

BİTKİ PATOJENİ *Alternaria tenuissima*'ya KARŞI BAZI BİTKİ EKSTRAKTLARININ *IN VITRO* ETKİNLİĞİ

Seda BALKAN^{1*}, Bilal BALKAN¹

¹Department of Molecular Biology and Genetic, Science and Art Faculty, Kırklareli University, Kırklareli, Türkiye

Öz

Fırsatçı bir bitki patojeni olan *Alternaria tenuissima* gıda ürünlerinin kalitesini ve miktarını düşürmektedir. Bu çalışmada Lamiaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Papaveraceae familyalarına ait Kırklareli'nde (Türkiye) doğal olarak yetişen endemik olmayan 16 bitki türü *A. tenuissima*'ya karşı *in vitro* antifungal aktiviteleri açısından ilk kez tarandı. Lamiaceae familyasına ait *Origanum vulgare* ve *Thymus longicaulis*, *A. tenuissima*'nın misel büyümesini sırası ile %100 ve %82.87'lik oranlarda inhibe etti. *A. tenuissima*'ya karşı en düşük MİK değerine (250 µg/mL) *O. vulgare* sahipti. SEM analizinde *A. tenuissima*'nın hifal yapısı üzerine *O. vulgare* ve *T. longicaulis*'in çökertme, yassılaştırma, kırışık hücre yüzeyli hücreler ve lizis etkileri gözlemlendi. Sonuç olarak, *A. tenuissima*'nın neden olduğu enfeksiyonları önlemek için *O. vulgare* ve *T. longicaulis* ekstreleri doğal bir antifungal madde olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *Alternaria tenuissima*, bitki patojeni, antifungal, bitki ekstraktı

IN VITRO EFFICIENCY OF CERTAIN PLANT EXTRACTS AGAINST THE PLANT PATHOGEN *Alternaria tenuissima*

Abstract

The opportunistic plant pathogen *Alternaria tenuissima* reduces the quality and quantity of food products. In this study, for the first time, 16 non-endemic plant species belonging to Lamiaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Papaveraceae families that grow naturally in Kırklareli (Turkey) were screened for their *in vitro* antifungal activities against *A. tenuissima*. *Origanum vulgare* and *Thymus longicaulis* belonging to Lamiaceae family inhibited mycelial growth of *A. tenuissima* by 100% and 82.87%, respectively. *O. vulgare* had the lowest MIC value (250 µg/mL) against *A. tenuissima*. In SEM analysis, collapsing, flattening, rough cells and lysis effects of *O. vulgare* and *T. longicaulis* on hyphal structure of *A. tenuissima* were observed. As a result, in order to avoid infections caused by *A. tenuissima*, extracts of *O. vulgare* and *T. longicaulis* can be used as a natural antifungal agent.

Keywords: *Alternaria tenuissima*, plant pathogen, antifungal, plant extract

*Sorumlu Yazar: Seda BALKAN, balkan.seda@hotmail.com

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun en büyük geçim kaynaklarından biri şüphesiz tarımdır. Tarım ürünlerinde bitki patojenlerinin neden olduğu hasar, yetiştiricilerin gelirinde önemli azalmalara neden olmakla birlikte bitki hastalıkları yüzünden gıda güvenliği tehdit edilmekte ürünlerin kalitesi ve miktarı düşmektedir.

Alternaria tenuissima saprofitik bir küf türü ve fırsatçı bir bitki patojenidir. *A. tenuissima*, birçok ülkede çeşitli çevresel koşullarla yayılan farklı bitki konaklarında yaygın olan kozmopolit bir türdür [1]. Genellikle yaban mersini [2], domates, asma, çilek ve birkaç tahıl türü üzerinde kolonize olurlar [3-4]. Ayrıca *A. tenuissima*'nın dut ağaçlarının budanmış dallarında meydana getirdiği enfeksiyonlar yaprakların kalitatif ve kantitatif verimini dolaylı olarak etkilediği rapor edilmiştir [5]. *A. tenuissima* normalde bitkilerin fırsatçı bir patojeni olmasının yanı sıra, bağışıklığı baskılanmış kişilerde nadir görülen cilt enfeksiyonlarına neden olduğu da bildirilmiştir [6-7].

Bitkilerde küflerin neden olduğu hastalıkları kontrol etmek için kullanılan en yaygın yöntem, sentetik fungusit uygulamasıdır. Bu amaç için pek çok sentetik fungusit geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Fakat bu fungusitlerin çoğunun kullanımı; yüksek ve akut toksisite, uzun degradasyon periyodları, gıda zincirindeki konsantrasyonları, küçük miktarlarının sürekli alınımı ile kronik zehirlenme tehlikeleri gibi istenilmeyen yan etkileri yüzünden sınırlandırılmıştır [8]. Sentetik kimyasallara karşı küflerin direnç kazanması fungusitlerin etkili kullanımlarında sorunlar oluşturmaktadır [9]. Bu sorunlar yeni ürün koruma metotlarını ve seçici kontrol alternatifleri ihtiyacını ortaya çıkarmıştır [10].

Bitkilerin tipik özelliği nitrojenden bağımsız ve nitrojen içerikli bileşikleri içeren ikincil metabolitleri üretmesidir. Pek çok durumda bu ikincil metabolizma ürünleri mikroorganizmalar, böcekler ve otoburlar tarafından yapılan saldırılara karşı bitki savunma mekanizması olarak etki gösterirler. Yüksek yapılı bitkiler tarafından üretilen bu ürünler nispeten geniş spektrumlu, biyolojik olarak etkili, ekonomik, muhtemelen insanlar ve çevre için güvenilir olduğundan dolayı tarım kimyasallarına alternatif olarak kullanılabilirler [11].

