

EFFETTI DELL'ESTRATTO DELLA BUCCIA DI MELOGRANO (*PUNICA GRANATUM*) SULLA FUSARIOSI DEL POMODORO (*FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *LYCOPERSICI*) E SULLA MUFFA GRIGIA DELL'UVA (*BOTRYTIS CINEREA*)

D. RONGAI¹, P. PULCINI², B. PESCE², C. DI MARCO¹, F. MILANO²

¹ CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia - Viale Petrucci, 75, 65013 Città Sant'Angelo (PE)

² CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale - Via C. G. Bertero, 22, 00156 Roma
domenico.rongai@entecra.it

RIASSUNTO

Nel 2009 l'Unione Europea, con la Direttiva 2009/128/CE, ha istituito un quadro normativo di azione comunitaria per l'uso sostenibile degli agrofarmaci il cui obiettivo è la tutela della salute umana e dell'ambiente contro i potenziali rischi connessi all'uso di essi. L'azione si prefigge di incoraggiare lo sviluppo e l'introduzione della difesa integrata, il ricorso a tecniche di difesa alternative al fine di ridurre l'uso degli agrofarmaci. Fra le alternative, è possibile annoverare l'utilizzo di sostanze naturali. Si riportano in questo lavoro i risultati ottenuti in sperimentazioni condotte utilizzando un estratto ottenuto dalla buccia di melograno con una tecnica a basso impatto ambientale. Tra le tante specie di piante saggiate *in vitro*, l'estratto è risultato il più efficace sulla inibizione della crescita miceliare di *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*. Test *in vivo* su pomodoro e vite hanno confermato i risultati ottenuti *in vitro*.

Parole chiave: sostanze naturali, efficacia, impatto ambientale

SUMMARY

EFFECTS OF POMEGRANATE (*PUNICA GRANATUM*) PEEL EXTRACT ON FUSARIUM WILT OF TOMATO (*FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *LYCOPERSICI*) AND ON GREY MOULD (*BOTRYTIS CINEREA*)

The European Union, in the year 2009, with Directive 2009/128/EC, established a framework for community action for the sustainable use of pesticides with the aim to protect human health and the environment from possible risks associated to their use. Community action aims to encourage the development and introduction of integrated pest management, the use of alternative defense techniques in order to reduce the use of pesticides. Among the alternatives, it is possible to include the use of natural substances. This work reports the results obtained after the experiments conducted using an extract obtained from pomegranate peel with a low environmental impact technique. Among the many species of plants tested *in vitro*, the extract was the most effective on the inhibition of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*. *In vivo* tests confirmed the results obtained *in vitro*.

Keywords: natural substances, effectiveness, environmental impact

INTRODUZIONE

Le coltivazioni del pomodoro e della vite sono molto importanti nel nostro Paese ma soggette a gravi malattie quali fusariosi e muffa grigia che causano ingenti perdite economiche. L'agente infettivo della fusariosi del pomodoro è *Fusarium oxysporum*, f. sp. *lycopersici*, un fungo del suolo che penetrando nella pianta attraverso le radici provoca avvizzimento vascolare. La muffa grigia è invece dovuta a *Botrytis cinerea*, un fungo che provoca sulla vite distruzione dell'infiorescenza e marciume dopo l'invaiaura. Le fusariosi

possono essere contenute con l'uso di cultivar resistenti, seme sano certificato, lunghe rotazioni, fumigazioni mentre nel caso della botrite sono previste concimazioni azotate misurate, forme di allevamento alte da terra e scelta di cloni a grappolo spargolo. Tali pratiche non garantiscono tuttavia sufficiente protezione per cui occorre intervenire con fungicidi di sintesi (Spletzer ed Enyedi, 1999). Inoltre, con l'entrata in vigore della Direttiva 2009/128/CE, che mira a un utilizzo sostenibile degli agrofarmaci, l'attenzione dei ricercatori è stata rivolta verso l'utilizzo di sostanze naturali, a basso rischio di tossicità per l'uomo e gli animali ed a basso impatto ambientale.

