



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00850**

(22) Data de depozit: **17/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/01/2022** BOPI nr. 1/2022

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **RODINO STELIANA,
STR. DEALUL ȚUGULEA NR. 38-40, BL. 14,
SC. 1, AP. 12, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BUTU ALINA, STR. DEALUL ȚUGULEA
NR.32-36, BL.15, SC.A, AP.12, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BUTU MARIAN, STR. DEALUL ȚUGULEA
NR.32-36, BL.15, SC.A, AP.12, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**BARY YUSUF YANAR, IZZET KADIOGLU,
AYHAN GOKCE, DBRAHIM DEMIRTAS,
NEZHUN GOREN, HALIT CAM AND MARK
WHALON, "IN VITRO ANTIFUNGAL
ACTIVITIES OF 26 PLANT EXTRACTS ON
MYCELIAL GROWTH OF PHYTOPHTHORA
INFESTANS (MONT.)", AFRICAN
JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, VOL.
10(14), PP. 2625-2629, 2011; SOYLU E. M.,
SOYLU S. & KURT S., "ANTIMICROBIAL
ACTIVITIES OF THE ESSENTIAL OILS OF
VARIOUS PLANTS AGAINST TOMATO
LATE BLIGHT DISEASE AGENT
PHYTOPHTHORA INFESTAN",
<https://doi.org/10.1007/s11046-005-00206-z>
, VOL. 161, PP. 119-128, 2006**

(54) **EXTRACT DE PLANTE CU EFECT ANTIMICROBIAN ASUPRA
UNOR PATOGENI AI CULTURILOR DE TOMATE**



Invenția de față se referă la un extract de plante cu efect antimicrobian asupra unor patogeni din genurile *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Alternaria* și *Pythium*, care produc boli la tomate, având aplicații în agricultura ecologică.

Aplicarea unor "produse naturale" în controlul bolilor și dăunătorilor plantelor a devenit o alternativă tot mai viabilă, și pare a fi un domeniu interesant și o metodă acceptabilă. Mulți cultivatori deja folosesc extracte din plante împotriva unor agenți patogeni ai plantelor cu importanță economică pentru culturile în arii protejate (Iacomi și colab., 2006). Produse naturale derivate din plante sunt considerate o soluție pentru a atenua problemele de mediu cauzate de utilizarea intensivă a pesticidelor de sinteză, precum și efectele negative asupra sănătății umane exercitate prin lanțul alimentar.

Prin urmare, cercetările actuale în agricultura ecologică sunt orientate pe dezvoltarea de tratamente alternative la produse chimice sintetice, pentru controlul bolilor plantelor. Speciile de plante cu efect de pesticide sunt foarte diferite: specii acvatice, arbori, plante tropicale, plante suculente, plante comestibile sau otrăvitoare, plante medicinale sau aromatice. Gama de agenți fitopatogeni pentru care a fost examinată acțiunea inhibitoare este foarte diversă, fiind vizați, de regulă, cei mai importanți fitopatogeni fungici din genurile *Fusarium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, etc. Pesticidele botanice pot fi extrase practic din toate părțile plantei (tulpini, rădăcini, frunze, flori, semințe).

"In vitro antifungal activities of 26 plant extracts on mycelial growth of *Phytophthora infestans* (Mont.)" de Bary Yusuf Yanar, Izzet Kadioglu, Ayhan Gökçe, Đbrahim Demirtaş, Nezhun Gören, Halit Çam and Mark Whalon, **African Journal of Biotechnology Vol. 10(14), pp. 2625-2629, 4 April, 2011** (<http://www.academicjournals.org/AJB>) este un studiu realizat pentru a evidenția activitatea fungicidă a 26 extracte de plante asupra patogenului *Phytophthora infestans*. Soylu, E.M., Soylu, S. & Kurt, S. în lucrarea **"Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Various Plants against Tomato Late Blight Disease Agent *Phytophthora infestans*"** **Mycopathologia 161, 119-128 (2006)**, demonstrează activitatea antimicrobiană a uleiurilor esențiale extrase din părțile aeriene ale plantelor de oregano, cimbru, lavandă, rozmarin, fenicul și dafin, asupra dăunătorului *Phytophthora infestans*, care reprezintă una dintre categoriile celor mai păgubitori fungi fitopatogeni, atât prin intensitatea simptomelor de boală pe care le produce, cât și prin numărul mare de specii de plante pe care le poate infecta.

De aceea, și interesul specialiștilor români s-a îndreptat spre evaluarea efectelor inhibitoare ale unor extracte vegetale. De exemplu, Cărăbeș și Lauer (2006) au examinat efectele extractelor acetone din *Paeonia suffruticosa* (bujor arbustiv) și *Hedera helix* (iederă) asupra eliberării și germinării zoosporilor de *Phytophthora infestans* și *Pseudoperonospora cubensis*, agenții patogeni ai manei la tomate, respectiv, castraveți. Experimentele au evidențiat faptul că extractele inhibă eliberarea zoosporilor precum și dezvoltarea filamentelor de germinare ale acestora, concentrațiile stabilite fiind de 0,15% în cazul extractelor din *Hedera helix* și respectiv de 0,6% în cazul extractelor din *Paeonia suffruticosa* (Cărăbeș și colab., 2006). De remarcat că experimentele au fost efectuate în condiții de laborator, atât pe mediu de cultură (pentru evaluarea efectelor inhibitoare ale extractelor pe culturi de *Phytophthora*), cât și în sistem gazdă-parazit (în principal pentru *Pseudoperonospora* dar și pentru *Phytophthora*). Pentru a controla infestarea cu agenții fitopatogeni în culturile de legume, tratamentele cu extracte de *H. helix* și *P. suffruticosa* s-au realizat pe frunze detașate cu 2 și respectiv 7 zile înainte de inocularea artificială cu fungi. Frunzele astfel tratate au fost menținute la 17°C și o umiditate relativă a aerului de 100%, iar evaluarea a fost realizată la un interval de 2,8 și respectiv 14 zile de la inoculare. Ambele extracte au inhibat dezvoltarea *P. infestans* (Cărăbeș și colab., 2009).

Un alt patogen de interes pentru practica agricolă, este reprezentat de speciile	1
genului <i>Alternaria</i> . De exemplu, pentru monitorizarea speciilor de plante cu acțiune fungicidă	
asupra <i>Alternaria brassicicola</i> (una dintre cele trei specii de <i>Alternaria</i> transmise prin	3
semințele de crucifere) Iacomî și colab. (2006) au utilizat o serie de extracte vegetale	
comparativ cu fungicide chimice și au demonstrat eficiența și utilitatea produselor de origine	5
naturală în combaterea infecției fungice.	
Deseori studiile au vizat în combaterea specifică a unui anumit tip de agent	7
fitopatogen. De exemplu, (Dushyent și colab. 1997) au analizat 11 tipuri de extracte vegetale	
în privința efectului inhibitor asupra creșterii miceliului de <i>Alternaria solani</i> . Ei au constatat	9
că extractele de frunze de <i>Tamarix aphylla</i> și <i>Salsola baryosma</i> au inhibat complet creșterea	
<i>in vitro</i> a agentului patogen. Aspecte similare au fost evidențiate de (Wszelaki și colab.,	11
2005) de data aceasta cu extracte de <i>Allium sativum</i> : acestea au redus semnificativ incidența	
contaminării cu <i>Alternaria solani</i> a frunzelor de tomate.	13
Alternarioza reprezintă o boală comună pentru majoritatea speciilor de plante din	
familia <i>Solanaceae</i> , ea fiind răspândită în zonele cu ploi frecvente, ceață și umiditate	15
crescută.	
Phalisteen și colab. a investigat efectul împotriva alternariozei cartofului atât al unor	17
extracte frunze de plante medicinale indiene, cât și acțiunea combinată a extractelor	
respective împreună cu fungicide de sinteză (Carbendazim). Experimentele efectuate în	19
condiții <i>in vitro</i> au evidențiat că extractele apoase obținute din plantele medicinale	
<i>Azadirachata indica</i> (3%), <i>Calotropis procera</i> (3%), <i>Nerium oleander</i> (3%), <i>Ocimum sanctum</i>	21
(3%) și fungicidul Carbendazim (1%) au inhibat creșterea patogenului <i>Alternaria solani</i> atunci	
când agentul inhibitor a fost inclus în mediul de cultură PDA (Potato Dextrose Agar)	23
(Phalisteen și colab., 2008).	
Recent, (Sallam, 2011) au examinat șase specii de plante caracteristice nordului	25
Africii: <i>Ocimum basilicum</i> (busuioc), <i>Azadirachata indica</i> (neem), <i>Eucalyptus chamadulonsis</i>	
(eucalipt), <i>Datura stramonium</i> (ciumăfaie sau laur), <i>Nerium oleander</i> (leandru) și <i>Allium</i>	27
<i>sativum</i> (usturoi) pentru efectele antifungice atât <i>in vitro</i> , cât și în experimente realizate în	
condiții de seră și de câmp. Tratamentele au fost comparate cu un fungicid utilizat pe scară	29
largă pentru tratarea bolilor fungice, Ridomil Plus. Toate tratamentele aplicate în câmp au	
îmbunătățit producția de legume, comparativ cu controlul infectat și netratat. Ce mai mare	31
reducere <i>in vitro</i> a creșterii miceliului de <i>A. solani</i> a fost înregistrată în cazul extractelor de	
<i>D. stramonium</i> , <i>A. indica</i> și <i>A. sativum</i> , în timp ce în condiții de seră, severitatea bolii a fost	33
redușă cel mai mult de către tratamentul cu Ridomil Plus, urmat de extractul de <i>A. sativum</i> ,	
și <i>D. stramonium</i> .	35
<i>Rhizoctonia solani</i> este unul dintre cei mai întâlniți fitopatogeni care afectează	
culturile de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>), cartofi (<i>Solanum tuberosum</i>), castraveți	37
(<i>Cucumis sativus</i>), mazăre (<i>Pisum sativum</i>) și multe altele, cauzând putregaiul rădăcinilor	
și ofilirea răsadurilor (Agrios, 2005, Ohkura și colab., 2009).	39
Experimentele realizate de (Sehajpal și colab., 2009) au demonstrat că extractele de	
<i>Alium sativum</i> au manifestat o fungitoxicitate crescută față de <i>R. Solani</i> , chiar și în	41
concentrații scăzute.	
Un alt agent fitopatogen major al diferitelor culturi, față de care tratamentele actuale	43
sunt destul de puțin eficiente (Al-Sheikh, 2010) este reprezentat de specii de <i>Pythium</i> .	
Acestea pot provoca boli cum ar fi ofilirea răsadurilor, putregaiul semințelor, putregaiul	45
rădăcinilor, putregaiul moale (Agrios, 2005, Horner și colab.. 2012, Le și colab., 2014) la grâu	
(<i>Triticum aestivum</i>), porumb (<i>Zea mays</i>), soia (<i>Glycine max</i>), ardei (<i>Capsicum annuum</i>),	47
fasole (<i>Pisum sativum</i>), castraveți (<i>Cucumis sativus</i>), tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) și	
multe alte culturi, rezultând pierderi economice imense.	49