Bu çalışmada Lamiaceae familyasına ait 8, Asteraceae familyasına ait 6, Caprifoliaceae familyasına ait 1, Papaveraceae familyasına ait 1, toplam 16 bitki türü *A. tenuissima*'ya karşı *in*

vitro etkinliği açısından değerlendirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Mikroorganizma

Alternaria tenuissima Trakya Üniversitesi Arda Meslek Yüksekokulu mikrofungus koleksiyonundan temin edilmiştir. Saf kültür, canlılığı devam ettirmek üzere yatık agarlı Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerlerinde +4°C'de muhafaza edilerek ayda bir pasajlanmıştır.

2.2. Bitki ekstraktlarının hazırlanması

Çalışma materyali olarak kullanılan bitki örnekleri Kırklareli'nin (Türkiye) farklı lokasyonlarından (Merkez, Dereköy çıkışı, Yörükbayır-Armağan arası, Armağan köyü-baraj civarı) toplanmıştır. Örneklerin tamamı Dr. Hüseyin ERSOY tarafından teşhis edilmiş ve Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi herbaryum laboratuvarında depolanmıştır. Lamiaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Papaveraceae familyalarına ait 16 bitki türüne ait örneklerin gövde ve çiçek kısımları direk güneş ışığı almayacak bir alanda gölgede kurutuldu. Kurutulan örnekler laboratuvar tipi öğütücü (Grinding mill, A11 basic) ile öğütülerek toz haline getirildi ve kullanıma kadar +4°C'de muhafaza edildi. Bitki tozlarının 10 gr'ı 10 dk. süre ile çalkalanarak kaynayan distile suyun 100 mL'sinde demleme ile ekstrakte edildi. Whatman No 1 filtre kağıdı ile filtre edilen sulu ekstraktlardan elde edilen filtrat, liyofilize edildi ve kullanıma kadar -20°C'de saklandı. Deneylerde kullanılan sulu bitki ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonları, liyofilize ekstraktların uygun ağırlığının distile suda çözülmesi ile hazırlandı [12].

2.3. *Alternaria tenuissima*'nın misel büyümesi üzerine bitki tozlarının *in vitro* etkisi

Bitki tozlarının antifungal aktivitesi agardilüsyon metodu ile test edildi. 10 gr bitki tozu 40°C' de eritilmiş 100 mL PDA'ya eklendi. Oluşan süspansiyon 10 dk. karıştırılarak 121°C'de 15 dk. otoklavlandı. Daha sonra steril 4 katlı gazlı bezden süzülerek 9 cm çapındaki petri plaklarına 15 mL olacak şekilde döküldü [13]. Bitki tozu içermeyen PDA besiyeri kontrol olarak kullanıldı. Soğuduktan sonra petri plaklarına, PDA besiyerinde aktif olarak büyüyen bir haftalık kültürün aktif büyüme ucundan steril mantar delici ile alınan 7 mm çapındaki küf içeren diskler hemen

petri plaklarının merkezine konularak aseptik olarak aşılandı. 25°C'de 5 gün inkübe edildi. Misel büyüme inhibisyonu (MBİ) = $[(dc-dt)/dc] \times 100$ formülünden hesaplandı (dc; kontrolün misel büyüme çapını, dt; bitki tozlu besiyerinin çapını ifade etmektedir) [10]. Tüm deneyler 3 kez tekrarlandı ve sonuçların ortalaması standart sapmalı olarak belirtildi. Antifungal aktivitelere göre %80 üzeri MBİ gösteren bitkilerin ekstraktları ile diğer çalışmalara devam edildi.

2.4. Bitki ekstraktlarının Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) larının belirlenmesi

A. tenuissima küfüne karşı sulu bitki ekstraktının antifungal aktivitesini belirlemek için mikrodilüsyon testleri 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirildi. Aşı süspansiyonları, PDA besiyerindeki 7 günlük *A. tenuissima* kültürünün yüzeyinden % 0,1 (v/v) Tween 80 içeren serum fizyolojik (% 0.85) ile alınarak hazırlandı. Ağır partiküllerin çökmesi için 5 dakika beklendikten sonra üstteki homojen süspansiyon steril tüpe aktarıldı. Aynı zamanda aşı süspansiyonlarının 1:100 sulandırılmış halinin 0.01 mL'si PDA içeren petri kaplarına ekilerek mL' de koloni oluşturan birim (KOB) sayısı 4×10^3 - 5×10^4 KOB/mL spor olacak şekilde ayarlandıktan sonra sulu ekstraktların MİK değeri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) prosedürüne göre (Doküman M-38A, 2008'de M-38A2 olarak tekrar güncellenmiştir) belirlendi [14]. MİK değerleri morfolinopropansülfonik (MOPS) ile pH 7.0'ye tamponlanmış RPMI-1640 besiyerinde test edildi. Deneyde stok solüsyonun hazırlanması için ekstrakt (50 mg/mL) steril distile suda çözüldü. Hazırlanan bu stok solüsyondan 40 µL alınarak 960 µL RPMI-1640 ile mL'de 2 mg solüsyon elde etmek için dilue edildi. Bu hazırlanan yeni solüsyonun 200 µL'si ilk kuyucuğa döküldü. Daha sonra bu kuyucuktan 100 µL alınarak, 100 µL RPMI-1640 içeren bir sonraki kuyucuğa transfer edildi. Aynı işlemler sulu ekstraktın iki kat dilüsyonunu elde etmek için benzer şekilde diğer kuyucuklar içinde uygulandı. Ekstraktların son konsantrasyonları 1000-0,49 µg/mL aralığında olacak şekilde ayarlandı. Aşı süspansiyonundan 100 µL her bir kuyucuğa eklendi. Sterilite kontrolü için ilk kuyucuğa aşı süspansiyonu yerine 100 µL steril distile su eklendi [15]. Plaklar 7 gün süresince 25°C'de inkübe edildi [16]. MİK değeri görsel olarak, inkübasyondan sonra fungal büyümenin olmadığı en düşük konsantrasyon şeklinde belirlendi.