Negli ultimi anni numerose sono state le ricerche su estratti di piante biologicamente attive verso *F. oxysporum* (Garibaldi *et al.*, 1990; Singha *et al.*, 2011; Parvu *et al.*, 2011) e analogamente verso *B. cinerea* (Ribera *et al.*, 2008; Ugolini *et al.*, 2014; Aguilar-González *et al.*, 2015). In un recente studio è stata saggiata *in vitro* l'attività antifungina di 600 estratti vegetali e tra essi l'estratto di melograno è risultato il più efficace nell'inibire la crescita miceliare di *F. oxysporum* (Rongai *et al.*, 2012; 2015). Nel presente lavoro, l'estratto è stato utilizzato per ulteriori sperimentazioni *in vitro* e *in vivo* con l'obiettivo di verificare la sua efficacia nei confronti della fusariosi del pomodoro e della muffa grigia dell'uva.

MATERIALI E METODI

Estratto acquoso di melograno

L'estratto utilizzato nelle sperimentazioni è stato ottenuto trattando la buccia di melograno (*Punica granatum* varietà dente di cavallo) con una metodica descritta in un precedente lavoro (Rongai, 2013). È un estratto con un alto contenuto di tannini (punicalagine, acido ellagico, acido gallico) e flavonoidi (quercetina, rutina, luteolina, pelargonidina).

Esperimento *in vitro* su *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

L'efficacia dell'estratto di melograno è stata valutata su piastre Petri contenenti PDA con aggiunti 5, 10, 15 e 20 mg/mL (w/v) di polvere, corrispondenti rispettivamente a 0,5; 1; 1,5 e 2%. PDA con acqua sterile è stato usato come controllo positivo, mentre PDA con fungicida (Marisan 50 PB, dicloran 60%, Siapa s.r.l., Milano) è stato usato come controllo negativo. Al centro di ogni piastra è stato posto un tassello di 5 mm di diametro preso da una piastra colonizzata da *F. oxysporum* e successivamente tutte le piastre sono state incubate a 25±2°C. A partire dal terzo giorno e fino al sesto, è stata misurata la crescita del micelio. Per ogni tesi sono state eseguite 4 repliche ed il test ripetuto due volte.

Esperimento *in vivo* sulla fusariosi del pomodoro

150 g di suolo (profit substrat - Gramoflor GmbH & Co. KG, Vechta, Germany) sono stati inoculati con 15 mL di una sospensione conidica (1x10⁵ spore/mL). Dopo 7 giorni di incubazione a 25±2°C, il suolo è stato trattato incorporando l'estratto polverulento di melograno alla concentrazione di 0,5% (w/w). Dopo ulteriori 7 giorni di incubazione, il suolo di ciascuna tesi è stato messo in quattro vasetti in ognuno dei quali sono stati seminati 10 semi di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*, var. Corbarino ISCI 05). Sono stati saggiati 40 semi (10 semi x 4 repliche) per ogni tesi che includono: a) testimone sano (non inoculato); b) testimone infetto (inoculato); c) suolo infetto trattato con estratto di melograno; d) suolo infetto trattato col fungicida. La gravità della malattia ed i parametri di crescita delle piantine di pomodoro (altezza pianta, lunghezza radici, peso fresco e peso secco) sono stati misurati 4 settimane dopo l'emergenza. La gravità della malattia è stata valutata su una scala di 0 - 5: 0=assenza di sintomi; 1=leggero ingiallimento su una o due foglie; 2= medio ingiallimento sulle foglie basali e mediane, alcune foglie avvizziscono; 3=ingiallimento delle foglie, metà delle quali avvizziscono, la crescita è inibita; 4=infezione molto diffusa, tutte le foglie diventano gialle, le radici iniziano a marcire, imbrunimento vascolare dello stelo e forte

inibizione della crescita; 5 piante disseccate. La densità della popolazione di *F. oxysporum* nel suolo è stata determinata 0 e 4 settimane dal trattamento. Un grammo di suolo per ogni tesi è stato messo in 10 mL di acqua sterile, 1 mL dalle 4 diluizioni è stato pipettato su piastra Petri contenente un substrato selettivo per *F. oxysporum* (Komada, 1975). Le piastre sono state incubate al buio a 25±2°C e 6 giorni dopo sono state conteggiate le colonie formate. Le prove sono state eseguite nella primavera 2013 e ripetute in quella successiva del 2014.