Pentru găsirea unor variante de tratament alternative pesticidelor chimice sau în combinație cu acestea au fost realizate o serie de studii referitoare la potențialul anti-*Pythium* a unor extracte vegetale. Astfel, Muthukumar și colab. (2010) au utilizat un amestec de extracte din frunze de *Allium sativum* și *Allium cepa* pentru inhibarea creșterii miceliului de *P. aphanidermatum*. Analizele complexe efectuate asupra extractelor respective (prin GC-MS) au permis identificarea a 22 de compuși cu efecte antimicrobiene.

Materiale și metode

1. Material vegetal

Artemisia absinthium (pelin) face parte din familia *Asteraceae* (*Compositae*). Planta este foarte populară în multe părți ale lumii, crește în sălbăticie în zonele de șes și deluroase, în special pe locurile însorite. Cea mai utilizată parte este reprezentată de frunze, recoltate imediat înainte de înflorirea plantei.

Salvia officinalis (salvia) este o plantă erbacee perenă. Are frunze acoperite cu peri fini de culoare argintie sau verde cenușie. Tulpina crește dreaptă și poate atinge aproximativ un metru înălțime. Preferă expoziție luminoasă și căldură, iar pământul trebuie să fie permeabil, să conțină nisip și calcar.

Solanum lycopersicum sau *Lycopersicon esculentum* (roșia, pătlăgică roșie sau tomata) este o plantă din familia *Solanaceae*, clasa legumelor solano-fructuoase, alături de cartof vinete, ardei, batate. Este o plantă perenă, atingând frecvent între 1 și 3 m înălțime. Are un trunchi mai mult ierbos care crește de obicei pe araci sau pe tulpinile altor plante. Frunzele plantei sunt lungi de 10-25 cm, de forma penat-compusă, având 5-9 frunzulițe cu margini serate.

Pentru prepararea formulei se utilizează părțile aeriene ale acestor plante uscate în aer liber, în locuri ferite de lumină puternică sau uscate cu aer cald, la o temperatură de 45-60°C. În cazul *Solanum lycopersicum* se recomandă utilizarea lăstarilor tineri (copili).

2. Material microbiologic

În vederea evaluării activității antimicrobiene au fost utilizate tulpini de fungi fitopatogeni, după cum urmează: *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Alteraria alternata* și *Pythium sp.* Tulpinile utilizate aparțin colecției Departamentului de Biotehnologii, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice. București.

Cultura de *P. infestans* a fost menținută pe mediu de secară, iar celelalte tulpini au fost menținute pe mediu de creștere Potato Dextrose Agar (PDA), la 20°C. Testele au fost realizate utilizând discuri miceliene provenind din culturi fungice proaspete, prezentând o creștere activă.

3. Medii de cultură

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pentru obținerea acestui mediu se procedează în felul următor: 200 g de felii de cartof se fierb timp de 30 min în aproximativ 500 ml de apă; după filtrare prin tifon se adaugă glucoza (dextroză) (20 g/L) și agar - 20g/L) și se completează cu apă până la 1 L. În unele experimente a fost utilizat mediu gata preparat, în formă deshidratată (Liofilchem). În acest caz s-au suspendat 42,00 g de mediu deshidratat în 1000 ml apă bidistilată și s-a amestecat pe plita magnetică până la dizolvare completă. S-a sterilizat în autoclav timp de 15 min la 121°C. După ce s-a răcit la 50°C, mediul a fost turnat în plăci Petri sterile, într-un strat de aproximativ 5 mm. Această cantitate corespunde la 15-20 ml de mediu pentru plăci cu diametrul de 90 mm.

4. Reactivi

În testele de microbiologie a fost folosit mediul de cultură Potato Dextrose Agar (PDA) achiziționat de la Liofilchem. Antifungicidele de sinteză au fost furnizate de SC Aectra Agrochemicals SA. Toți reactivii și solvenții au avut puritate analitică.

5. Metoda de preparare

Extractul a fost obținut prin macerare și ultrasonicare. Aceasta este o tehnică de extracție simplă și ieftină, care permite transferul facil al tehnologiei în industrie. Solventul (etanol 70%) a fost adăugat în raport 1:10 (w:v) peste o cantitate exactă de material vegetal sub formă de pulbere fină, uscată. Amestecul a fost lăsat la macerat în vase de sticlă sigilate timp de 96 h, la temperatura camerei, în întuneric, cu agitare ocazională. A urmat ultrasoni-

carea pentru care au fost utilizați următorii parametri de lucru: timp de sonicare 30 min, temperatura 35°C, putere 34 Watt. Extractul obținut a fost filtrat pe pâlnie Buchner printr-un filtru de hârtie (Whatman nr. 1) sub vid. S-a eliminat alcoolul prin concentrare la rotavapor și extractul apos rezultat a fost păstrat la o temperatură de 4°C în recipiente sigilate, până la utilizarea ulterioară.

6. Testarea activității antifungice

Efectul extractului de plante asupra creșterii miceliene a fungilor fitopatogeni de interes a fost testat prin metoda includerii acestuia în mediul de cultură (Poison Food Method sau Radial Growth Method). Această metodă presupune încorporarea unei cantități adecvate din extract de plante în mediul de creștere (PDA, răcit la 40-50°C). Controlul negativ a fost reprezentat de plăci Petri conținând mediu netratat. Controlul pozitiv a fost reprezentat de plăci tratate cu fungicid de sinteză, utilizat în mod uzual în cultură. Plăcile au fost lăsate să se solidifice în hota cu flux laminar și după aceea au fost inoculate cu discuri miceliene cu diametrul de 6 mm, tăiate din marginea unei culturi proaspete, cu creștere activă. Pentru fiecare tratament au fost realizate trei replicări și a fost raportată valoarea medie a citirilor.

Plăcile Petri au fost incubate la întuneric, la 20 ± 2°C pentru 5-16 zile (în funcție de fitopatogenul testat), moment în care colonia din placa de control a atins marginea vasului. Măsurarea diametrului coloniei a fost înregistrată zilnic, începând de la 9-12 h după inoculare. Procentul de inhibare a creșterii miceliului, I (%), ca urmare a tratamentului cu formula SAT a fost calculat folosind următoarea formulă:

$$I(\%) = (1 - d_t/d_c) \cdot 100(\%), \quad (1)$$

unde, d_c este diametrul mediu al coloniei, măsurat în placa Petri de control, fără tratament, iar d_t este diametrul mediu măsurat în plăcile Petri tratate cu extractul de plante (Ogbebor și colab., 2008).

7. Teste de germinare in vitro pentru evaluarea efectului extractului de plante asupra semințelor de tomate

Solul utilizat a fost procurat de la un furnizor local de materiale de grădinărit, sub denumirea de substrat de creștere pentru plante cu cerințe nutriționale ridicate, producător Compo GmbH, Germania. Ingrediente: Turba (grad de descompunere H_2-H_7). Perlite® 3%, var, îngrășământ NPK-, AGROSIL® (fosfat de siliciu). Conținut de sare, KCl, 3,0 g/L. Caracteristicile fizice și chimice ale acestuia au fost: valoare pH 5,0-6,5. Conținut de nutrienți: 200-450 mg/L N, azot; 200-500 mg/L P_2O_5 , fosfat (CAL); 300-550 mg/L K_2O , oxid de potasiu (CAL). Substanță organică (evaluată ca pierdere prin întărire): 20%. Pentru folosirea în testele de germinare, solul a fost sterilizat prin autoclavare la 120°C, timp de 30 min, în trei zile consecutive.

