metabolites produced by soil-inhabiting *Bacillus* spp. efficiently controls foliar diseases caused by *Alternaria* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 478–490, 2016. doi: 10.1128/AEM.02662-15.
- ALVES, F. Controle de doenças de hortaliças - convencional vs. alternativo. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 87–90, 2007.
- ARMITAGE, A. D.; COCKERTON, H. M.; SREENIVASAPRASAD, S.; WOODHALL, J.; LANE, C. R.; HARRISON, R. J.; CLARKSON, J. P. Genomics Evolutionary History and Diagnostics of the *Alternaria alternata* Species Group Including Apple and Asian Pear Pathotypes. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. January, p. 1–17, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2019.03124.
- ARRAIZA, M. P.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; ANDRES, M. F.; BERROCAL-LOBO, M.; DOMÍNGUEZ-NÚÑEZ, J. A.; JR, A. C. D. C.; NAVARRO-ROCHA, J.; CALDERÓN-GUERRERO, C. Antifungal Effect of Essential Oils. In: EL-SHEMY, H. (Ed.). **Potential of Essential Oils**. [s.l.] IntechOpen, 2018. p. 145–164. 2018.

AVENOT, H. F.; SOLORIO, C.; MORGAN, D. P.; MICHAILEDIS, T. J. Sensitivity and cross-resistance patterns to demethylation-inhibiting fungicides in California populations of *Alternaria alternata* pathogenic on pistachio. **Crop Protection**, v. 88, p. 72–78, 2016. doi: 10.1016/j.cropro.2016.05.012.

BALASUBRAMANIAN, V.; VASHISHT, D.; CLETUS, J.; SAKTHIVEL, N. Plant β -1,3-glucanases: Their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 11, p. 1983–1990, 2012. doi: 10.1007/s10529-012-1012-6.

BANANI, H.; OLIVIERI, L.; SANTORO, K.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L.; SPADARO, D. Thyme and savory essential oil efficacy and induction of resistance against *Botrytis cinerea* through priming of defense responses in apple. **Foods**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2018. doi: 10.3390/foods7020011.

BASAK, S.; GUHA, P. A review on antifungal activity and mode of action of essential oils and their delivery as nano-sized oil droplets in food system. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 12, p. 4701–4710, 2018. doi: 10.1007/s13197-018-3394-5.

BASKAR, V.; VENKATESH, R.; RAMALINGAM, S. Flavonoids (Antioxidants Systems) in Higher Plants and Their Response to Stresses. In: GUPTA, D. K.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. (Ed.). **Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants**. [s.l.: s.n.] p. 253–268. 2018.

BEN-JABEUR, MAISSASOMAI-JEMMALI, L.; HAMADA, W. Thyme essential oil as multiple mechanisms-biofungicide causing sensitivity of *Mycosphaerella graminicola*. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2017. doi: 10.1111/ijlh.12426.

BEN-JABEUR, M.; GHABRI, E.; MYRIAM, M.; HAMADA, W. Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and Fusarium wilt. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 94, p. 35–40, 2015. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.05.006.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; QUADT-HALLMAN, A.; TUZUN, S. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology**, v. 112, n. 3, p. 919–929, 1996. doi: 10.1104/pp.112.3.919.

BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, v. 91, n. 6, p. 964–977, 1999. doi: 10.1080/00275514.1999.12061106.

BESSADAT, N.; BERRUYER, R.; HAMON, B.; BATAILLE-SIMONEAU, N.; BENICHOUS, S.; KIHAL, M.; HENNI, D. E.; SIMONEAU, P. *Alternaria* species associated with early blight epidemics on tomato and other Solanaceae crops in northwestern Algeria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 148, n. 1, p. 181–197, 2017. doi: 10.1007/s10658-016-1081-9.

- BETTIOL, W. CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS. In: Anais do III Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais (III COBRADAN) CO, **Anais...**2006.
- BILL, M.; SIVAKUMAR, D.; KORSTEN, L.; THOMPSON, A. K. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. **Crop Protection**, v. 64, p. 159–167, 2014. doi: 10.1016/j.cropro.2014.06.015.
- BOECKX, T.; WINTERS, A. L.; WEBB, K. J.; KINGSTON-SMITH, A. H. Polyphenol oxidase in leaves: Is there any significance to the chloroplastic localization? **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 12, p. 3571–3579, 2015. doi: 10.1093/jxb/erv141.
- BORUGĂ, O.; JIANU, C.; MIȘCĂ, C.; GOLEȚ, I.; GRUIA, A. T.; HORHAT, F. G. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. **Journal of medicine and life**, v. 7, n. 3, p. 56–60, 2014.
- BUCHBAUER, G.; ERKIC, M. Antioxidative Properties of Essential Oils and Single Fragrance Compounds. In: BAS, ER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils**. 2da. ed. Boca Ratón, EUA: Taylor & Francis Group, 2016. p. 323–340. 2016.
- BUNSANGIAM, S.; THONGPAE, N.; LIMTONG, S.; SRISUK, N. Large scale production of indole-3-acetic acid and evaluation of the inhibitory effect of indole-3-acetic acid on weed growth. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-92305-w.
- BUTTNER, C.; MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C.; O'MAHONY, J.; COFFEY, A. Bacteriophages and bacterial plant diseases. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 34, p. 1–15, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00034.
- CALVO, H.; MARCO, P.; BLANCO, D.; ORIA, R.; VENTURINI, M. E. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, v. 63, p. 101–110, 2016. doi: 10.1016/j.fm.2016.11.004.
- CAMPBELL, C.; MADDEN, L. **Introduction to plant disease epidemiology**. 1 ed. ed. Nueva York: John Wiley & Sons., 1990.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 2006. doi: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006.
- CASTELLANI, A. A maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181–184, 1967.
- CAWOY, H.; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. Bacillus based biological control. In: STOYTICHEVA, M. (Ed.). **Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management**. London, UK: IntechOpen, 2011. p. 273–302. 2011.