Esperimento su piastra con acini di uva

La valutazione dell'efficacia è stata fatta su acini cv Montepulciano D'Abruzzo. Le bacche sono state poste in piastre a pozzetti multipli (24 pozzetti). Per ogni tesi sono stati presi 72 acini (24 per 3 repliche). Gli acini sono stati punti con un ago nella parte mediana e su ogni puntura sono stati aggiunti 10 µL di sospensione conidica (10⁵ conidi/mL). Nelle tesi trattate, dopo 2 ore, sulla puntura sono stati aggiunti 10 µL di estratto (0,5 e 1% di concentrazione). Nella tesi del controllo l'estratto è stato sostituito con acqua sterile. Lo sviluppo della botrite è stato valutato visivamente osservando la percentuale di acini infetti (incidenza della malattia) e la percentuale di superficie dell'acino colpita (gravità della malattia). Riguardo quest'ultimo aspetto è stata utilizzata una scala da 0 a 4 (0, 25, 50, 75 e 100% di area colpita).

Test di fitotossicità su pomodoro

La percentuale di germinazione e la lunghezza della radichetta di semi di pomodoro sono state testate su piastre Petri (Ø 9 cm) mantenute al buio a 24±2°C. Su ogni piastra sono stati messi 3 carte da filtro (Watman No. 1 filter), 5 mL di estratto a concentrazioni crescenti (0,25; 0,75; 1,50 e 2,50) e 20 semi. Nelle piastre del controllo l'estratto è stato sostituito con acqua distillata. La percentuale dei semi germinati e la lunghezza della radichetta sono stati misurati 8 giorni dopo l'inizio del test. L'esperimento è stato ripetuto due volte.

Analisi statistica

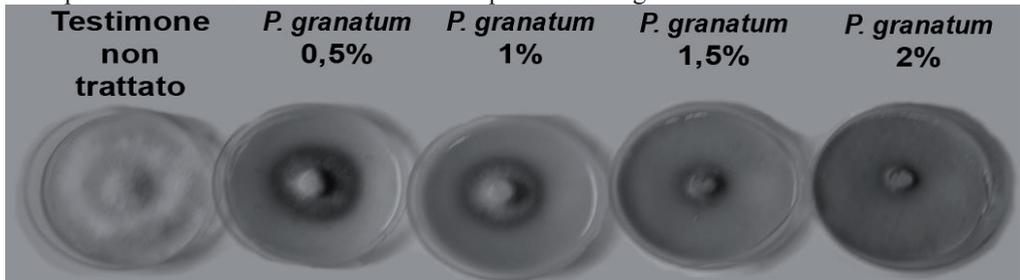
E' stata eseguita l'analisi della varianza ANOVA e i valori medi sono stati confrontati con Fisher's protected LSD test a $P \leq 0,05$. SigmaPlot versione SPW10 è stato usato per i grafici e Sigma Stat versione 3.5 per l'ANOVA.

RISULTATI

Efficacia *in vitro* contro *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Gli esperimenti condotti sull'attività antifungina dell'estratto di melograno, a differenti concentrazioni, hanno dimostrato che all'aumentare della concentrazione, la crescita miceliare diminuisce. Al 4° giorno dall'inoculazione e alla concentrazione dell'1%, essa è stata pari a 10,3 mm, valore significativamente più basso rispetto a 35,7 mm raggiunto nella piastra del testimone. Alla concentrazione del 2%, l'estratto di melograno ha inibito quasi interamente la crescita del fungo (figura 1).