În vederea utilizării pentru inoculare, cultura de *Rhizoctonia solani* utilizată în teste a fost menținută pe mediu PDA și incubată la 20°C la întuneric, timp de 5 zile. Pentru prepararea inoculului, din marginea unei culturi active, au fost tăiate 2 discuri miceliene de 5 mm, mărunțite și amestecate cu boabe de ovăz (*Avena sativa*) sterilizate. Inoculul a fost incubat pentru o perioadă de 3 săptămâni la temperatura camerei, cu agitare zilnică, pentru a asigura o colonizare uniformă a semințelor de ovăz. Ulterior, în vederea utilizării pentru inocularea solului, boabele de ovăz au fost lăsate la uscat pentru o perioadă de 24 h (Smith și colab., 2003). Pentru inoculare s-au folosit 5 g de boabe de ovăz la 1 kg de sol.

Tratarea semințelor de tomate

Tratamentul semințelor s-a realizat prin imersia acestora în extractul de plante conform invenției, timp de 5 min. Controlul pozitiv a fost reprezentat de semințe tratate cu un fungicid utilizat în mod uzual în prevenirea rhizoctoniozei, în practicile agricole și anume, Merpan 80 WDG. Controlul negativ a fost reprezentat de semințe imersate în apă distilă sterilă. De asemenea, un set de probe a fost lucrat cu semințe netratate și puse la germinat în sol neinoculat.

Testele de germinație au fost derulate cu utilizarea a 100 de semințe pentru fiecare probă luată în lucru. Semințele de tomate au fost așezate pe hârtie de filtru sterilă, care a fost umezită cu apă distilată sterilă, și acoperite cu 50 g de sol inoculat în prealabil cu *R. solani*. Hârtia de filtru a fost rulată și introdusă în pungi de plastic bine sigilate, după care au fost lăsate la incubat pentru o perioadă de 5 zile la temperatura camerei.

După incubare, severitatea infectării a fost evaluată utilizând o scală cu 5 nivele, descrisă anterior de Altier (Altier și colab., 1994), (tabelul 1), cu unele modificări. Rezultatele au fost raportate ca fiind media rezultată din evaluarea tuturor semințelor recuperate.

Scala pentru evaluarea severității simptomelor provocate de infecția cu R. solani asupra semințelor de tomate

Tabelul 1

Scor din evaluare	Caracteristicile semințelor
1	Plantulă sănătoasă
2	Vârf de rădăcină primară necrozat, dar ferm
3	Vârf de rădăcină primară moale și putrezit
4	Plantulă uscată, sămânță germinată cu radicul putrezit
5	Sămânță uscată, putrezită și negerminată

Determinarea procentului de germinație a fost calculat după formula:

$$\% \text{ germinație} = (n \cdot 100) / N$$

unde n reprezintă numărul de semințe germinate, sănătoase, iar N număr total de semințe testate.

8. Testarea biocontrolului rhizoctoniozei cu extractul de plante conform invenției

Pentru evaluarea posibilității utilizării extractului de plante conform invenției ca agent pentru biocontrolul infecției plantelor cu *R. solani* a fost utilizat același tip de sol ca și în cazul testelor de germinație *in vitro*, descris în secțiunea anterioară. De asemenea, prepararea inoculului fungic, inocularea solului și tratarea semințelor s-a desfășurat respectând aceiași parametri.

Pentru tratarea semințelor de tomate s-au realizat patru variante experimentale: (1) controlul pozitiv reprezentat de semănarea unor semințe netratate în sol neinfestat; (2) controlul negativ - semănarea semințelor netratate în sol inoculat; (3) semănarea semințelor tratate cu extractul de plante conform invenției în sol inoculat, pentru evaluarea efectului de biocontrol al acestora asupra rhizoctoniozei (4) semănarea semințelor tratate cu fungicid în sol inoculat.

Solul inoculat a fost distribuit în tăvi alveolare pentru răsaduri. După aceea, tăvile au fost acoperite cu un film de plastic și lăsate la incubat pentru o săptămână, pentru a promova creșterea patogenului. Semințele de tomate au fost introduse în sol la o adâncime de aproximativ 1 cm.

În primele 10 zile au fost induse condiții de saturare cu apă, pentru a favoriza apariția bolii și germinarea semințelor, urmând 4-5 zile de uscăciune, pentru a simula condițiile de secetă. Controlul negativ a fost reprezentat de probele cu semințe netratate, introduse în sol inoculat. Controlul pozitiv a fost o soluție de Merpan 80 WDG. Cultura de tomate a fost menținută la 24-26°C, cu fotoperioadă de 16/8 h întuneric. Severitatea bolii a fost evaluată utilizând o scală cu 5 nivele, descrisă în literatură de Altier și Theis (Altier și colab., 1994), (tabelul 1.).	1 3 5 7
Rezultate și discuții	
<i>Eficacitatea in vitro a extractului de plante conform invenției împotriva infecției cu Rhizoctonia solani</i>	9
<i>Rhizoctonia solani</i> este polifagă, atacând și producând pagube însemnate la mai multe specii din familia <i>Solanaceae</i> (cartof, tomate, vinete, ardei), producând căderea și apoi moartea plantelor în faza de răsad. Atât tratamentele chimice cu fungicide tradiționale, utilizate în mod curent, cât și metodele integrate de gestionare a bolilor plantelor, utilizate pentru controlul și tratamentul simptomelor cauzate de <i>R. solani</i> nu par a fi complet eficiente, și prin urmare, bolile provocate de aceasta rămân o problemă persistentă pentru fermieri (Huang și colab., 2012).	11 13 15 17
În momentul de față, sunt utilizate diferite metode pentru a controla <i>R. solani</i> , cum ar fi practicile de management integrat, solarizarea și combaterea chimică (Plodpai și colab., 2013). Indiferent de sistemul de cultivare - seră sau câmp deschis - în fiecare sezon sunt raportate focare de boli cauzate de <i>R. solani</i> . Acest agent patogen provoacă leziuni severe răsadurilor atât în pepiniere, cât și după transplantare. Managementul acestei boli este dificil datorită viabilității scleroțiilor, uneori de-a lungul a 2-3 ani (Sneh și colab., 1996, Ritchie și colab., 2013).	19 21 23
Efectul extractului de plante conform invenției asupra creșterii miceliului de <i>R. solani</i> a fost testat pe parcursul a 6 zile de incubare, prin metoda încorporării extractului de plante în mediul de creștere. După 6 zile de incubare, pe placa martor - cu mediu netratat, miceliul a atins marginile plăcii Petri (90 mm). Diametrul coloniei fungice pe plăcile cu extract de plante conform invenției, a fost de circa 29 mm (fig. 1).	25 27 29
În vederea fundamentării unor teste complementare, pentru evaluarea capacității de germinare a unor semințe tratate cu extractul de plante conform invenției, a fost calculată eficiența procesului de inhibare a creșterii miceliene (pe baza diametrului coloniei fungice). Astfel, extractul de plante a determinat inhibarea creșterii în procent de 68,15%.	31 33
Rezultatele obținute în experimentele efectuate sunt în concordanță cu rezultatele raportate de alți cercetători și prezentate în literatura științifică de specialitate. Rezultate foarte bune privind activitatea antifungică a unor extracte preparate din <i>T. patula</i> , alături de alte extracte, au fost obținute, împotriva agentului cauzator al putregaiului cenușiu (<i>Botrytis cinerea</i>) izolat din culturi de coacăz negru, <i>Ribes nigrum</i> . Pentru extractul din <i>T. patula</i> la o concentrație de 20% și respectiv 10%, în mediul de creștere a fost observată o activitate antifungică mare, cu eficiență între 80% și 100%, alături de extractele obținute din alte plante medicinale precum <i>Satureja hortensis</i> (cimbru), <i>Allium sativum</i> (usturoi) și <i>Mentha sp.</i> (mentă) (Șesan și colab., 2015). Activitatea antifungică a extractului de crăițe a dat rezultate promițătoare și împotriva altor fungi fitopatogeni: <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> și <i>Pythium ultimum</i> . Testarea extractului în metanol a fost realizată atât la întuneric, cât și la lumină, cu ajutorul a două sisteme de iluminat diferite. Datele au arătat că extractul a dovedit a avea o activitate dependentă de doză asupra tuturor fungilor, cu o diferență remarcabilă între tratamentele la lumină și cele la întuneric. Probele tratate cu doza de 50 μg/ml au demonstrat procente ridicate de inhibare (51,4%) (Mares și colab., 2004).	35 37 39 41 43 45 47

Activitatea antifungică a unor extracte din plante împotriva *R. solani*, a fost studiată și de alți cercetători. Astfel, Abd-El-Khaira și colab. au raportat activitatea inhibitoare a extractelor apoase de semințe de ceapă, lemon grass și chiliz într-un procent cuprins între 42,2 și 71,1% (Abd-El-Khair și colab., 2011). Alți autori au evaluat utilizarea unor solvenți organici în procesul de extracție (lanolina și untul de cacao) în comparație cu extracția în apă. Rezultatele au demonstrat faptul că extracția cu solvenți alternativi a condus la un conținut mai mare de taninuri în produsul obținut din plante disponibile în aria lor de lucru: *Larrea tridentate* (creosot), *Flourensia cernua*, *Agave lechuguilla*, *Opuntia sp.* și *Yucca sp.* La o concentrație de 2000 și 1000 ppm taninuri totale, extractele din *Larrea tridentate* și *Flourensia cernua*, au inhibat creșterea *R. solani* cu 100% (Castillo și colab., 2010).