- CHAERANI, R.; VOORRIPS, R. E. Tomato early blight (*Alternaria solani*): The pathogen, genetics, and breeding for resistance. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 6, p. 335–347, 2006. doi: 10.1007/s10327-006-0299-3.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764–775, 1955.
- CHANDRASEKARAN, M.; BELACHEW, S. T.; YOON, E.; CHUN, S. C. Expression of β -1,3-glucanase (GLU) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) genes and their enzymes in tomato plants induced after treatment with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 83, n. 1, p. 7–13, 2017. doi: 10.1007/s10327-016-0692-5.
- CHANDRASEKARAN, M.; CHUN, S. C. Expression of PR-protein genes and induction of defense-related enzymes by *Bacillus subtilis* CBR05 in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants challenged with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 11, p. 2277–2283, 2016. doi: 10.1080/09168451.2016.1206811.
- CHAVAN, V. A.; YUMLEMBAM, R. A.; SEWAKRAM, K. Fungicide resistance in *Alternaria* leaf blight pathogen in tomato crop grown in Satara District. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 6, p. 1736–1739, 2017.
- CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; EISENREICH, A.; SCHNEIDER, K.; HEINEMEYER, I.; MORGENSTERN, B.; VOSS, B.; HESS, W. R.; REVA, O.; JUNGE, H.; VOIGT, B.; JUNGBLUT, P. R.; VATER, J.; SÜSSMUTH, R.; LIESEGANG, H.; STRITTMATTER, A.; GOTTSCHALK, G.; BORRISS, R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1007–1014, 2007. doi: 10.1038/nbt1325.
- CHOWDHURY, S. P.; HARTMANN, A.; GAO, X. W.; BORRISS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–11, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00780.
- CHUNG, S.; KIM, S. D. Biological control of phytopathogenic fungi by *Bacillus amyloliquefaciens* 7079; suppression rates are better than popular chemical fungicides. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 1011–1021, 2005.
- CONSTABEL, C. P.; BARBEHENN, R. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. In: SCHALLER, A. (Ed.). **Induced Plant Resistance to Herbivory**. Stuttgart, Ge: Springer, 2008. p. 253–270. 2008.
- DALCIN, M.; ADALBERTO, C. C.-F.; RENATO, de A. S.; ILDON, R. do N.; TALITA, P. de S. F.; RAIMUNDO, W. de S. A.; GIL, R. dos S. Evaluation of essential oils for preventive or curative management of melon gummy stem blight and plant toxicity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 26, p. 426–432, 2017. doi: 10.5897/jmpr2017.6405.

DANG, H. X.; PRYOR, B.; PEEVER, T.; LAWRENCE, C. B. The *Alternaria* genomes database: A comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2015. doi: 10.1186/s12864-015-1430-7.

DIMOPOULOU, A.; THEOLOGIDIS, I.; LIEBMANN, B.; KALANTIDIS, K.; VASSILAKOS, N.; SKANDALIS, N. *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 differentially induces tomato defense signaling pathways depending on plant part and dose of application. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-55645-2.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 42, p. 185–209, 2004. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421.

DZHAVAKHIYA, V. G.; OZERETSKOVSKAYA, O. L.; ZINOVYEVA, S. V. Immune Response. In: DYAKOV, Y. T.; DZHAVAKHIYA, V. G.; KORPELA, T. (Ed.). **Comprehensive and Molecular Phytopathology**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 265–314. 2007.

EGGERT, D.; NAUMANN, M.; REIMER, R.; VOIGT, C. A. Nanoscale glucan polymer network causes pathogen resistance. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–6, 2014. doi: 10.1038/srep04159.

EL-SHORA, H. M. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. **Plant Science**, v. 162, n. 1, p. 1–7, 2002. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00471-X.

ELANCHEZHIAN, K.; KEERTHANA, U.; NAGENDRAN, K.; PRABHUKARTHIKEYAN, S. R.; PRABAKAR, K.; RAGUCHANDER, T.; KARTHIKEYAN, G. Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 103, p. 92–101, 2018. doi: 10.1016/j.pmpp.2018.05.008.

ELSAYED, Y.; SHABANA, Y. The effect of some essential oils on *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* infestation in archaeological oil paintings. **Mediterranean Archaeology and Archaeometry**, v. 18, n. 3, p. 71–87, 2018. doi: 10.5281/zenodo.1461616.

ESCRIVÁ, L.; OUESLATI, S.; FONT, G.; MANYES, L. Mycotoxins in food and feed: An overview. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 2017, p. 401–419, 2018. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21801-5.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, H. P.; BORRISS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–15, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00022.

FONSECA, R. S. A.; LEMES, N. M.; NEVES, P. R.; DECLOQUEMENT, J.; LEITE, M. do C.; SILVA, J. M.; JUNIOR, R. P. C.; LIMA, M. L. P. Caracterização e choque térmico para formação de zoósporos de espécies de *Albugo* spp. Rafaela. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 1–3, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAOSTAT**. 2020. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 9 março 2022.

FOOLAD, M. R.; MERK, H. L.; ASHRAFI, H. Genetics, genomics and breeding of late blight and early blight resistance in tomato. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, n. 2, p. 75–107, 2008. doi: 10.1080/07352680802147353.

FRANÇA, K. R. S.; SILVA, T. L.; CARDOSO, T. A. L.; UGULINO, A. L. N.; RODRIGUES, A. P. M.; JÚNIOR, A. F. D. M. *In vitro* Effect of Essential Oil of Peppermint (*Mentha x piperita* L.) on the Mycelial Growth of *Alternaria alternata*. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 26, n. 5, p. 1–7, 2018. doi: 10.9734/jeai/2018/44243.