2.5. Hifal Morfoloji Üzerine Sulu Ekstraktların Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Gözlenmesi

7 günlük kültürden hazırlanan spor süspansiyonundan (10^4 spor/mL) PDA içeren petri plaklarının merkezine 10 µL damlatıldı ve 2 gün 25°C de inkübe edilerek misel büyümesi sağlandı. Daha sonra bitki ekstraktlarının 4 ve 8 kat minimum inhibitör konsantrasyonları (4MİK ve 8 MİK) petri plaklarının üzerini tamamen kapatacak şekilde damlatıldı. 3 gün 25°C de inkübe edilen fungal kültürlerden mantar delici ile yarıçapı 1 cm'lik misel diskler çıkarıldı. SEM analizi için bu misel diskler oda sıcaklığında 2 saat 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.2) içinde hazırlanmış %2.5'lik gluteraldehit ile fiske edildi. Daha sonra bu diskler 2 kez 10 ar dakika aynı tampon ile yıkandı. Fiksasyondan sonra örnekler her bir seri 30 ar dakikalık sürelerde dereceli olarak etanol serilerinden (% 70, 80, 90 ve üç kez % 100) geçirilerek dehidrasyona uğratıldı [10]. Örneklerin 5Kv voltajda SEM Quanta 400 kullanılarak dijital görüntüleri elde edildi.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. *Alternaria tenuissima*'nın Misel Büyümesi Üzerine Bitki Tozlarının *in vitro* Etkisi

A.tenuissima'ya karşı 4 botanik familyaya ait 16 bitki türünün tozlarının *in vitro* antifungal aktivitesi Tablo 1'de gösterildi. *In vitro* sonuçlarda bitkilerin tozuna (%10 v/w) *A. tenuissima*'nın cevabı değişkenlik gösterdi (Şekil 1). *A. tenuissima*'nın misel büyümesini 15 bitki türü % 15.08'den %100'e kadar değişen oranlarda inhibe etti. *Lactuca serriola* bitkisinin tozu ise *A.tenuissima*'nın misel büyümesine karşı inhibitör etki göstermedi. Misel büyümesini %100 inhibe eden bitki *Origanum vulgare* L. dir. Bu bitkiyi %82.87 lik inhibisyon oranı ile *Thymus longicaulis* takip etmektedir. Benzer bir çalışmada da *A. tenuissima*'nın misel büyümesini *Prosopis juliflora* ve *Lantana camara* ekstraktlarının sırası ile %81.2 ve %66.7 oranlarında inhibe ettiği rapor edilmiştir [17]. Fungal büyüme ve fungusun neden olduğu hastalığın şiddeti üzerine bitki ekstraktlarının etkisinin onların sekonder metabolitleri (fenolik, alkaloidler, flavonoidler ve terpenoidler gibi) yüzünden olabileceği rapor edilmiştir [18]. Bu durum göz önüne alınarak ve önceki benzer çalışmalarda da belirtildiği gibi [19-20-21], misel büyüme inhibisyonu gösteren bitkilerin potansiyel antifungal aktiviteye sahip olduğunu söyleyebiliriz. *In*

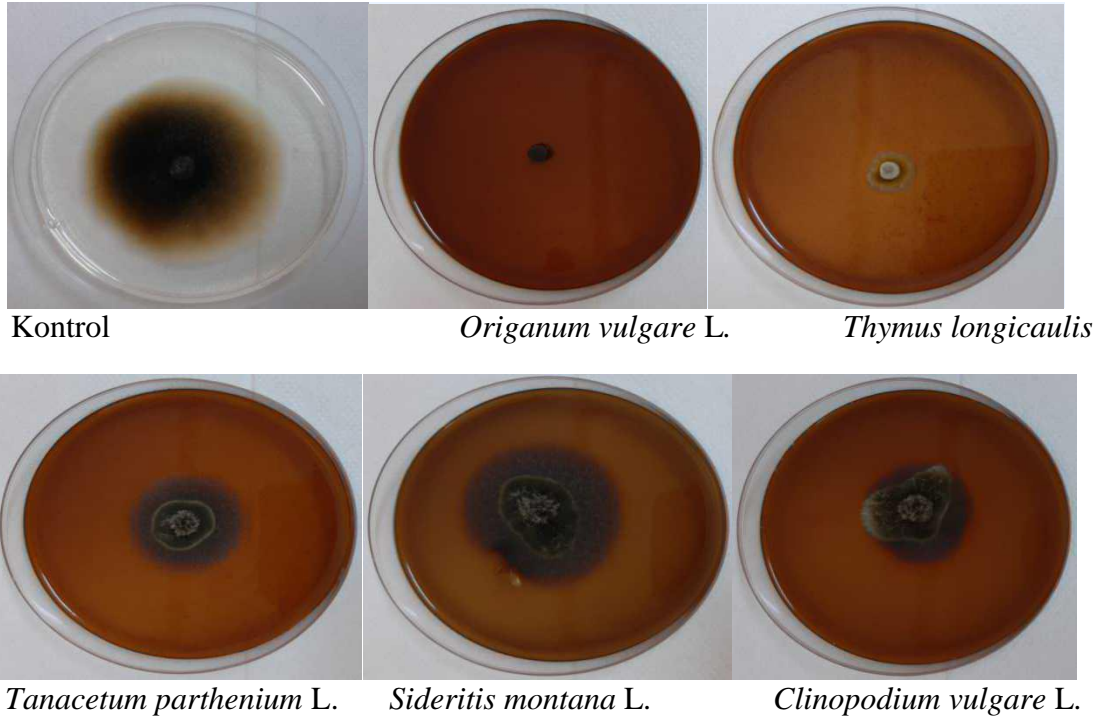
vitro sonuçlarımızda, % 80'in üzerinde misel büyüme inhibisyonu gösteren, *O. vulgare* ve *T. longicaulis* yapılacak araştırmaların daha kolay ve anlaşılabilir olması için bir sonraki çalışmalara alındı.