Eficacitatea in vitro a extractului de plante conform invenției împotriva *Phytophthora infestans*

Mana cauzată de *Phytophthora infestans* este considerată în toată lumea ca fiind una dintre cele mai devastatoare boli ale culturilor horticole încă din anul 1840 ("Marea Foamete Irlandeză") (Fry și colab., 1997, Ristaino și colab., 2001). De atunci, pentru combaterea manei au fost dezvoltate diferite fungicide sintetice, precum și varietăți rezistente. Cu toate acestea, în ciuda cunoștințelor aprofundate în domeniu, această boală continuă să fie o problemă majoră în zonele cultivate cu tomate (*Lycopersicum esculentum* L.).

Phytophthora infestans este un fung ce face parte din grupul *Peronosporaceae* (încrângătura Oomycota) împreună cu multe alte specii care produc boli, cunoscute sub numele de mană, multor plante cultivate din familia *Solanaceae*, provocând pierderi însemnate mai ales în culturile de cartof și tomate. Combaterea se realizează cu fungicide, dar eficiența acestora este deseori depășită de instalarea la fungii țintă a fenomenului de rezistență.

Încorporarea extractului de plante conform invenției în mediul de creștere pentru *P. infestans* a condus la inhibarea dezvoltării miceliene a fitopatogenului. Astfel, în timp ce pe placa Petri conținând doar mediu de creștere dezvoltarea miceliului a debutat în ziua a șasea după inoculare, pe plăcile suplimentate cu extractul de plante creșterea coloniei a fost observată abia începând cu ziua a noua. Rezultatele înregistrate la sfârșitul perioadei de incubare (16 zile) au evidențiat faptul că formula extractul de plante conform invenției a redus creșterea radială a coloniei de *P. infestans* la 57 mm, față de controlul netratat 90 mm, după cum se poate observa în fig. 2.

Eficacitatea in vitro a extractul de plante conform invenției împotriva infecției cu *Pythium sp.*

Modul de viață al fungilor din genul *Pythium* este saprofit sau parazit, în ultimul caz infectând o gamă largă de specii vegetale prin rănilor ce se produc la nivelul rădăcinilor plantelor tinere și producând căderea acestora. Speciile de *Pythium* pot provoca diverse boli de la înființarea culturilor, cum ar fi: ofilirea răsadului, putregaiul semințelor, putrezirea rădăcinilor, putregaiul moale (Agrios, 2005, Horner și colab., 2012, Le și colab., 2014). Acest fitopatogen poate ataca diferite specii, de la cereale până la legume, precum specii de grâu (*Triticum aestivum*), porumb (*Zea mays*), soia (*Glycine max*), ardei (*Capsicum annuum*), fasole (*Pisum sativum*), castraveți (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum*), ș.a. *Pythium* este recunoscut ca un agent patogen major al multor culturi, mai ales în sere (Al-Sheikh, 2010).

În cadrul experimentelor efectuate a fost evaluată acțiunea extractului de plante conform invenției în privința efectelor inhibitoare pentru dezvoltarea unor tulpini de *Pythium sp.* Astfel, odată cu utilizarea extractului, miceliul fungic s-a dezvoltat mult mai lent decât martorul netratat, ceea ce sugerează efecte fungistatice puternice.

În privința dinamicii inhibării creșterii fungului, prin utilizarea extractului de plante conform invenției, încorporată în mediul de cultură, s-a observat o dezvoltare întârziată a miceliului de *Pythium sp.* comparativ cu martorul netratat. Miceliul a început să se dezvolte pe plăcile control netratat după 15 h de la inoculare, atingând marginile plăcii Petri (diametru de 90 mm) după 5 zile de inoculare. Pe plăcile conținând extractul de plante conform invenției creșterea miceliului a fost observată abia după mai mult de 36 h de la inoculare (fig. 3). Gradul de inhibare a creșterii miceliene produs de extractul de plante conform invenției, a fost de circa 62% (fig. 4).

Aspecte asemănătoare referitoare la acțiunea anti-*Pythium* a unor extracte vegetale au fost raportate și de alți autori, datele obținute în cazul experimentelor efectuate de noi fiind în concordanță cu acestea. Astfel, (Muthukumar și colab., 2010) examinând efectele fungitoxice de 66 de plante medicinale împotriva speciei *Pythium aphanidermatum*, agentul cauzal al ofilirii la ardeiul iute au evidențiat faptul că cel mai eficient extract antifungic a provenit din frunze de Zimmu (*Allium sativum* L. & *Allium cepa* L.) (Muthukumar și colab. 2010). De asemenea, Ambikapathy și colab. (2011) au raportat o activitate antifungică ridicată pentru extractele n-butanolice și metanolice din *Lawsonia inermis*, *Phyllanthus niruri*. *Purpurea tephrosia* împotriva *Pythium debaryanum*, în timp ce extractele metanolic de *Mimosa pudica* și *Vinca rosea* au prezentat o activitate antifungică mai scăzută.

Rezultate similare au fost obținute de Bahraminejad și colab. (2012). Aceștia au evaluat activitatea antifungică a unor extracte apoase și metanolice brute obținute din 97 de specii de plante, colectate din zona de vest a Iranului. Testele efectuate pe tulpini de *Pythium aphanidermatum* au evidențiat faptul că 17 dintre cele 97 specii de plante au prezentat activitate inhibitoare. Dintre acestea, extractele de *Glycyrrhiza glabra*, *Xanthium strumarium* și *Portulaca oleracea* au fost cele mai active extracte. Testarea extractelor vegetale selectate direct pe plante crescute în condiții de seră a demonstrat că toate extractele vegetale utilizate au determinat reducerea severității simptomelor determinate de infecția plantulelor cu *P. aphanidermatum*: de exemplu, extractele din *G. glabra* și *P. oleracea* utilizate în tratamentul semințelor, au redus severitatea bolii de la 70% pentru martorul infectat, netratat, la un procent de 43% în cazul plantelor tratate cu extracte vegetale (Bahraminejad, 2012).

Eficacitatea in vitro a extractului de plante conform invenției împotriva *Alternaria alternata*

Alternaria prezintă un gen de fungi cu numeroase specii, capabile de un mod de viață saprofit sau parazit. Speciile acestui gen pot afecta un număr mare de specii de plante de interes economic (tomate, grâu, sorg, orz, floarea-soarelui, rapiță, bumbac ș.a.), producând în acest fel pierderi importante de recoltă. Infectarea plantelor se poate produce atât în câmp, cât și în condiții de solar, în toate etapele de dezvoltare ale plantelor, astfel că pentru combatere sunt necesare tratamente specifice, costisitoare și potențial toxice pentru mediu.

Alternaria alternata provoacă pătarea frunzelor și mană pe o mare varietate de culturi agricole și horticoale, cum ar fi: tomate (*Lycopersicon esculentum*), cartofi (*Solanum tuberosum*), morcovi (*Daucus carota*), conopidă (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), brocoli (*Brassica oleracea* - *Botrytis* Group), varză (*Brassica oleracea* var. *capitata*), ardei (*Capsicum annuum*.), fasole (*Pisum sativum*), măr (*Malus domestica*), piersic (*Prunus persica*) și specii de citrice. Mai mult decât atât, *A. alternata* poate ataca specii de buruieni și plante ornamentale. De asemenea, *Alternaria sp.* reprezintă un microorganism cu importantă medicală, existând fără îndoială ipoteza conform căreia sensibilitatea la *Alternaria* reprezintă un factor declanșator în inducerea rinitei alergice și a astmului la pacienții imunodeprimați, în special la copii (Kuna și colab., 2011).

Pentru testarea efectelor inhibitoare ale extractului de plante conform invenției asupra dezvoltării miceliului de *Allernaria alternata* s-a utilizat metoda încorporării formulei în mediul de cultură, iar incubarea și urmărirea efectelor tratamentelor s-au derulat pe parcursul a zece zile.

Extractul de plante conform invenției a prezentat potențial antifungic împotriva lungului testat, demonstrat prin inhibarea creșterii miceliului.

Utilizarea extractul de plante conform invenției, încorporat în mediul PDA a condus la inhibarea 35% a dezvoltării miceliului de *A. alternata*. În ceea ce privește dinamica de inhibare a dezvoltării miceliene s-a observat o dezvoltare lentă a miceliului, comparativ cu martorul netratat (fig. 5). Astfel, începerea dezvoltării miceliului a întârziat cu patru zile față de martor atunci când s-a utilizat extractul de plante conform invenției. Rezultatele înregistrate la sfârșitul perioadei de incubare (9 zile) au evidențiat faptul că extractul de plante conform invenției a redus creșterea radială a *A. alternata* la 58 mm, față de controlul netratat 90 mm, după cum se poate observa în fig. 4.

În ultimul deceniu, cercetările asupra proiectării și dezvoltării unor produse botanice pentru a controla patogenii fungici au crescut simțitor. Diferite extracte din plante în special extracte alcoolice și apoase, au fost evaluate *in vitro* împotriva lungilor din genul *Alternaria*, precum *Alternaria alternata* (Carvalho și colab., 2011), *Alternaria solani* (Yusuf și colab., 2011) și *Alternaria sesami* (Zaker, 2013). Rezultate promițătoare au fost obținute pe specii de: *Artemisia annua*, *Cariniana estrelensis*, *Ficus carica* și *Ruta graveolens* (Carvalho și colab., 2011), *Crotalaria trichotoma* (36,6%), *Citrus aurantifolia* (27,3%), *Azadirachta indica* (23,7%), *Polyalthia longifolia* (23,3%), *Datura metel* (21,3%), *Muntingia calabura* (20,09%) și *Oxalis latifolia* (20,09%) (Ravikumar și colab., 2013), *Mentha piperita*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Lavandula officinalis* (Zaker, 2013).