FRANCOZ, E.; RANOCHA, P.; NGUYEN-KIM, H.; JAMET, E.; BURLAT, V.; DUNAND, C. Roles of cell wall peroxidases in plant development. **Phytochemistry**, v. 112, n. 1, p. 15–21, 2015. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.07.020.

FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MOURA, G. S.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Induction of defense enzymes and control of anthracnose in cucumber by *Corymbia citriodora* aqueous extract. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 10–16, 2018. doi: 10.1590/0100-5405/2218.

GADHI, M. A.; NIZAMANI, Z. A.; JATOI, G. H.; ABRO, M. A.; KEERIO, A. U.; POUSSIO, G. B.; QIU, D. *In-vitro* efficacy of bio-control agent and essential oils against leaf blight of chickpea caused by *Alternaria alternata*. **Acta Ecologica Sinica**, v. 40, n. 2, p. 166–171, 2020. doi: 10.1016/j.chnaes.2018.11.002.

GANJEWALAA, D.; LUTHRA, R. Essential Oil Biosynthesis and Regulation in the Genus *Cymbopogon*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 1, p. 163–172, 2010.

GATAHI, D. M. Challenges and Opportunities in Tomato Production Chain and Sustainable Standards Introduction. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 7, n. 3, p. 235–262, 2020. doi: 10.22059/ijhst.2020.300818.361.

GOWTHAM, H. G.; MURALI, M.; SINGH, S. B.; LAKSHMEESHA, T. R.; NARASIMHA MURTHY, K.; AMRUTHESH, K. N.; NIRANJANA, S. R. Plant growth promoting rhizobacteria- *Bacillus amyloliquefaciens* improves plant growth and induces resistance in chilli against anthracnose disease. **Biological Control**, v. 126, p. 209–217, 2018. doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.05.022.

GUPTA, P.; RAVI, I.; SHARMA, V. Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 2, p. 155–161, 2013. doi: 10.1080/17429145.2012.679705.

HAO, W.; ZHONG, G.; HU, M.; LUO, J.; WENG, Q.; RIZWAN-UL-HAQ, M. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 39–43, 2010. doi: 10.1016/j.postharvbio.2009.10.003.

- HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M. H. M. B.; ZULFIQAR, F.; RAZA, A.; MOHSIN, S. M.; AL MAHMUD, J.; FUJITA, M.; FOTOPOULOS, V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 1–52, 2020. doi: 10.3390/antiox9080681.
- HE, D. C.; ZHAN, J. S.; XIE, L. H. Problems, challenges and future of plant disease management: From an ecological point of view. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 4, p. 705–715, 2016. doi: 10.1016/S2095-3119(15)61300-4.
- HE, M. H.; WANG, Y. P.; JIAO WU, E.; SHEN, L. L.; YANG, L. N.; WANG, T.; SHANG, L. P.; ZHU, W.; ZHAN, J. Constraining Evolution of *Alternaria alternata* Resistance to a Demethylation Inhibitor (DMI) Fungicide Difenconazole. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JULY, p. 1–12, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.01609.
- HENDGES, C.; STANGARLIN, J. R.; DE HOLANDA NOZAKI, M.; LORENZETTI, E.; KUHN, O. J. Antifungal activity against *Alternaria solani* and control of early blight in tomato by essential oil of bergamot orange. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5, p. 1861–1874, 2020. doi: 10.5433/1679-0359.2020v41n5Sup11p1861.
- HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 439–445, 2012. doi: 10.1590/S1516-05722012000300003.
- HONG, J. K.; JO, Y. S.; RYOO, D. H.; JUNG, J. H.; KWON, H. J.; LEE, Y. H.; CHANG, S. W.; PARK, C.-J. *Alternaria* Spots in Tomato Leaves Differently Delayed by Four Plant Essential Oil Vapours. **Research in Plant Disease**, v. 24, n. 4, p. 292–301, 2018. doi: 10.5423/rpd.2018.24.4.292.
- HONG, S. G.; CRAMER, R. A.; LAWRENCE, C. B.; PRYOR, B. M. *Alt a1* allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: Analysis of phylogenetic content and secondary structure. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 2, p. 119–129, 2005. doi: 10.1016/j.fgb.2004.10.009.
- HOSSAIN, M. J.; RAN, C.; LIU, K.; RYU, C.-M.; RASMUSSEN-IVEY, C. R.; WILLIAMS, M. A.; HASSAN, M. K.; CHOI, S.-K.; JEONG, H.; NEWMAN, M.; KLOEPPER, J. W.; LILES, M. R. Deciphering the conserved genetic loci implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 631, p. 1–14, 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00631.
- IDRIS, E. S. E.; IGLESIAS, D. J.; TALON, M.; BORRIS, R. Tryptophan-dependent production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 619–626, 2007. doi: 10.1094/MPMI-20-6-0619.
- JI, C.; ZHANG, M.; KONG, Z.; CHEN, X.; WANG, X.; DING, W.; LAI, H.; GUO, Q. Genomic Analysis Reveals Potential Mechanisms Underlying Promotion of Tomato Plant Growth and Antagonism of Soilborne Pathogens by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, p. 1–13, 2021. doi: 10.1128/spectrum.01615-21.

JI, S. H.; PAUL, N. C.; DENG, J. X.; KIM, Y. S.; YUN, B. S.; YU, S. H. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. **Mycobiology**, v. 41, n. 4, p. 234–242, 2013. doi: 10.5941/MYCO.2013.41.4.234.

JING, C.; ZHAO, J.; HAN, X.; HUANG, R.; CAI, D.; ZHANG, C. Essential oil of *Syringa oblata* Lindl. as a potential biocontrol agent against tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Crop Protection**, v. 104, p. 41–46, 2018. doi: 10.1016/j.cropro.2017.10.002.