Figura 1. Crescita miceliare di *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* al 4° giorno dall'inoculazione ed in presenza di dosi crescenti di estratto acquoso di melograno



Prove *in vivo* contro la fusariosi del pomodoro

Il numero delle colonie, nel testimone inoculato, 4 settimane dopo il trattamento è stato pari a 5,73 log₁₀ CFU g⁻¹ nel 2013 e 5,5 nel 2014, valori significativamente più alti rispetto a quelli raggiunti dal suolo trattato con il fungicida (1,9 e 2,8 log₁₀ CFU g⁻¹) e quello trattato con l'estratto di *P. granatum* (2,6 e 2,5 log₁₀ CFU g⁻¹) (figura 2). Tutti i parametri di crescita nel testimone inoculato sono risultati inferiori al testimone non inoculato ed alle tesi trattate (tabella 1). Le piante cresciute sul suolo trattato con 0,5% (w/w) dell'estratto hanno mostrato nel biennio 2013-2014 una altezza media di 45,22 cm, significativamente maggiore del testimone infetto. I valori sono stati significativamente maggiori anche per la lunghezza della radice, il peso fresco e secco. Non sono state invece riscontrate differenze tra le piante cresciute nel suolo trattato con *P. granatum* e quelle cresciute in quello trattato con il fungicida (figura 3). Riguardo alla severità della malattia, le piante trattate con il fungicida e quelle trattate con l'estratto hanno mostrato valori di 35 e 36%, significativamente più bassi rispetto al testimone infetto (tabella 1).

Figura 2. Densità della popolazione di *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in suolo coltivato con piantine di pomodoro prima e 4 settimane dopo il trattamento con fungicida ed estratto di melograno nel biennio 2013-2014. I valori con la stessa lettera non sono significativamente differenti (LSD test, P ≤ 0,05)

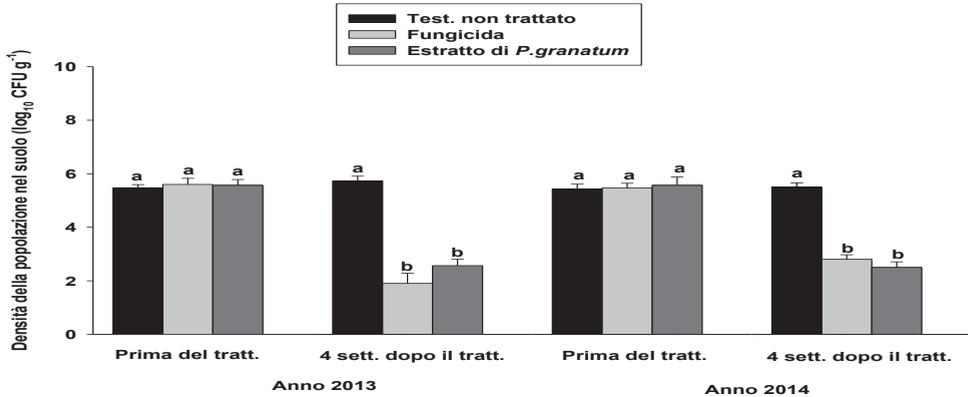


Figura 3. Effetti dell'estratto di *P. granatum* su piante di pomodoro, coltivate in serra, infette da *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

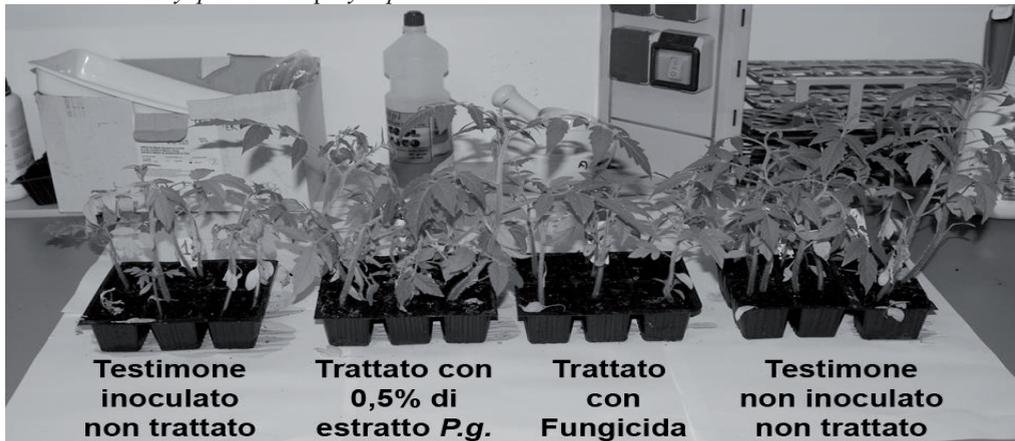


Tabella 1. Effetti dell'estratto di *P. granatum* su piantine di pomodoro infette da *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. I dati si riferiscono al biennio 2013-2014