Extracte și uleiuri esențiale din *Rosmarinus officinalis* și *Artemisia absinthium* sunt folosite în scopuri medicinale pentru tratarea infecțiilor bacteriene și fungice (Bozin și colab., 2007, Ahameethunisa și colab., 2010). Pelinul este folosit în mod tradițional ca antihelmintic, antiseptic, antispastic și pentru dizenterie bacilară, tipuri de cancer și boli neurodegenerative (Joshi, 2013). Efectele antimicrobiene ale extractelor din diferitele specii de pelin au fost evidențiate față de o gamă diversă de agenți fitopatogeni, autorii prezentând și compoziția chimică a acestor extracte și metodele de studiu folosite (Felicio și colab., 2012). Există mai multe studii asupra activității antifungice a speciilor de *Artemisia* împotriva *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotinia sclerotiorum* (Kordali și colab., 2005) (Meepagala și colab., 2003) (Tang și colab., 2000) (Wang și colab., 2006). (Badea și colab., 2014).

Rezultatele obținute de (Zaker, 2013) au evidențiat acțiunea antifungică asupra *Alternaria sesami* a unor extracte din ciumăfaie și menta. La concentrație de 5% în mediu, diametrul miceliului a atins 65,6 mm pentru *D. stramonium*, comparativ cu menta 15 mm și Mancozeb 0 cm, în timp ce la 15% concentrație, diametrul miceliului de pe placa tratată cu extract din datura a ajuns la 2,16 cm, iar pentru cel din mentă a avut activitate fungitoxică similară fungicidului utilizat.

Stabilirea impactului extractului de plante conform invenției asupra procesului de germinație

În vederea testării capacității de germinație a semințelor de tomate (*Solanum lycopersicum*) în sol infectat cu *R. solani* a fost luate în considerare un eșantion de 100 de semințe. Drept probe martor pentru compararea rezultatelor au fost folosite 3 variante: martor de semințe tratate doar cu apă distilată, neinfectate; martor de semințe tratate cu apă distilată dar infectate cu *R. solani* și martor de semințe tratate cu fungicidul Merpan 80 WDG,

infectate cu fitopatogenul de interes. La 5 zile după inoculare și incubare în condiții optime de temperatură și umiditate, semințele de tomate au fost evaluate din punct de vedere al capacității de germinare (tabelul 2).

Evaluarea capacității de germinare a semințelor tratate cu extractul de plante conform invenției

Tabelul 2

Proba	Scor din evaluare	Procent germinare (%)
Extract de plante conform invenției	161	92
Control netratat	471	20
Control neinfestat	123	95
Merpan 80 WDG	145	93

Germinarea semințelor netratate și semănate în sol infectat cu *R. solani* a fost puternic inhibată, doar 20% dintre semințe germinând, dar ele au prezentat în plus și semne de infecție, cu radiculă putrezită.

Rezultatele obținute în cazul tratamentului cu extractul de plante conform invenției a confirmat eficiența de inhibare a creșterii miceliului, obținută anterior *in vitro*, pe mediu de creștere PDA. Semințele tratate cu extractul de plante conform invenției au prezentat o capacitate de germinare bună, superioară controlului netratat. Scorul obținut în urma evaluării a fost de 1,53 (fig. 6). Capacitatea de germinare a semințelor a fost de 92% foarte apropiată de valoarea înregistrată în cazul matorului neinfestat.

Efectului protector al tratamentului la sămânță cu extractul de plante conform invenției a fost examinat și prin urmărirea dimensiunii și aspectul plantulelor rezultate din semințe tratate pe sol infectat cu *R. solani*. În urma evaluării s-a constatat faptul că în general tratamentul cu extractul de plante conform invenției a avut un efect benefic asupra germinației semințelor și a creșterii plăntuțelor de tomate.

Semințele de tomate au fost tratate cu extractul de plante conform invenției, prin imersare timp de 5 min sau 10 min. Deși au fost observate rezultate mai bune în cazul tratamentului timp de 10 min, nu există diferențe majore între cele două variante.

După măsurarea tulpinii plăntuțelor, s-a constatat o dimensiune maximă a acestora în cazul tratamentului cu extractul de plante conform invenției, prin imersie pentru 10 min, și anume, $9,61 \pm 0,47$ cm iar pentru tratamentul, timp de 5 min, și anume, $9,22 \pm 1,05$ cm. Dimensiunile tulpinilor în cazul tratamentului cu fungicide au fost superioare tratamentului cu extractul de plante conform invenției, și anume, $10,63 \pm 0,44$ cm, nedepășind însă rezultatele pentru controlul neinfestat (fig. 7).

După examinarea dimensiunii rădăcinilor, și a numărului și aspectului acestora, se confirmă efectul benefic al tratamentului cu extractul de plante conform invenției al semințelor de tomate, însă rezultatele obținute nu depășesc efectul fungicidului utilizat (fig. 8).

Există în literatura de specialitate teste similare cu privire la evaluarea efectului benefic al unor extracte din plante asupra capacității de germinare a semințelor unor plante, în prezența inoculului de *R. solani*. Al-Rubaiee a realizat o serie de experimente pentru a determina efectul *R. solani* asupra germinării semințelor de bumbac și controlul infectării acestora prin folosirea unor extracte vegetale (Al-Rubaiee, 2008). Rezultatele au arătat ca șase din zece izolate ale ciupercii *R. solani* au suprimat complet germinarea semințelor, iar

1 pentru celelalte izolate, procentul de germinare a semințelor a variat între 16-95%. Controlul
 3 *R. solani* a fost testat prin utilizarea unei pulberi de conopidă (*Brassica oleracea botrytis*) în
 concentrație de 2%. Acesta a inhibat cu 50% creșterea *in vitro* a miceliului de *R. solani*. Alte
 5 extracte cu rezultate notabile au fost extractul din coaja de rodie (*Punica granatum*) și fructe
 de castravete amar (*Citrullus colocynthis*), cu o inhibare a creșterii miceliene de 75 și 50%.
 7 Trecând la testarea capacității de germinare a semințelor de bumbac, rezultatele au
 demonstrat ca tratamentul cu extracte în alcool obținute din conopidă a avut efecte benefice
 9 asupra germinării semințelor, obținând un procent de germinare cu 50% mai mare decât
 celelalte tratamente (Al-Rubaiee, 2008).

Concluzii

11 Datorită problemelor de natură economică, tehnică și de mediu, cât și reglementărilor
 legale în vigoare, combaterea și controlul fitopatogenilor este o sarcină dificil de realizat, și,
 13 prin urmare, formulările naturale complementare reprezintă o soluție.

Extractul de plante conform invenției a evidențiat o activitate antifungică ridicată
 15 împotriva fitopatogenilor *A. alternata*, *R. solani*, *P. infestans* și *Pythium sp.*

Testarea efectelor extractului de plante conform invenției pe sistem vegetal a permis
 17 evidențierea faptului că în general, acesta oferă un grad ridicat de protecție față de infecția
 fungică, apropiat de efectul unor fungicide consacrate.

19 În urma desfășurării testelor de germinație au fost evaluate mai multe variante
 experimentale: trei variante martor (controlul pozitiv reprezentat de semințe netratate
 21 menținute în sol neinfestat; controlul negativ reprezentat de semințelor netratate în sol infec-
 tat; semințelor tratate cu fungicid semănate în sol infectat) și varianta tratată corespunzător
 23 cu extractul de plante conform invenției.

Extractul de plante conform invenției a prezentat efecte benefice asupra semințelor
 25 tratate și semănate în sol inoculat cu *R. solani*. Scorul de evaluare de 1,53 și comparativ cu
 fungicidul utilizat cu un scor de 1,45, înseamnă că formula SAT nu numai că a asigurat un
 27 procent ridicat de germinare a semințelor tratate ci, în plus, a determinat un grad ridicat de
 protecție față de infecția cu *R. solani*. Rezultatele obținute permit concluzia că extractul de
 29 plante conform invenției ar putea fi utilizat ca tratament preventiv de biocontrol pentru
 prevenirea infecțiilor cu *R. solani*, la nivel de sol.

Bibliografie

33 Abd-El-Khair, H. and G. El-Gamal Nadia, 2011. "Effects of aqueous extracts of some
 35 plant species against *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris* plants." Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44(1): 1-16.

37 Agrios G., 2005. Plant Pathology. United States of America, Elsevier Academic Press.

39 Ahameethunisa A. and W. Hopper, 2010, "Antibacterial activity of *Artemisia nilagirica*
 leaf extracts against clinical, and phytopathogenic bacteria." BMC Complementary and
 41 Alternative Medicine 10(1): 6.

Al-Rubaiee H. A., 2008. "Effect of *rhizoctonia solani* on cotton seed germination and
 43 its control by using some plant extract", The Iraqi Journal of Agricultural Science 39(5): 25-37.

45 Al-Sheikh H., 2010, "Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermalum* and *P. diclinium* from a wheat field", Sandi Journal of Biological Sciences, 17(4): 347-352.

47 Altier N. A. and J. A. Thies 1994, "Identification of Resistance to *Pythium* Seedling Diseases in Alfalfa Using a Culture Plate Method", Plant Disease 79: 341 -346.