JOVANOVIĆ, S. V.; KUKAVICA, B.; VIDOVIĆ, M.; MENCKHOFF; FILIS MORINA; MENCKHOFF, L. Class III Peroxidases: Functions, Localization and Redox Regulation of Isoenzymes. In: GUPTA, D. K.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. (Ed.). **Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants**. Cham, Switzerland: Springer, 2018. p. 269–300. 2018.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 315–319, 1976. doi: 10.1104/pp.57.2.315.

KAZEROONI, E. A.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; AL-SADI, A. M.; KANG, S.-M.; YUN, B.-W.; LEE, I.-J. Biocontrol Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Botrytis pelargonii* and *Alternaria alternata* on *Capsicum annuum*. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 472, 2021. doi: 10.3390/jof7060472.

KGATLE, M. G.; FLETT, B.; TRUTER, M.; AVELING, T. A. S. Control of *Alternaria* leaf blight caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 132, n. June 2019, p. 105146, 2020. doi: 10.1016/j.cropro.2020.105146.

KIM, D. S.; HWANG, B. K. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 9, p. 2295–2306, 2014. doi: 10.1093/jxb/eru109.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1259–1266, 2004. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–19, 2019. doi: 10.3389/fpls.2019.00845.

KONG, J. Q. Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering. **RSC Advances**, v. 5, n. 77, p. 62587–62603, 2015. doi: 10.1039/c5ra08196c.

KOWALCZYK, A.; PRZYCHODNA, M.; SOPATA, S.; BODALSKA, A.; FECKA, I. Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 1–18, 2020. doi: 10.3390/molecules25184125.

- KUSTRZEBA-WÓJCICKA, I.; SIWAK, E.; TERLECKI, G.; WOLAŃCZYK-MĘDRALA, A.; MĘDRALA, W. *Alternaria alternata* and Its Allergens: a Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 47, n. 3, p. 354–365, 2014. doi: 10.1007/s12016-014-8447-6.
- LA TORRE, A.; CARADONIA, F.; MATERE, A.; BATTAGLIA, V. Using plant essential oils to control Fusarium wilt in tomato plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 3, p. 487–496, 2016. doi: 10.1007/s10658-015-0789-2.
- LAWRENCE, D. P.; GANNIBAL, P. B.; PEEVER, T. L.; PRYOR, B. M. The sections of *alternaria*: Formalizing species-group concepts. **Mycologia**, v. 105, n. 3, p. 530–546, 2013. doi: 10.3852/12-249.
- LAWRENCE, D. P.; ROTONDO, F.; GANNIBAL, P. B. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. **Mycological Progress**, v. 15, n. 1, p. 1–22, 2016. doi: 10.1007/s11557-015-1144-x.
- LEELASUPHAKUL, W.; SIVANUNSAKUL, P.; PHONGPAICHIT, S. Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 7, p. 990–997, 2006. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.08.030.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006.
- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 273–279, 1972. doi: 10.1016/0003-2697(72)90301-6.
- LI, C.; HU, W.; PAN, B.; LIU, Y.; YUAN, S.; DING, Y.; LI, R.; ZHENG, X.; SHEN, B.; SHEN, Q. Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* Strain SQRT3-Mediated Induced Systemic Resistance Controls Bacterial Wilt of Tomato. **Pedosphere**, v. 27, n. 6, p. 1135–1146, 2017. doi: 10.1016/S1002-0160(17)60406-5.
- LI, Y.; WANG, H.; ZHANG, Y.; MARTIN, C.; MARTIN, C. Can the world's favorite fruit, tomato, provide an effective biosynthetic chassis for high-value metabolites? **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 10, p. 1443–1450, 2018. doi: 10.1007/s00299-018-2283-8.
- LÓPEZ-MENESES, A. K.; SÁNCHEZ-MARINEZ, R. I.; QUINTANA-OBREGÓN, E. A.; PARRA-VERGARA, N. V.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; LÓPEZ-SAIZ, C. M.; CORTEZ-ROCHA, M. O. *In vitro* Antifungal Activity of Essential oils and Major Components against Fungi Plant Pathogens. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 4, p. 1–6, 2017. doi: 10.1111/jph.12554.
- LÓPEZ, A. M. Q.; LUCAS, J. A. Cytological aspects of compatible and incompatible interactions between cashew (*Anacardium occidentale*) seedlings and isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) complex. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 43, n. 2, p. 1–18, 2021. doi: 10.1590/0100-29452021701.

- LU, X.; ZHOU, D.; CHEN, X. Isolation and characterization of *Bacillus altitudinis* JSCX-1 as a new potential biocontrol agent against *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. p. 53–66, 2017. doi: 10.1007/s11104-017-3195-z.
- MAHMOUDI, E. Antifungal Effects of *Foeniculum vulgare* Mill . Herb Essential Oil on the Phenotypical Characterizations of *Alternaria alternata* Kessel . **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 2, p. 583–590, 2017. doi: 10.1080/0972060X.2017.1284024.
- MAJEWSKA, E.; KOZLOWSKA, M.; GRUCZYNSKA-SEKOWSKA, E.; KOWALSKA, D.; TARNOWSKA, K. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil: Extraction, composition, bioactivity and uses for food preservation - A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 69, n. 4, p. 327–341, 2019. doi: 10.31883/pjfns/113152.
- MAMGAIN, A.; ROYCHOWDHURY, R.; TAH, J. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. **Research Journal of Biology (RJB)**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2013.
- MARCHI, C. E.; BORGES, M. D. F.; MIZUBUTI, E. S. G. Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 345–352, 2006. doi: 10.1590/s0100-54052006000400005.
- MARQUES, J. P. R.; SOARES, M. K. M. **Manual de Técnicas Aplicadas à Histopatologia Vegetal**. Piracicaba, Br: FEALQ, 2021.
- MATIĆ, S.; GILARDI, G.; VARVERI, M.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Molecular diversity of *Alternaria* spp. From leafy vegetable crops, and their sensitivity to azoxystrobin and boscalid. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 58, n. 3, p. 519–533, 2019. doi: 10.14601/Phyto-10882.
- MAUNG, C. E. H.; GYU CHOI, T.; HAE NAM, H.; YONG KIM, K. Role of *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 in the control of Fusarium wilt disease and growth promotion of tomato. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 12, p. 1400–1415, 2017. doi: 10.1080/09583157.2017.1406064.
- MCKINNEY, H. . Influence of soil temperature and moisture on unfection of young wheat plants by *Ophiobolus graminis*. **Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 3, p. 827–840, 1923.
- MEENA, M.; GUPTA, S. K.; SWAPNIL, P.; ZEHRA, A.; DUBEY, M. K.; UPADHYAY, R. S. *Alternaria* toxins: Potential virulence factors and genes related to pathogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–14, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01451.
- MEENA, M.; SAMAL, S. *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. **Toxicology Reports**, v. 6, n. June, p. 745–758, 2019. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.06.021.
- MEENA, M.; ZEHRA, A.; DUBEY, M. K.; AAMIR, M.; GUPTA, V. K.; UPADHYAY, R. S. Comparative evaluation of biochemical changes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infected by *Alternaria alternata* and its toxic metabolites (TeA, AOH, and AME). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–14, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.01408.