3.2. Bitki Ekstraktlarının Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) larının Belirlenmesi

Test edilen 16 bitki türünden *A. tenuissima*'ya karşı antifungal aktivitesi en yüksek olan *O. vulgare* ve *T. longicaulis* sulu ekstraktları için MİK değeri sırası ile 250 µg/mL ve 500 µg/mL idi. Yapılan benzer bir çalışmada *Caryophyllus aromaticus* ve *Allium sativum* su ekstraktlarının *A. tenuissima*'ya karşı MİK değerleri sırası ile 6.3 ve 25 mg/mL olarak rapor edilmiştir [22]. *O. vulgare* ve *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının *A. tenuissima*'ya karşı daha fazla antifungal maddeler içerdiğini söyleyebiliriz.

Tablo 1. *A. tenuissima*'nın misel büyümesine üzerine bitki tozlarının (%10 v/w) *in vitro* etkisi

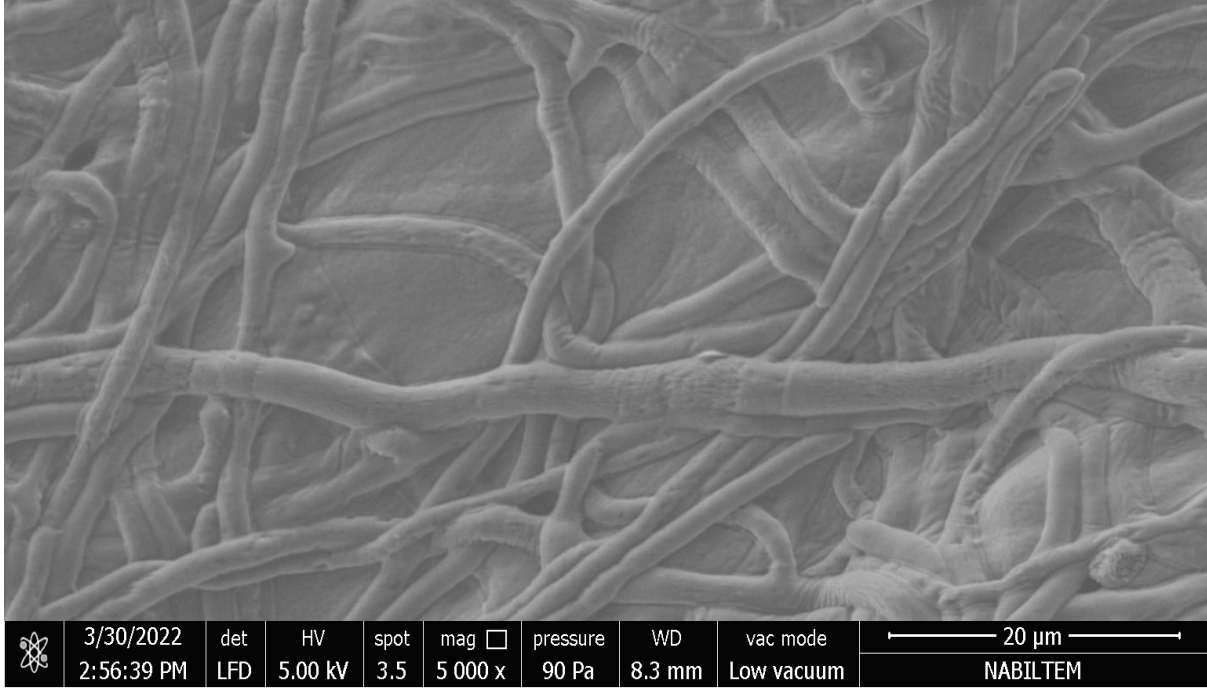
Familya	Tür İsmi	Ortalama Zon çapı	İnhibisyon (%)
Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i> L. hirtum (Link) letsw	0±0	100
Lamiaceae	<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl <i>longicaulis</i>	9.83±1.60	82,87
Caprifoliaceae	<i>Sambucus ebulus</i> L.	22.95±0.71	60
Lamiaceae	<i>Marrubium peregrinum</i> L.	25.50±0.81	55,56
Papaveraceae	<i>Chelidonium majus</i> L.	25.59±2.37	55,40
Asteraceae	<i>Eupatorium cannabinum</i> L.	26.68±0.36	53,50
Lamiaceae	<i>Clinopodium vulgare</i> L. <i>vulgare</i>	26.90±1.27	53,12
Lamiaceae	<i>Salvia verticillate</i> L.	28.31±0.81	50,66
Asteraceae	<i>Tanacetum parthenium</i> L. Schultz. Bip.	28.96±2.51	49,53
Asteraceae	<i>Artemisia absinthium</i> L.	32.17±0.71	43,93
Lamiaceae	<i>Melissa officinalis</i> L.	37.59±0.96	34,48
Asteraceae	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	38.94±0.33	32,13
Lamiaceae	<i>Sideritis montana</i> L.	41.77±1.61	27,02
Lamiaceae	<i>Mentha pulegium</i> L.	45.01±1.41	21,55
Asteraceae	<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	48.72±2.31	15,08
Asteraceae	<i>Lactuca serriola</i> L.	57.37±1.01	0
Kontrol		57.37±1.33	