- Badea M. L. and E. Delian, 2014, "*In vitro antifungal activity of the essential oils from Artemisia spp. L. on Sclerotinia sclerotiorum*", Rom. Biotech. Lett. 19(3): 9345-9352. 1
- Bahraminejad S., 2012. "*In vitro and in vivo antifungal activities of Iranian plant species against Pythium aphanidermatum*", Annals of Biological Research 3(5): 2134-2143. 3
- Bozin B., N. Mimica-Dukic, I. Samojlik and E. Jovin, 2007, "*Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L. Lamiaceae) essential oils*", Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(19): 7879-7885. 5
- Carabet A., I. Grozea R. Stefand A.-M. Badea, 2009. "*The control potential of some Plant Extracts against Downy Mildew in Tomato*", International Symposium on Agriculture, Proceedings of Conference: 45-48. 7
- Cărăbeș A. F. and K. F. Lauer, 2006. "*Studies concerning the mobility of the active svbstance obtained from the extract of Paeonia suffruticosa in the patho-system Pseudoperonospora cubensis/Cucumis sativus*", Lucrări Științifice - Agronomie, Iași 49. 11
- Carvalho I. S., T. Cavaco and M. Brodelius, 2011, "*Phenolic composition and antioxidant capacity of six artemisia species*", Industrial Crops and Products 33(2): 382-388. 13
- Castillo F., D. Hernandez, G. Gallegos, M. Mendez, R. Rodriguez, A. Reyes and C. N. Aguilar, 2010, "*In vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against Rhizoctonia solani Kuehn*", Industrial Crops and Products, 32(3 (Nov 2010)): 324-328. 15
- Dushyent G. and A. Bohra, 1997. "*Effect of extracts of some halophytes on the growth of Alternaria solani*", Journal of Mycological Plant Pathology, 27: 233. 17
- Felicio J. D., L. Soares and R. Felicio. 2012, "*Artemisia Species as Potential weapon against agents and agricultura/pests*", Current Biotechnology, 1: 249-257. 19
- Fry W. E. and S. B. Goodwin, 1997, "*Re-emergence of Potato and Tomato Late Blight in the United States*", Plant Disease 81(12): 1349-1357. 21
- Horner N. R., L. J. Grenville-Briggs and P. van West, 2012, "*The oomycete Pythium oligandrum expresses putative effectors during mycoparasitism of Phytophthora infestans and is amenable to transformation*", Fungal Biology, 116(1): 24-41. 23
- Huang X., N. Zhang, X. Yong, X. Yang and Q. Shen, 2012, "*Biocontrol of Rhizoctonia solani damping-off disease in cucumber with Bacillus pumilus SQR-N43*", Microbiological Research, 167(3): 135-143. 25
- Iacomini B., I. Dobrin, R. Ciceoi and M. Călin, 2006, "*Extractele vegetale - alternativă nepoluantă în controlul agenților patogeni și al dăunătorilor*", Lucrări științifice Agronomie, USAMVB XLIX(A). 27
- Joshi R. K., 2013, "*Volatile composition and antimicrobial activity of the essential oil of Artemisia absinthium growing in Western Ghats region of North West Karnataka, India*", Pharmaceutical Biology, 51(7): 888-892. 29
- Kordali S., R. Kotan, A. Mavi, A. Cakir, A. Ala and A. Yildirim, 2005. "*Determination of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oil of Artemisia dracunculus and of the Antifungal and Antibacterial Activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum, and Artemisia spicigera Essential Oils*", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(24): 9452-9458. 31
- Kuna P., J. Kaczmarek and M. Kupezyk, 2011, "*Efficacy and safety of immunotherapy for allergies to Alternaria alternata in children*", Journal of Allergy and Clinical Immunology, 127(2): 502-508. 33
- Le D. P., M. Smitll, G. W. Hudler and E. Aitken, 2014. "*Pythium soft rot of ginger; Detection and identification of the causal pathogens, and their control*", Crop Protection 65: 153-167. 35

- 1 Mares D., B. Tosi, F. Poli, E. Andreotti and C. Romagnoli, 2004. "Antifungal activity
of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on
3 *Pythium ultimum*", Microbiol Res, 1, 59(3): 295-304.
- 5 Meepagala K., J. Kuhajek, G. Sturtz and D. Wedge, 2003. "Vulgarone B. the
Antifungal Constituent in the Steam-Distilled Fraction of *Artemisia douglasiana*", Journal of
Chemical Ecology, 29(8): 1771-1780.
- 7 Muthukumar A., A. Eswaran, S. Nakkeeran and G. Sangeetia, 2010. " Efficacy of
plant extracts and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* inciting chili damping-
9 off", Crop Protection 29(12): 1483-1488.
- 11 Ogbabor, O. N. and A. T. Adekunle, 2008. "Inhibition of *Drechslera heveae* (Petch)
M. B. Ellis, causal organism of Bird's eye spot disease of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell
Arg.) using plant extracts", African Journal of General Agriculture 4(1): 19-26.
- 13 Ohkura M., G. S. Abawi, C. D. Smart and K. T. Hodge, 2009, "Diversity and
Aggressiveness of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-like Fungi on Vegetables in New
15 York", Plant Disease 93(6): 615-624.
- 17 Phalsteen S., S. Ishaq, K. Amardeep, J. Arif and S. Sami. 2008, "Evaluation studies
of some medicinal plant extracts and fungicides against *Alternaria solani*", African Journal
of Clinical and Experimental Microbiology, 9(1): 19-25.
- 19 Plodpai P., S. Chuenchitt, V. Petcharat, S. Chakthong and S. P. Voravuthikunchai,
2013. "Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of
21 action", Crop Protection, 43: 65-71.
- 23 Ravikumar M. C. and R. H. Garampalli, 2013. "Antifungal activity of plants extracts
against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato", Archives of
Phytopathology and Plant Protection, 46(16): 1897-1903.
- 25 Ristaino J. B., C. T. Groves and G. R. Parra, 2001. "PCR amplification of the Irish
potato famine pathogen from historic specimens", Nature, 411(6838): 695-697.
- 27 Ritchie F., R. Bain and M. McQuilken, 2013. "Survival of *Sclerotia* of *Rhizoctonia*
solani AG3PT and Effect of Soil-Borne Inoculum Density on Disease Development on
29 Potato", Journal of Phytopathology, 161(3): 180-189.
- 31 Sallam N. M. A., 2011, "Control of Tomato Early Blight Disease by Certain Aqueous
Plant Extracts", Plant Pathology Journal, 10(4): 187-191.
- 33 Sehajpal A., S. Arora and P. Kaur, 2009. "Evaluation of plant extracts against
Rhizoctonia solani causing sheath blight of rice", The Journal of Plant Protection Sciences,
1(1): 25-30.
- 35 Şesan T. E., E. Enache, B. M. Iacomì, M. Oprea, F. Oancea and C. Iacomì, 2015.
"Antifungal activity of some plant extracts against *botrytis cinerea* pers. in the blackcurrant
37 crop (*Ribes nigrum* L.)". Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus 14(1): 29-43.
- 39 Smith J. D., K. K. Kidwell, M. A. Evans, R. J. Cook and R. W. Smiley, 2003.
"Assessment of Spring Wheat Genotypes for Disease Reaction to AG-8 in Controlled
Environment and Direct-Seeded Field Evaluations". Crop Science, 43(2): 694-700.
- 41 Sneha B., S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst, 1996. *Rhizoctonia* Species:
Taxonomy Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Netherlands. Kluwer
43 Academic Publishers.
- 45 Tang H. Q., J. Hu, L. Yang and R. X. Tan. 2000. "Terpenoids and flavonoids from
Artemisia species", Planta Medica, 66(4): 391-393.
- 47 Wang L. and C. L. Weller, 2006. "Recent advances in extraction of nutraceuticals
from plants", Trends in Food Science & Technology, 17(6): 300-312.

RO 132518 B1

Wszelaki A. L. and S. A. Miller, 2005. " <i>Determining the Efficacy of Disease Management Products in Organically-Produced Tomatoes</i> ", Plant Management Network. Plant Health Progress.	1 3
Yusuf Y., I. Kadioglu, A. Gokce, L. Demirtaş, N. Goren, H. Cam and M. Whalon, 2011. " <i>In vitro antifungal activities of 26 plant extracts on mycelial growth of Phytophthora infestans (Mont.) de Bary</i> ", African Journal of Biotechnology, 10(14): 2625-2629.	5
Zaker M., 2013, " <i>Screening Some Medicinal Plant Extracts Against Alternaria sesami, the Causal Agent of Alternaria Leaf Spot of Sesame</i> ", Journal of Ornamental Plants 3(1): 1-8.	7 9

RO 132518 B1

1

Revendicare

3

Extract de plante cu efect antimicrobian asupra unor patogeni ai tomatelor obținut prin macerare și ultrasonicare **caracterizat prin aceea că**, este constituit din: 30...50 părți

5

Artemisia absinthum, 25...40 părți *Salvia officinalis* și 15...25 părți *Solanum lycopersicum*.

(51) Int.Cl.