- MEHDI, N. E. Analysis of virulence and genetic variability of *Alternaria alternata* associated with leaf spot disease in potato plants in Iran. **Acta Mycologica**, v. 53, n. 1, p. 1–9, 2018. doi: 10.5586/am.1105.
- MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16240–16265, 2014. doi: 10.3390/molecules191016240.
- MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The significance of *Bacillus* spp. In disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1–19, 2020. doi: 10.3390/microorganisms8071037.
- MOGHADDAM, M.; MEHDIZADEH, L. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil of *Thymus vulgaris* Grown in Iran against Some Plant Pathogenic Fungi. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 23, n. 5, p. 1072–1083, 2020. doi: 10.1080/0972060X.2020.1843547.
- MOHAMMAD, T. G. M.; EL-NAHAS, S. E. M.; EDRIS, A. E. Formulation and evaluation of solvent-free microemulsions of lemongrass oil and citral as natural antifungal agent against some phytopathogenic Fungi. **Plant Archives**, v. 19, p. 2097–2107, 2019.
- MOUMNI, M.; ROMANAZZI, G.; NAJAR, B.; PISTELLI, L.; AMARA, H. Ben; MEZRIOUI, K.; KAROUS, O.; CHAIEB, I.; ALLAGUI, M. B. Antifungal activity and chemical composition of seven essential oils to control the main seedborne fungi of cucurbits. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, p. 1–16, 2021. doi: 10.3390/antibiotics10020104.
- MUY-RANGEL, M. D.; OSUNA-VALLE, J. R.; GARCÍA-ESTRADA, R. S.; SAN MARTÍN-HERNÁNDEZ, C.; QUINTANA-OBREGÓN, E. A. Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de ajo (*Allium sativum* L.) contra *Alternaria tenuissima*. **Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology**, v. 36, n. 1, p. 162–171, 2017. doi: 10.18781/r.mex.fit.1708-3.
- NAGRALE, D. T.; SHARMA, L.; KUMAR, S.; GAWANDE, S. P. Recent Diagnostics and Detection Tools: Implications for Plant Pathogenic *Alternaria* and Their Disease Management. In: KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; TIWARI, A. K.; KAMLE, M. (Ed.). **Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices**. [s.l.: s.n.] p. 111–163. 2016.
- NANJUNDAN, J.; RAMASAMY, R.; UTHANDI, S.; PONNUSAMY, M. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, n. May 2018, p. 374–380, 2019. doi: 10.1016/j.micpath.2019.01.037.
- NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 372–378, 2010. doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.048.

- NGADZE, E.; ICISHAHAYO, D.; COUTINHO, T. A.; VAND DER WAALS, J. E. Role of Polyphenol Oxidase, Peroxidase, Phenylalanine Ammonia Lyase, Chlorogenic Acid, and Total Soluble Phenols in Resistance of Potatoes to Soft Rot. **Plant Disease**, v. 96, n. 2, p. 186–192, 2012.
- NIKOLOVA, M.; YORDANOV, P.; SLAVOV, S.; BERKOV, S. Antifungal activity of some plant extracts against phytopathogenic fungi. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 6, n. 2, p. 704–709, 2017.
- NIU, D.; LIU, H.; JIANG, C.; WANG, Y.; WANG, Q.; JIN, H.; GUO, J. The Plant Growth – Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 Induces Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Simultaneously Activating Salicylate- and Jasmonate/Ethylene-Dependent Signaling Pathways. v. 24, n. 5, p. 533–542, 2011.
- O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 293–304, 2017. doi: 10.1007/s13313-017-0481-4.
- ODILBEKOV, F.; EDIN, E.; MOSTAFANEZHAD, H.; COOLMAN, H.; GRENVILLE-BRIGGS, L. J.; LILJEROTH, E. Within-season changes in *Alternaria solani* populations in potato in response to fungicide application strategies. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, n. 3, p. 953–965, 2019. doi: 10.1007/s10658-019-01826-8.
- OLIVOTO, T. **Pliman: Tools for Plant Image Analysis. R package version 0.3.0.** CRAN.R-project.org. 2021.
- OMIADZE, N. T.; MCHEDLISHVILI, N. I.; ABUTIDZE, M. O. Phenoloxidases of perennial plants: Hydroxylase activity, isolation and physiological role. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, n. 2, p. 196–200, 2018. doi: 10.1016/j.aasci.2018.03.009.
- PASCHE, J. S.; WHARAM, C. M.; GUDMESTAD, N. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in Response to QoI Fungicides. **Plant dis**, v. 88, n. 2, p. 181–187, 2004. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.181>.
- PATEL, S. J.; SUBRAMANIAN, R. B.; JHA, Y. S. Biochemical and molecular studies of early blight disease in tomato. **Phytoparasitica**, v. 39, n. 3, p. 269–283, 2011. doi: 10.1007/s12600-011-0156-6.
- PATRIARCA, A.; FERNÁNDEZ-PINTO, V. Reference Module in Food Science: *Alternaria*. In: **Reference Module in Food Science**. [s.l: s.n.] p. 1–9. 2018.
- PEIXOTO, J. V. M.; NETO, C. D. M. S.; CAMPOS, L. F. C.; DOURADO, W. D. S.; NOGUEIRA, A. P. O.; NASCIMENTO, A. D. R. Industrial tomato lines: morphological properties and productivity. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1–15, 2017.
- PEREIRA, R. B.; DONIZETE, A.; CARVALHO, F. De; PINHEIRO, J. B. Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto. . 2013, p. 5p.