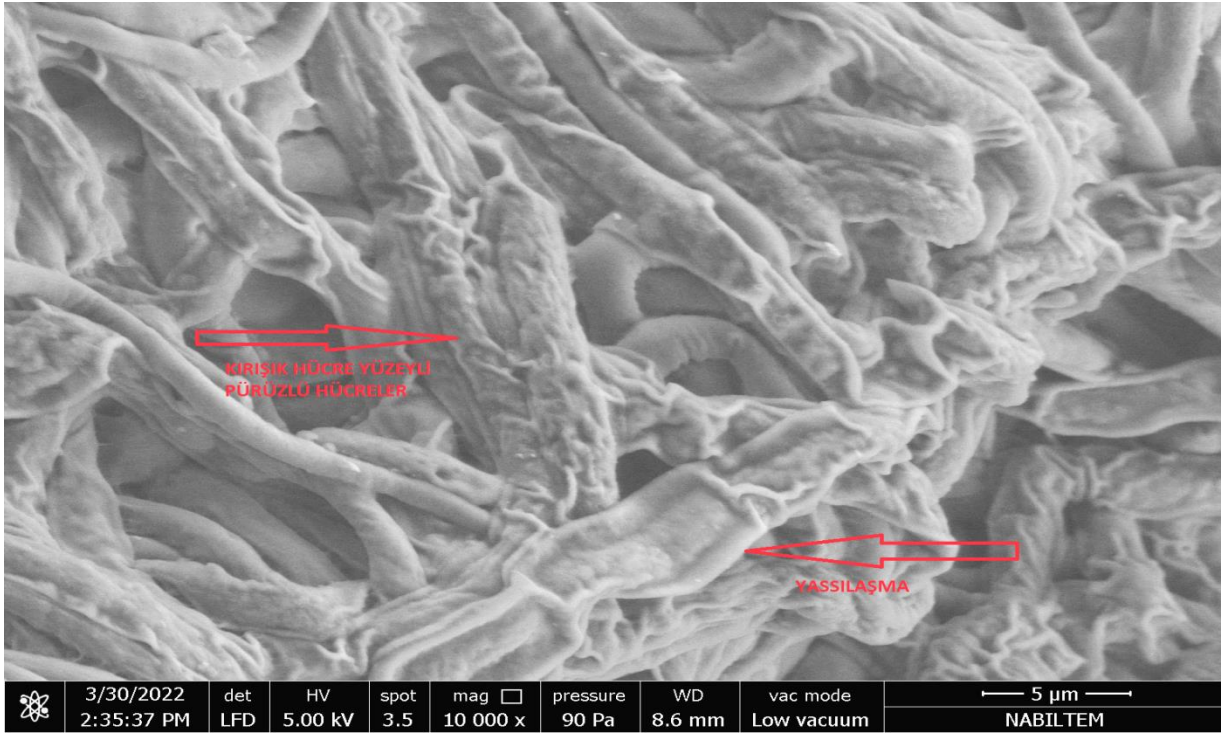
Şekil 1. Petri plaklarında *A. tenuissima*'nın misel büyümesi üzerine bazı bitki tozlarının (%10 v/w, inkübasyon süresi 7 gün, inkübasyon sıcaklığı 25°C) *in vitro* etkisinin görüntüleri.

3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Hifal Morfoloji Üzerine Sulu Ekstraktların Etkisinin Gözlenmesi