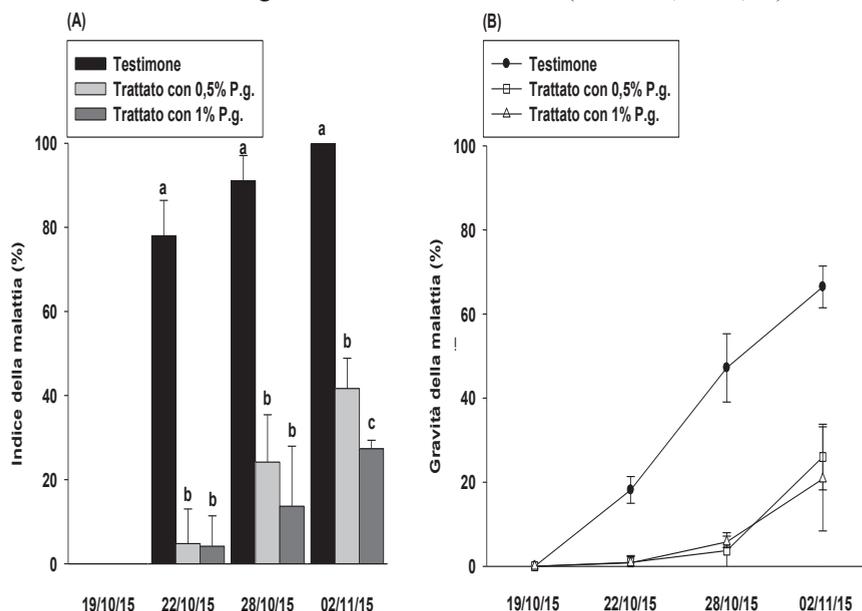
Tesi	Altezza pianta (cm)	Lunghezza radice (cm)	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Gravità malattia (%)
Testimone non inoculato	52,72 a	20,95 a	24,25 a	4,10 a	-
Testimone inoculato	40,05 c	15,87 b	18,45 b	2,40 b	75 a
Fungicida (0,15%)	47,67 b	18,25 a	22,55 a	3,40 a	35 b
<i>P. granatum</i> (0,50%)	45,22 b	19,25 a	22,25 a	3,45 a	36 b

*I valori nella stessa colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti (LSD test, $P \leq 0,05$)

Esperimento su piastra con acini di uva

Dopo 12 giorni dall'inoculazione tutti gli acini del testimone sono risultati infetti, mentre nelle tesi trattate con 0,5 e 1% dell'estratto di *P. granatum* l'incidenza della malattia è stata rispettivamente del 41 e 27% (figura 4a). Riguardo alla gravità della malattia, nel testimone non trattato il 66% della superficie degli acini è stata ricoperta dalla muffa grigia, valore significativamente più alto del 20% fatto registrare negli acini trattati con *P. granatum* alla dose dell'1%. Al 9° giorno dall'inoculazione nel testimone non trattato si è registrato il 47% della buccia degli acini ricoperta da botrite mentre in quelli trattati il fungo ha invaso meno del 5% della superficie (figura 4b).

Figura 4. Effetti dell'estratto di *P. granatum* sull'incidenza della malattia (A) e sulla gravità della malattia (B) in acini di uva cv Montepulciano d'Abruzzo. I valori con la stessa lettera non sono significativamente differenti (LSD test, $P \leq 0,05$)



Test di fitotossicità

L'estratto di melograno ha mostrato un effetto fitotossico sui semi di pomodoro. Aumentando la concentrazione si è osservato una progressiva diminuzione della percentuale di germinazione e della lunghezza delle radichette (tabella 2). Quando ai semi sono state aggiunte concentrazioni di estratto pari a 0,25; 0,75; 1,5 e 2,5%, la percentuale di semi germinati è stata rispettivamente pari a 100, 100, 76 e 44, mentre nel testimone non trattato 92%. Alle bassi dosi (0,25 e 0,75%), la percentuale di semi germinati non è stata differente a quella del non trattato. Riguardo agli effetti sulla radichetta, alla concentrazione dello 0,75%, la lunghezza è stata di 1,51 cm, mentre al 2,5% dell'estratto è stata solo di 0,24 cm, valori significativamente più bassi rispetto al controllo non trattato dove la lunghezza della radichetta è stata di 6,57 cm.