- PERINA, F. J.; AMARAL, D. C.; FERNANDES, R. S.; LABORY, C. R. G.; TEIXEIRA, G. A.; ALVES, E. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: Effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. **Pest Management Science**, v. 71, n. 10, p. 1371–1378, 2015. doi: 10.1002/ps.3933.
- PERINA, F. J.; DE ANDRADE, C. C. L.; MOREIRA, S. I.; NERY, E. M.; OGOSHI, C.; ALVES, E. *Cinnamomun zeylanicum* oil and trans-cinnamaldehyde against *Alternaria* brown spot in tangerine: direct effects and induced resistance. **Phytoparasitica**, v. 47, n. 4, p. 575–589, 2019. doi: 10.1007/s12600-019-00754-x.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing. 2021.
- RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD-ALLAH, E. F. *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–14, 2017. doi: 10.3389/fphys.2017.00667.
- RAGUCHANDER, T.; SARAVANAKUMAR, D.; BALASURRAMANIAN, P. Molecular Approaches to Improvement of Biocontrol Agents of Plant Diseases. **Journal of Biological Control**, v. 25, n. 2, p. 71–84, 2011. doi: 10.18311/jbc/2011/3727.
- RAGUPATHI, K. P.; RENGANAYAKI, P. R.; SUNDARESWARAN, S.; KUMAR, S. M.; KAMALAKANNAN, A. Evaluation of Essential Oils against Early Blight (*Alternaria solani*) of Tomato. **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 21, n. 24, p. 159–163, 2020. doi: 10.9734/irjpac/2020/v21i2430345.
- RAVEAU, R.; FONTAINE, J.; LOUNÈS-HADJ, A. Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 1–31, 2020. doi: 10.3390/foods9030365.
- REUVENI, M.; SANCHES, E.; BARBIER, M. Curative and Suppressive Activities of Essential Tea Tree Oil against Fungal Plant Pathogens. **Agronomy**, v. 10, n. 609, p. 1–12, 2020. doi: 10.3390/agronomy10040609.
- REX, B.; PRABHU, S.; KUMAR, J. S. Original article Antifungal efficacies of plant extracts against *Alternaria solani* (Ellis and Martin) Jones and Grout under *in vitro* condition. **Annals of Phytomedicine: An International Journal**, v. 8, n. 1, p. 148–152, 2019. doi: 10.21276/ap.2019.8.1.19.
- RIBES, S.; FUENTES, A.; TALENS, P.; BARAT, J. M. Prevention of fungal spoilage in food products using natural compounds: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 12, p. 2002–2016, 2018. doi: 10.1080/10408398.2017.1295017.
- SAFRA. **Cultivo de tomates em campo aberto**. 2020. Disponível em: <http://revistasafra.com.br/tomates-em-campo-aberto/>. Acesso em: 4 julho 2021.
- SALEHI, B.; SHARI, R.; SHAROPOV, F.; NAMIESNIK, J.; ROOINTAN, A.; KAMLE, M.; KUMAR, P.; SHARI, J. Beneficial effects and potential risks of tomato consumption for human health : An overview. **Nutrition**, v. 62, p. 201–208, 2019. doi: 10.1016/j.nut.2019.01.012.

SALHI, N.; RAHMANI, B.; MEHANI, M.; BENOUAAR, V. T. M.; AMRAOUI, K.; BISSATI, S. The antifungal activity of *Artemisia herba-alba* aqueous extract and essential oil against storage fungus *Alternaria* spp. and *Fusarium* spp. Plant material. **Journal of Applied Biological Sciences E-ISSN:**, v. 13, n. 2, p. 108–112, 2019.

SANOUBAR, R.; BARBANTI, L. Fungal diseases on tomato plant under greenhouse condition. **European Journal of Biological Research**, v. 7, n. 4, p. 299–308, 2017. doi: 10.5281/zenodo.1011161.

SANTOS, P. H. D. DOS; SILVEIRA, S. F. DA; VIVAS, M.; CARVALHO, B. M.; PEREIRA, M. G. Alternative control to black spot disease in papaya genotypes. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 1, p. 60–62, 2017. doi: 10.1590/0100-5405/2208.

SARAVANAKUMAR, D.; THOMAS, A.; BANWARIE, N. Antagonistic potential of lipopeptide producing *Bacillus amyloliquefaciens* against major vegetable pathogens. **European Journal of Plant Pathology J Plant Pathol**, v. 154, p. 319–335, 2019. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01658-y>.

SAYIDI, M.; NEMATOLLAHI, S. Antifungal Activity of Nettle (*Urtica dioica* L.) and European Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) Extracts on *Alternaria alternata*. **International Journal of Molecular and Clinical Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 869–874, 2017.

SELLAMUTHU, P. S.; MAFUNE, M.; SIVAKUMAR, D.; SOUNDY, P. Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 12, p. 3024–3031, 2013. doi: 10.1002/jsfa.6135.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, p. 446–459, 2017. doi: 10.1080/13102818.2017.1286950.