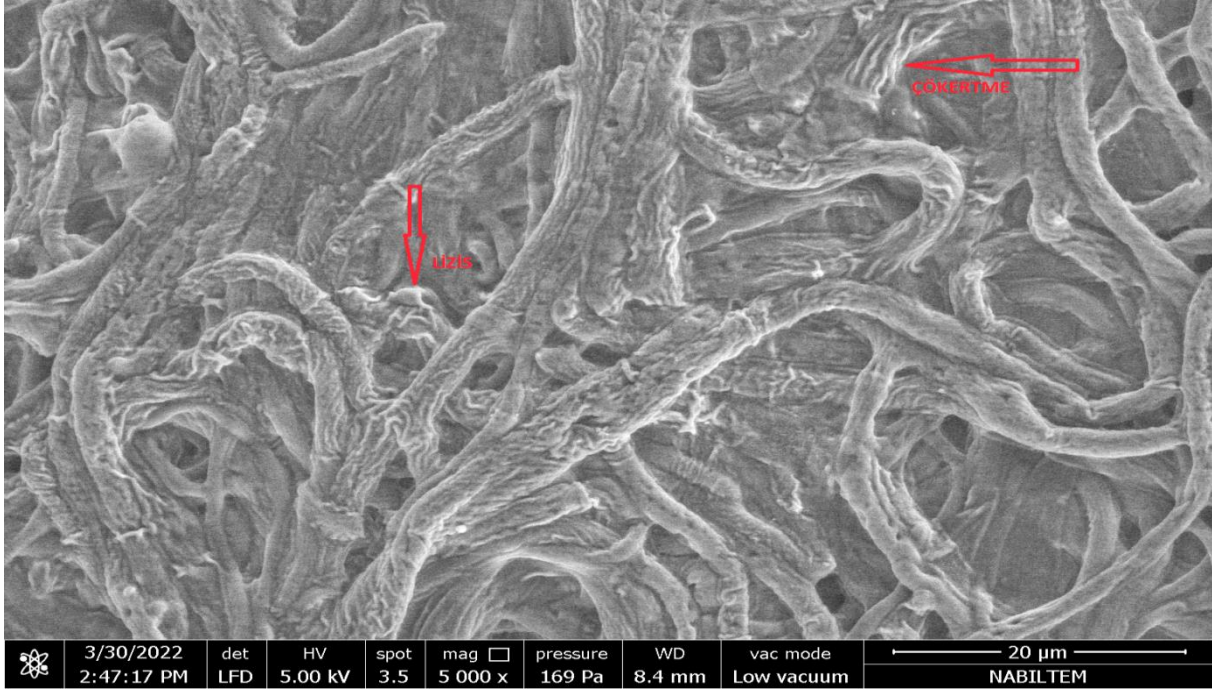
PDA içeren petri plaklarında *O. vulgare* ve *T. longicaulis*'un 4MİK ve 8MİK sulu bitki ekstraktlarına maruz kalmış ve maruz kalmamış *A. tenuissima* (kontrol) hifal morfolojileri karşılaştırıldığında önemli morfolojik değişimler saptandı. Kontrolde *A. tenuissima*'nın hifal yapısı doğrusal, düzenli ve homojen olarak gözlemlendi. *O. vulgare* ve *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının hifal morfoloji üzerine yaptığı dejeneratif değişimler; çökertme, yassılaştırma, lizis ve kırışık hücre yüzeyli hücreler olarak tespit edildi. Hif üzerine lizis dejeneratif etki *O. vulgare* ve *T. longicaulis* 8MİK sulu ekstraktlarında görülürken bu etki 4MİK ekstraktlarında görülmedi. Sağlıklı ve dejeneratif değişimlere sahip hiflerin SEM görüntüleri Şekil 2, 3, 4, 5 ve 6 da gösterildi.



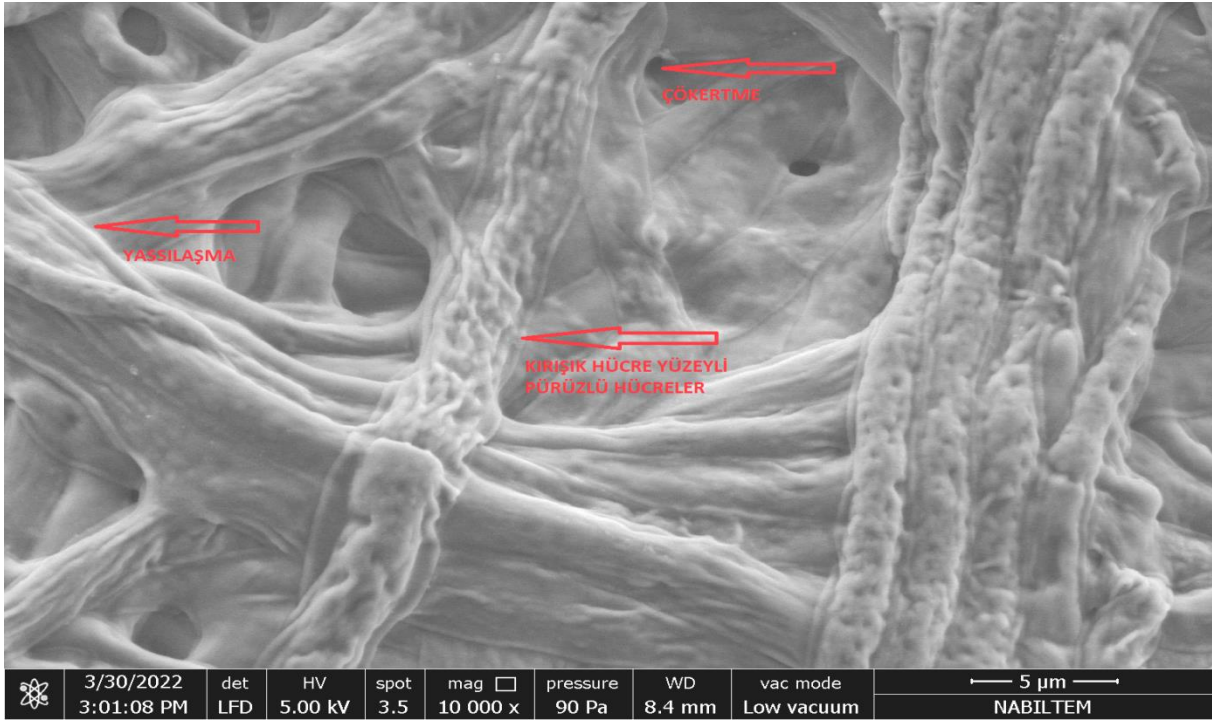
Şekil 2. Kontrol petri plaklarındaki *A. tenuissima* sağlıklı hifinin SEM görüntüleri (5 000x)