A01N 65/00 (2006.01),

A01N 65/12 (2009.01)

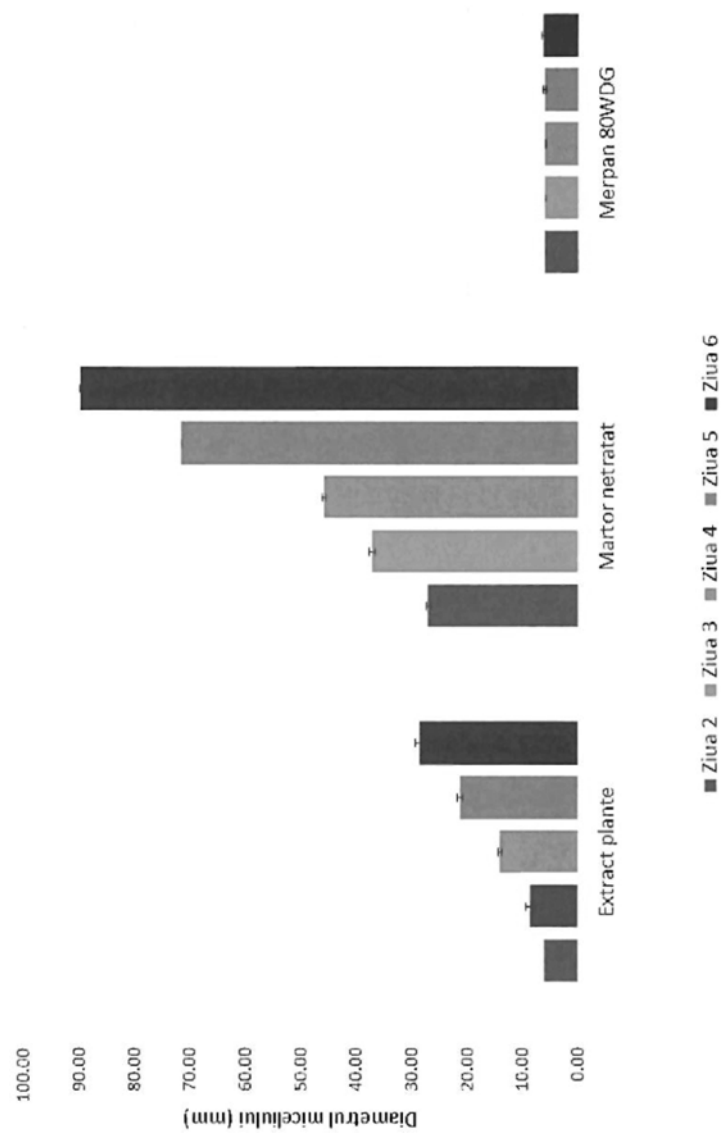


Fig. 1

(51) Int.Cl.

A01N 65/00 (2006.01),

A01N 65/12 (2009.01)

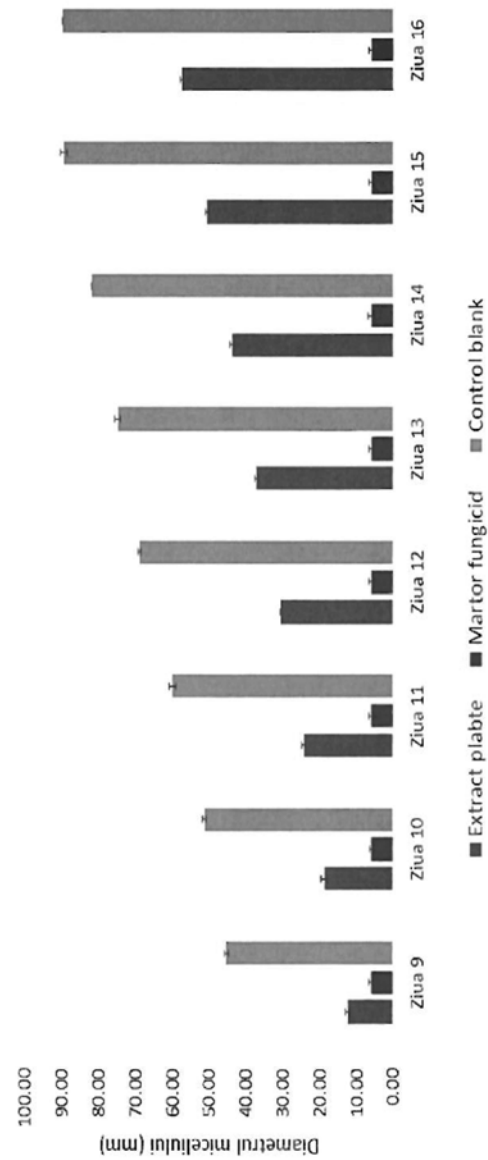


Fig. 2

(51) Int.Cl.

A01N 65/00 (2006.01),

A01N 65/12 (2009.01)

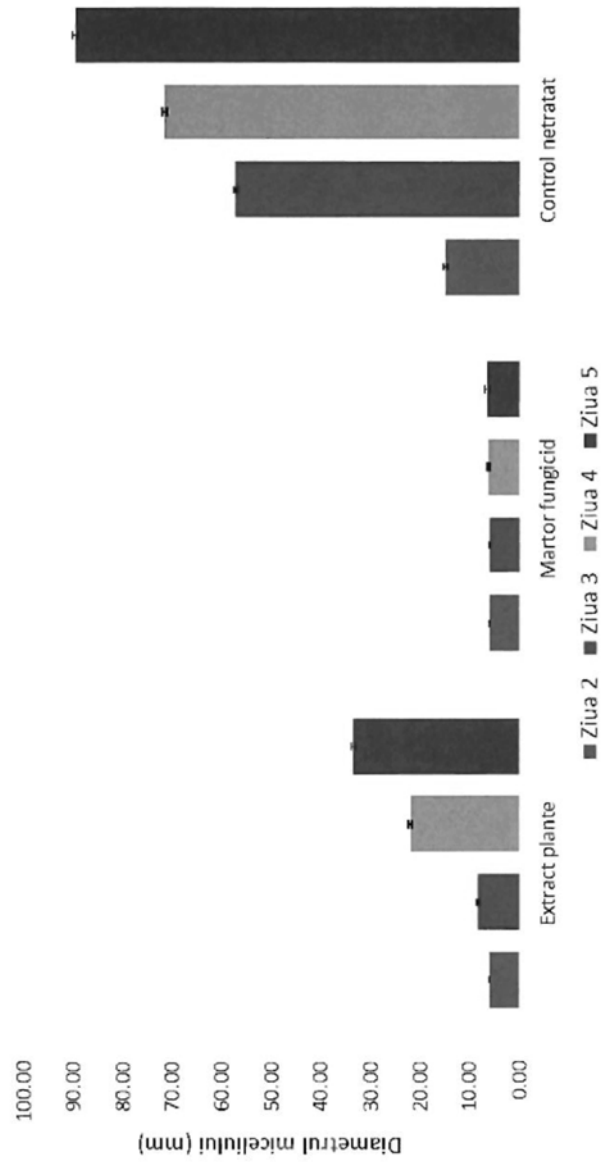


Fig. 3

(51) Int.Cl.

A01N 65/00 (2006.01),

A01N 65/12 (2009.01)

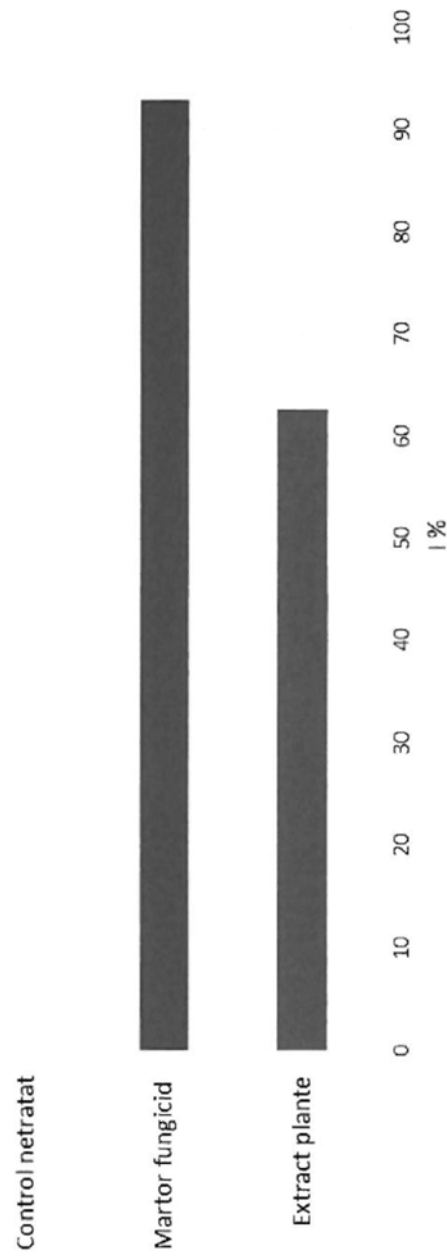


Fig. 4

(51) Int.Cl.