SHAHZAD, R.; KHAN, A. L.; BILAL, S.; ASAF, S.; LEE, I. J. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: An example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **PeerJ**, v. 2017, n. 3, p. 1–21, 2017. doi: 10.7717/peerj.3107.

SHAHZAD, R.; WAQAS, M.; KHAN, A. L.; ASAF, S.; KHAN, M. A.; KANG, S. M.; YUN, B. W.; LEE, I. J. Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 236–243, 2016. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.006.

SHETTY, H. S.; SURYANARAYAN, S. M.; JOGAIHAH, S.; JANAKIRAMA, A. R. S.; HANSEN, M.; JØRGENSEN, H. J. L.; TRAN, L. S. P. Bioimaging structural signatures of the oomycete pathogen *Sclerospora graminicola* in pearl millet using different microscopic techniques. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-51477-2.

SHETTY, N. P.; JENSEN, J. D.; KNUDSEN, A.; FINNIE, C.; GESHI, N.; BLENNOW, A.; COLLINGE, D. B.; JØRGENSEN, H. J. L. Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 15, p. 4287–4300, 2009. doi: 10.1093/jxb/erp269.

- SHIGETO, J.; TSUTSUMI, Y. Diverse functions and reactions of class III peroxidases. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1395–1402, 2016. doi: 10.1111/nph.13738.
- SHOAIB, A.; IQBAL, J. Cultural, morphological, molecular comparison and pathogenicity of *Alternaria solani* causing early blight disease in tomato. **Mycopath**, v. 15, n. 1, p. 7–11, 2018.
- SIAHMOSHTEH, F.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SPADARO, D.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 89, p. 300–307, 2018. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.11.010.
- SILVA, Y. P. A.; BORBA, B. C.; REIS, M. G.; CALIARI, M.; FERREIRA, T. A. P. C. Tomato industrial waste as potential source of nutrients. In: **Anais...**2016.
- SIMMONS, E. G. **Alternaria: an identification manual**. Paises Baixos: CBS, Utrecht, 2007.
- SINGH, H. B. Management of plant pathogens with microorganisms. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, n. 2, p. 443–454, 2014. doi: 10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55120.
- SORAUER, P. Auftreten einer dem amerikanischen “Early blight” entsprechenden Krankheit an den deutschen Karoffeln. **Zeitschr. f. Pflanzenker**, v. 6, p. 109, 1896.
- SOUSA, R. R.; GARCIA, S. L. D. S.; JUNIOR, A. D. C.; FERNANDES, L. P. Tipos de controle alternativo de pragas e doenças nos cultivos orgânicos na cidade de Araguatins-Tocantins, Brasil. In: **Anais...**2017.
- SOWMYA, V.; THERA, U. K.; SRINIVAS, K.; PRANAYA, K. Antimicrobial activity of essential oils against early blight of tomato under *in vitro* conditions. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 10, n. 1, p. 1103–1105, 2021. doi: 10.22271/phyto.2021.v10.i1p.13480.
- TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of Citrus reticulata Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 153, p. 265–271, 2014. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.070.
- TAO, N.; OUYANG, Q.; JIA, L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. **Food Control**, v. 41, n. 1, p. 116–121, 2014. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.01.010.
- THILAGAVATHI, R.; SARAVANAKUMAR, D.; RAGUPATHI, N.; SAMIYAPPAN, R. A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 46, n. 2, p. 157–167, 2007. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-2147.
- TIMMERS, A. C. J. Light microscopy of whole plant organs. **Journal of Microscopy**, v. 263, n. 2, p. 165–170, 2016. doi: 10.1111/jmi.12394.

TOMAZONI, E. Z.; PAULETTI, G. F.; TEREZINHA, R.; MOURA, S.; SCHWAMBACH, J. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 223, n. November 2016, p. 72–77, 2017. doi: 10.1016/j.scienta.2017.04.033.

TOMAZONI, E. Z.; RIBEIRO, R. T. S.; PAULETTI, G. F.; GERALDO, L. G.; SCHWAMBACH, J.; ZORZI, E.; RIBEIRO, R. T. S.; PAULETTI, G. F.; GERALDO, L.; ZORZI, E.; RIBEIRO, R. T. S.; PAULETTI, G. F.; SOARES, G. L. G. Inhibition of *Alternaria* stem canker on tomato by essential oils from *Baccharis* species. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 9, p. 1–9, 2019. doi: 10.1080/03601234.2019.1633212.

TYMON, L.; JOHNSON, D. A. Fungicide resistance of two species of *Alternaria* from potato in the Columbia Basin of Washington. **Plant Disease**, v. 98, n. 12, p. 1648–1653, 2014. doi: 10.1094/PDIS-12-13-1199-RE.

URSACHE, R.; ANDERSEN, T. G.; MARHAVÝ, P.; GELDNER, N. A protocol for combining fluorescent proteins with histological stains for diverse cell wall components. **Plant Journal**, v. 93, n. 2, p. 399–412, 2018. doi: 10.1111/tbj.13784.

VAKALOUNAKIS, D. Evaluation of tomato cultivars for resistance to *Alternaria* blight. **Annals of Applied Biology**, v. 102, p. 138–139, 1983.

VAN DER WAALS, J. E.; KORSTEN, L.; AVELING, T. A. S. A review of early blight of potato. **African Plant Protection**, v. 7, n. 2, p. 91–102, 2001.

VAN WEES, S. C.; VAN DER ENT, S.; PIETERSE, C. M. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 443–448, 2008. doi: 10.1016/j.pbi.2008.05.005.

VANITHA, S. C.; NIRANJANA, S. R.; UMESHA, S. Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of Tomato. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 9, p. 552–557, 2009. doi: 10.1111/j.1439-0434.2008.01526.x.

VILAPLANA, R.; PAZMIÑO, L.; VALENCIA-CHAMORRO, S. Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil. **Postharvest Biology and Technology**, v. 138, n. September 2017, p. 56–63, 2018. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.12.008.