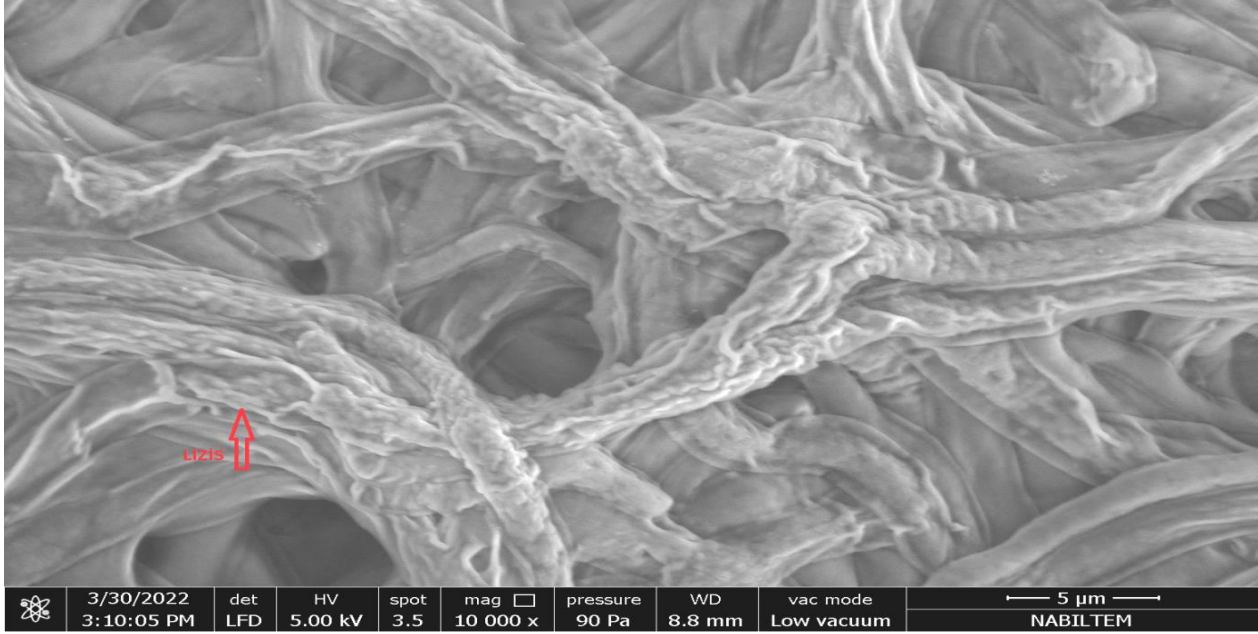
Şekil 3. *O. vulgare* sulu ekstraktına (4 MİK) maruz kalmış *A. tenuissima* hifinin SEM görüntüleri (10 000x)



Şekil 4. *O. vulgare* sulu ekstraktına (8 MİK) maruz kalmış *A. tenuissima* hifinin SEM görüntüleri (5 000x)



Şekil 5. *T. longicaulis* sulu ekstraktına (4 MİK) maruz kalmış *A. tenuissima* hifinin SEM görüntüleri (10 000x)



Şekil 6. *T. longicaulis* sulu ekstraktına (8 MİK) maruz kalmış *A. tenuissima* hifinin SEM görüntüleri (10 000x)

Bitki ekstratları veya uçucu yağlar ile muamele sonucu *A. tenuissima*'nın hifal yapısında meydana gelen değişimler henüz rapor edilmemiştir. SEM incelemeleri *O. vulgare* ve *T. longicaulis* sulu bitki ekstraktlarının *A. tenuissima*'nın hifal yapısında meydana getirdiği hasar test edilen sulu bitki ekstraktlarının fitotoksik özelliklere sahip olduğunu doğrulamaktadır. Bütün bitkiler metabolizmalarında rolleri yeterince bilinmeyen sekonder metabolit olarak çok sayıda fenolik madde oluşturmaktadırlar. Bu nedenle bitkisel kökenli bütün gıdalarda daima farklı nitelikte ve miktarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır. Lamiaceae familyasına ait *Origanum* türleri karvakrol, *Thymus* türleri ise timol fenolik bileşiği bakımından zengindir [23]. Timol ve karvakrol'ün antifungal aktivitesi Perina vd. [24] tarafından kanıtlanmıştır. Hücre duvarında meydana gelen dejenerasyonların hücre duvarını düzenleyen enzimatik reaksiyonlara sulu bitki ekstraktlarının etkisi ile ilişkili olabileceğini bunun sonucunda da fungal morfolojinin bozulduğunu ve hifal büyümenin etkilendiğini ifade edebiliriz.