Tabella 2. Effetti fitotossici di *P. granatum* su pomodoro: germinazione (%) e lunghezza della radichetta (cm) di semi di pomodoro adagiati su piastra Petri dopo 8 giorni, nel testimone non trattato ed in presenza di estratto di melograno a differenti concentrazioni.

Tesi	Effetti di fitotossicità	
	Germinazione (%)	Lunghezza della radichetta (cm)
Testimone non trattato	92 a	6,57 a
Estratto di <i>P. granatum</i> 0,25%	100 a	3,05 b
Estratto di <i>P. granatum</i> 0,75%	100 a	1,51 c
Estratto di <i>P. granatum</i> 1,50%	76 b	0,55 d
Estratto di <i>P. granatum</i> 2,50%	44 c	0,24 d

*I valori nella stessa colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti (LSD test, $P \leq 0,05$)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sono stati concordi con quanto è stato osservato da altri autori i quali hanno riportato che l'estratto di melograno ha causato una significativa diminuzione della crescita di *F. oxysporum* e che questa attività antifungina è stata in qualche modo collegata ad alti livelli del contenuto polifenolico (El-Khateeb *et al.*, 2013). Nel nostro studio, il suolo trattato con estratto di *P. granatum* ha mostrato una significativa riduzione della popolazione fungina 4 settimane dopo l'inoculazione. Tale risultato è concorde con quanto riportato da Bowers e Locke (2000) i quali hanno dimostrato che alcuni estratti vegetali sono stati in grado di ridurre la popolazione nel suolo di *F. oxysporum*. Kouki *et al.* (2012) hanno affermato che l'inibizione del *F. oxysporum* usando un ammendante di *Posidonia oceanica* potrebbe essere stata causata da sostanze a base di cianuro e da alcuni ceppi batterici che agiscono come antagonisti. Riguardo alla severità della malattia, Hassenein *et al.* (2010) hanno riferito che trattamenti fogliari di estratto di Neem hanno ridotto l'incidenza della fusariosi del pomodoro: nelle piante trattate è stata del 19%, mentre nel testimone non trattato del 94%. Tali risultati sono stati simili a quelli osservati nel presente lavoro. Mari e Ippolito (2009) riportano che le sostanze volatili ad attività antimicrobica come gli oli essenziali hanno avuto una bassa capacità di penetrare i frutti quindi hanno fornito una scarsa protezione a infezione in atto.

L'estratto saggiato nel nostro esperimento si è mostrato efficace anche su acini di uva già infetti da muffa grigia, riducendo sia l'incidenza sia la gravità della malattia. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che rispetto ad altre sostanze biologicamente attive, le punicalagine contenute nell'estratto di *P. granatum* hanno un peso molecolare più elevato, quindi maggiore stabilità e più efficacia nel contenimento dei patogeni (dati in corso di pubblicazione). Il test di fitotossicità, ha mostrato che ad alte concentrazioni di estratto si è registrata una attività fitotossica in termini di germinabilità e lunghezza delle radichette di semi di pomodoro. Questo potrebbe essere dovuta agli acidi organici, alla decomposizione chimica o alla degradazione microbica di composti organici presenti nell'estratto di melograno. I risultati hanno messo in evidenza anche che l'effetto fitotossico si è manifestato maggiormente sulla lunghezza della radichetta e meno sulla germinazione, come osservato anche in uno studio precedente (Verma *et al.*, 2012). Addirittura, a basse concentrazioni di estratto, il seme ha accelerato il processo germinativo facendo registrare una percentuale di semi germinati superiore al testimone non trattato. Per concludere, i risultati ottenuti sono stati promettenti perché anche il test *in vivo* ha chiaramente dimostrato la capacità dell'estratto di melograno di contenere lo sviluppo della fusariosi del pomodoro e della muffa grigia. La sostituzione di fungicidi sintetici con molecole vegetali è di notevole importanza poiché i prodotti di sintesi saranno soggetti a maggiori restrizioni dalla regolamentazione comunitaria. Agli agrofarmaci, infatti, sono stati addebitati numerosi effetti indesiderabili quali: scarsa degradazione, accumulo nella catena alimentare e interferenza con l'ecosistema del suolo. Ulteriori studi saranno eseguiti per valutare l'efficacia del nostro estratto anche su altri patogeni fungini quali *Monilinia laxa*, agente del marciume bruno e alcuni tipi di batteri.