A01N 65/00 (2006.01),

A01N 65/12 (2009.01)

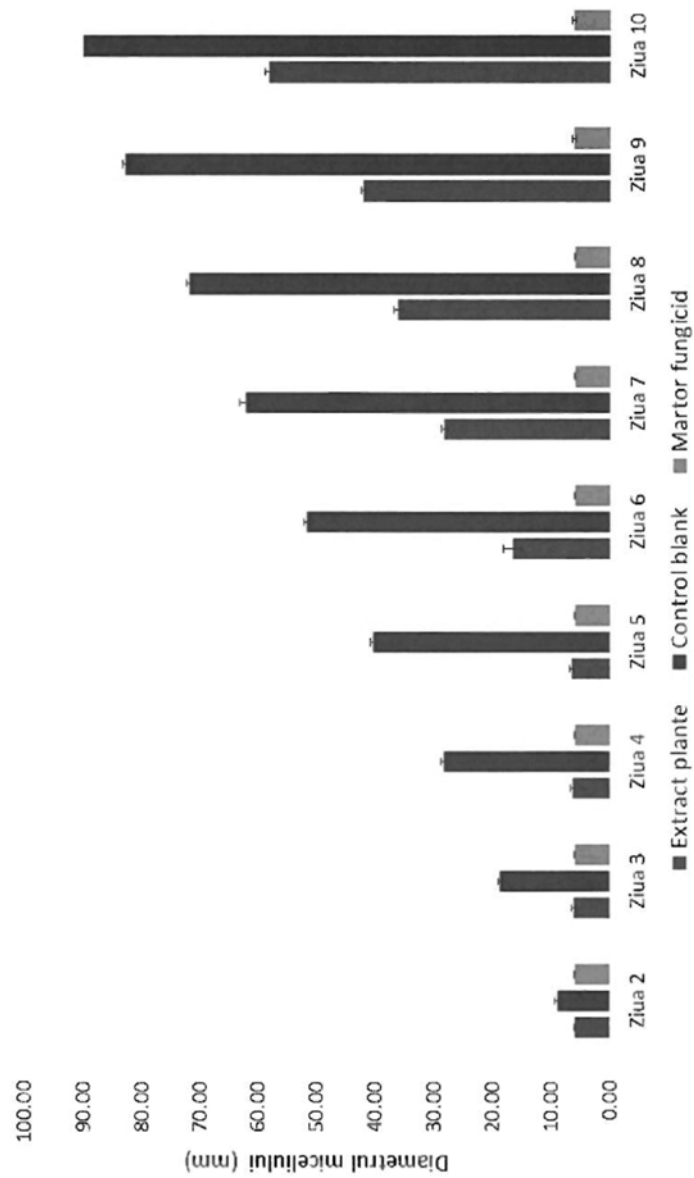


Fig. 5

(51) Int.Cl.

A01N 65/00 (2006.01),

A01N 65/12 (2009.01)

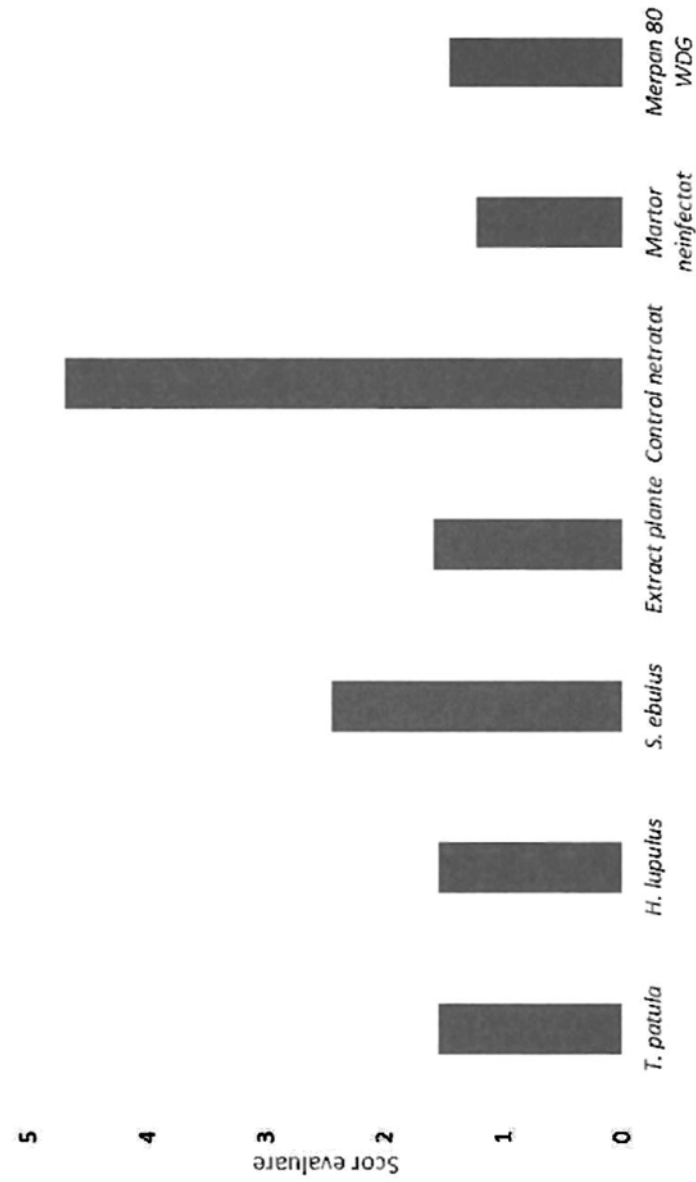


Fig. 6

(51) Int.Cl.

A01N 65/00 (2006.01),

A01N 65/12 (2009.01)

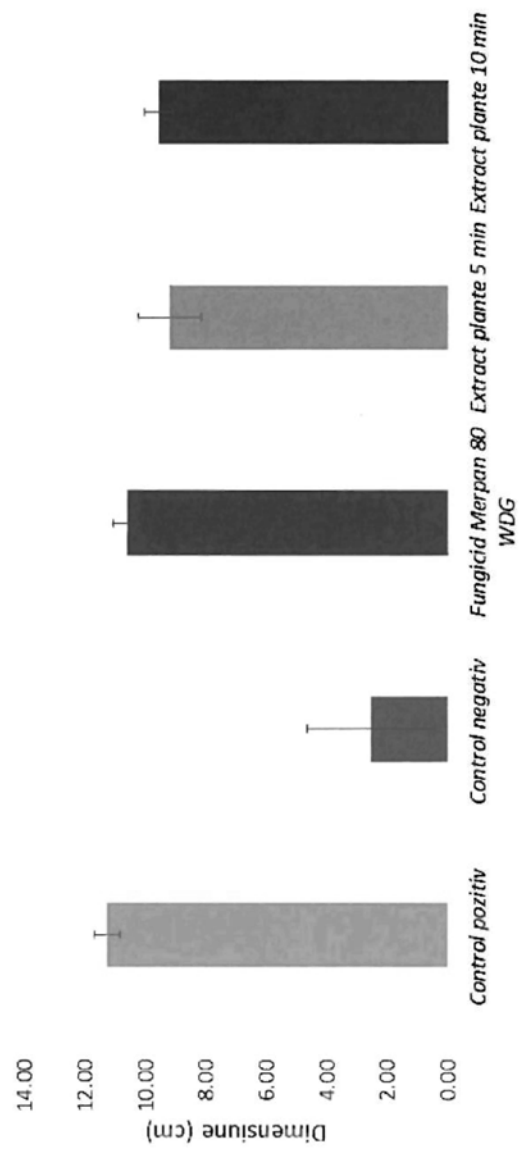


Fig. 7

(51) Int.Cl.

A01N 65/00 (2006.01),

A01N 65/12 (2009.01)

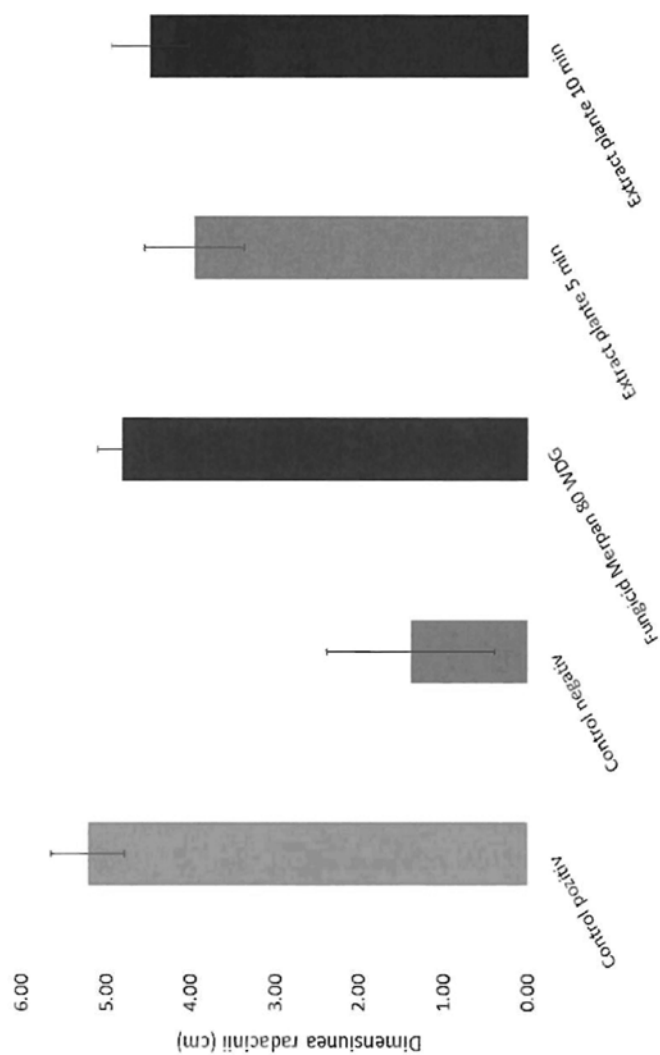


Fig. 8