Sonuç olarak, *O. vulgare* ve *T. longicaulis* sulu ekstraktlarının *A. tenuissima*'ya karşı çalışmamızda kanıtladığımız yüksek antifungal aktiviteleri nedeniyle, kimyasal fungusitler yerine alternatif bir doğal kontrol ajanı olarak değerlendirilme potansiyelinin yüksek olabileceğini söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

- [1] Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P., Rossman, A.Y., Fungi: on plants and plant products in the United States. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA. 1989.
- [2] Lee, H. B., Patriarca, A., Magan, N., Alternaria in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology, Mycobiology, C 43 (2), S 93-106, 2015.
- [3] Domsch, K.H., Gams, W., Andersen, T.H., Compendium of soil fungi (2nd ed.). Academic Press: London, UK. ISBN 9780122204029, 1980.
- [4] Chełkowski, J., Visconti, A., Alternaria: biology, plant diseases and metabolites, Elsevier Amsterdam [u.a.]. pp. 364–365. ISBN 0-444-88998-1, 1992.
- [5] Rajagopal, R. C., Sunil, M., Chandrasekharaiah, A. tenuissima – A new fungal pathogen on mulberry stem, Indian Phytopath, C 55, S 532, 2002.
- [6] Robertshaw, H., Higgins, E., Cutaneous infection with Alternaria tenuissima in an immunocompromised patient, British Journal of Dermatology, C 153 (5), S 1047–1049, 2005.
- [7] Romano, C., Fimiani, M., Pellegrino, M., Valenti, L., Casini, L., Miracco, C., Faggi, E., Cutaneous phaeohyphomycosis due to Alternaria tenuissima, Mycoses., C 39 (5–6), S 211–215, 1996.
- [8] Shukla, A. C., Yadav R. S., Shahi S. K., Dikshit A., Use of Plant Metabolites as an Effective Source for The Management of Post-Harvest Fungal Pests: A review, Current Discovery, C 1, S 33-45, 2012.
- [9] Al-Reza, S. M., Rahman A., Ahmed Y., Kang S.C., Inhibition of Plant Pathogens In vitro and In vivo with Essential Oil and Organic Extract of Cestrum nocturnum L., Pesticide Biochemistry and Physiology, C 96, S 86-92, 2010.
- [10] Soylu, E. M., Kurt Ş., Soylu S., In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent Botrytis cinerea, International Journal of Food Microbiology, C 143, S 183-189, 2010.
- [11] Passone, M.A., Girardi N.S., Ferrand C.A., Etcheverry M., Invitro Evaluation of Five Oils as Botanical Fungitoxicants for the Protection of Stored Peanuts from Aspergillus flavus and A. Parasiticus Contamination, International Biodeterioration & Biodegradation, C 70, S 82-88, 2012.
- [12] Talibi, I., Askarne L., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., Ait Ben Aoumar A., Antifungal activity of some Moroccan plants against Geotrichum candidum, the causel agent of postharvest citrus sour rot, Crop Protection, C 35, S 41-46, 2012.
- [13] Ameziane, N., Boubaker H., Boudyach H., Msanda F., Jilal A., Benaoumar A.A., Antifungal Activity of Moroccan Plants Against Citrus Fruit Pathogens, Agron. Sustain. Dev., C 27, S 273-

277, 2007.

[14] CLSI, Clinical and Laboratory Standarts Institute, formerly NCCLS, National Committee for Clinical and Laboratory Standarts. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standart, 2nd edition, NCCLS document M27-A2, NCCLS, Wayne, PA. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standart, 1st edition, NCCLS document M 38 A, Wayne, PA, 2002.

[15] Svatez, L., Zuljan F., Derita M., Petenatti E., Tamayo G., Caceres A., Filho V.C., Gimenez A., Pinzon R., Zacchino S.A., Gupta M., Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries, Journal of Ethnopharmacology, C 127, S 137-158, 2010.

[16] Chen, F., Long X., Yu M., Liu Z., Liu L., Phenolics and antifungal activities analysis in industrial crop Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) leaves, Industrial Crops and Products, C 47, S 339-345, 2013.

[17] Ramulu, S. J., Gopal, R.R.C., Ramanjaneyulu, R., Evaluation of Certain Plant Extracts and Antagonists Against *Fusarium solani* and *Alternaria tenuissima*, the Incitants of Root Rot and Die-Back Diseases of Mulberry, Int. J. Indust. Entomol, C 20(1), S 1-5, 2010.

[18] Abdel-Monaim, M.F., Abo-Elyousr, K.A.M., Morsy, K.M., Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik), Crop Protection, C 30, S 185-191, 2011.

[19] Ameziane, N., Boubaker H., Boudyach H., Msanda F., Jilal A., Benaoumar A.A., Antifungal Activity of Moroccan Plants Against Citrus Fruit Pathogens, Agron. Sustain. Dev., C 27, S 273-277, 2007.

[20] Talibi, I., Askarne L., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., Ait Ben Aoumar A., Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causel agent of postharvest citrus sour rot, Crop Protection, C 35, S 41-46, 2012.

[21] Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Msanda, F., Saadi, B., Serghini, M.A., Ait Ben Aoumar, A., In vitro and in vivo antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold, Crop Protection, C 40, S 53-58, 2012.

[22] Steglinska, A., Bekhter, A., Wawrzyniak, P., Kunicka-Styczyńska, A., Jastrz ąbek, K., Fidler, M., Smigielski, K., Gutarowska, B., Antimicrobial Activities of Plant Extracts against *Solanum tuberosum* L. Phytopathogens, Molecules, C 27, S 1579, 2022.

[23] Özderin, S., Fakir, H., Dönmez, İ.E., Muğla-Ula Yöresinde Doğal Yayılış Yapan Bazı Kekik Türlerinin Uçucu Yağ Oranları ve Bileşenlerinin Belirlenmesi. II. Ulusal Akdeniz Orman Ve Çevre Sempozyumu “Akdeniz ormanlarının geleceği: Sürdürülebilir toplum ve çevre” 22-24 Ekim Isparta, 2014.



[24] 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 Manag. Sci.*, C 71, S 1371–1378, 2015.