LAVORI CITATI

- Aguilar-González A.E., Palou E., López-Malo A., 2015. Antifungal activity of essential oil of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.003>.
- Bowers J. H., Locke J. C., 2000. Effect of Botanical Extracts on the Population Density of *Fusarium oxysporum* in Soil and Control of Fusarium Wilt in the Greenhouse. *Plant Disease*, 84 (3), 300-305.
- El-Khateeb A.Y., Elsherbiny E. A., Tadros L. K., Ali S. M., Hamed H. B., 2013. Phytochemical-Analysis and Antifungal Activity of Fruit Leaves Extracts on the Mycelial Growth of Fungal Plant Pathogens. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 4 (9), 1-6.
- Garibaldi A., Aloï C., Gullino M. L., 1990. Biological control of Fusarium wilt of carnation. *Proceeding Brighton Crop Protection Conference*, 1, 89-95.
- Hassanein, N. M., Ali, M. M., Youssef, K. A., Mahmoud D. A., 2010. Control of tomato early blight and wilt using aqueous extract of neem leaves. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, 143-151.
- Komada H., 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soils. *Review of Plant Protection Research*, 8, 114-125.
- Kouki S., Saidi N., Rajeb A. B., Brahmi M., Bellila A., Fumio M., Hefiène A., Jedidi N., Downer J., Ouzari, H., 2012. Control of Fusarium wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* using mixture of vegetable and *Posidonia oceanica* compost. *Applied and Environmental Soil Science*, 1(2), 343-351.
- Mari M., Ippolito A., 2009. Malattie degli ortofrutticoli in post raccolta. *Atti dell'accademia dei georgofili VIII* (5), 145-167.

- Pârvu M., Pârvu A. E., Vlase, L., Roșca-Casian, O., Pârvu, O., 2011. Antifungal properties of *Allium ursinum* L. ethanol extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 2041-2046.
- Ribera A., Cotoras M., Zuiga G.E., 2008. Effect of extracts from in vitro-grown shoots of *Quillaja saponaria* Mol. on *Botrytis cinerea* Pers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1803–1811.
- Rongai D., Milano F., Sciò E., 2012. Inhibitory Effect of Plant Extracts on Conidial Germination of the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. *American Journal of Plant Science*, 3, 1693-1698.
- Rongai D., 2013. Prodotto fitosanitario e metodo per l'ottenimento di detto prodotto fitosanitario. Brevetto per Invenzione in Italia N. TO2013A001085.
- Rongai D., Pulcini P., Pesce B., Milano F., 2015. Antifungal activity of some botanical extract on *Fusarium oxysporum*. *Open Life Science* (già *Central European Journal of Biology*), 10, 409-416.
- Singha I. M., Kakoty Y., Unni B. G., Kalita M. C., Das J., Naglot A., Wann S. B., Singh L., 2011. Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of *Piper betle* L.: a preliminary study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2583-2589.
- Spletzer M. E., Enyedi, A. J., 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Biochemistry and Cell Biology*, 89, 722-727.
- Ugolini L., Martini C., Lazzeri L., D'Avino L., Mari M., 2014. Control of postharvest grey mould (*Botrytis cinerea* Per.: Fr.) on strawberries by glucosinolate-derived allyl-isothiocyanate treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 90, 34–39.
- Verma S. K., Kumar S., Pandey V., Verma R. K., Patra D., 2012. Phytotoxic effects of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) extracts on germination and seedling growth of commercial crop plants. *European Journal of Experimental Biology*, 2(6), 2310-2316.