WAITHAKA, P. N.; GATHURU, E. M.; GITHAIGA, B. M.; KIMANI, S. N. Control of Passion Fruit Fungal Diseases Using Essential Oils Extracted from Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and Eucalyptus (*Eucalyptus agglomerata*) in Egerton University Main Campus Njoro, Kenya. **International Journal of Microbiology**, v. 2017, p. 1–6, 2017. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/2814581>.

WALTERS, D. R. **Plant Defense: Warding off attack by pathogens, herbivores and parasitic plants**. Edinburgh: Wiley-Blackwell, 2010.

- WANG, C. J.; WANG, Y. Z.; CHU, Z. H.; WANG, P. S.; LIU, B. Y.; LI, B. Y.; YU, X. L.; LUAN, B. H. Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YTB1407 elicits resistance against two fungal pathogens in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Journal of Plant Physiology**, v. 253, p. 1–9, 2020. doi: 10.1016/j.jplph.2020.153260.
- WANG, C. Y.; WANG, S. Y.; CHEN, C. Increasing Antioxidant Activity and Reducing Decay of Blueberries by Essential Oils. **journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3587–3592, 2008. doi: 10.1021/jf7037696.
- WANG, L.; JIANG, N.; WANG, D.; WANG, M. Effects of essential oil citral on the growth, mycotoxin biosynthesis and transcriptomic profile of *Alternaria alternata*. **Toxins**, v. 11, n. 10, p. 1–18, 2019. doi: 10.3390/toxins11100553.
- WANG, Y.-W.; ZENG, W.-C.; XU, P.-Y.; LAN, Y.-J.; ZHU, R.-X.; KAI, Z.; HUANG, Y.-N.; GAO, H. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) Peel. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3382–3393, 2012. doi: 10.3390/ijms13033382.
- WOUDENBERG, J. H. C.; GROENEWALD, J. Z.; BINDER, M.; CROUS, P. W. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 171–212, 2013. doi: 10.3114/sim0015.
- WOUDENBERG, J. H. C.; TRUTER, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Large-spored *Alternaria* pathogens in section Porri disentangled. **Studies in Mycology**, v. 79, n. 1, p. 1–47, 2014. doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.003.
- WU, L.; HUANG, Z.; LI, X.; MA, L.; GU, Q.; WU, H.; LIU, J.; BORRIS, R.; WU, Z.; GAO, X. Stomatal closure and SA-, JA/ET-signaling pathways are essential for *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 to restrict leaf disease caused by *Phytophthora nicotianae* in *Nicotiana benthamiana*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–8, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.00847.
- WU, Z.; HUANG, Y.; LI, Y.; DONG, J.; LIU, X.; LI, C. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* via Induction of the Defense Mechanism and Antimicrobial Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SL-44 on Pepper (*Capsicum annuum* L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–12, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.02676.
- XU, J.; SHAO, X.; LI, Y.; WEI, Y.; XU, F.; WANG, H. Metabolomic Analysis and Mode of Action of Metabolites of Tea Tree Oil Involved in the Suppression of *Botrytis cinerea*. v. 8, n. June, p. 1–11, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01017.
- XU, S.; NI, Z.; MA, L.; ZHENG, X. Control of *Alternaria* Rot Of Cherry Tomatoes By Food-Grade *Laurus nobilis* Essential Oil Microemulsion. **Journal of Food Safety**, v. 37, n. 1, p. 1–9, 2016. doi: 10.1111/jfs.12286.
- YA-HAN, C.; LU, M.-H.; GUO, D.-S.; ZHAI, Y.-Y.; MIAO, D.; YUE, J.; YUAN, C.-H.; ZHAO, M.-M.; AN, D.-R. Antifungal effect of magnolol and honokiol from *Magnolia officinalis* on *Alternaria alternata* causing tobacco brown spot. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 6–11, 2019. doi: 10.3390/molecules24112140.

- YAKOUBI, M.; HAMINI-KADAR, N.; GHERIB, M.; AMROUCHE, A. Inhibitory effect of essential oils from *Pulicaria mauritanica* and *Micromeria debilis* on growth of *Alternaria* spp., the causal agent of tomato early blight. **Environmental and Experimental Biology**, v. 17, p. 185–191, 2019. doi: 10.22364/eeb.17.19.
- YASIN, M.; YOUNIS, A.; RAMZAN, F.; JAVED, T.; SHABBIR, R.; NOUSHAHI, H. A.; SKALICKY, M.; ONDRISIK, P.; BRESTIC, M.; HASSAN, S.; SABAGH, A. E. L. Extraction of Essential Oil from River Tea Tree (*Melaleuca bracteata* F. Muell): Antioxidant and Antimicrobial Properties. v. 13, n. 4827, p. 1–10, 2021. doi: 10.3390/su13094827.
- YU, D.; WANG, J.; SHAO, X.; XU, F.; WANG, H. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 1253–1262, 2015. doi: 10.1111/jam.12939.
- ZAFAR, H.; SHAUKAT, S. S. Evaluation of Some Fungicides for the Control of Early Blight Disease (*Alternaria Solani*) of Tomato. **Int. J. Biol. Biotech**, v. 15, n. 1, p. 129–140, 2018.
- ZHAO, X.; ZHOU, Z. J.; HAN, Y.; WANG, Z. Z.; FAN, J.; XIAO, H. Z. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. **Microbiological Research**, v. 168, n. 9, p. 598–606, 2013. doi: 10.1016/j.micres.2013.03.001.
- ZHOU, H.; TAO, N.; JIA, L. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 277–283, 2014. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.057.
- ZUCKER, M. Induction of Phenylalanine Deaminase by Light and its Relation to Chlorogenic Acid Synthesis in Potato Tuber Tissue. v. 40, n. 5, p. 779–784, 1965.