

# Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo

Érica dos Anjos Rodrigues<sup>1</sup>, Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada<sup>1\*</sup>, José Renato Stangarlin<sup>2</sup>, Carlos Alberto Scapim<sup>1</sup> e Ana Cristina Grade Fiori-Tutida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 85960-000, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. e-mail: krfsestrada@uem.br

**RESUMO.** Avaliou-se o efeito, *in vitro*, do extrato bruto (EB), autoclavado e esterilizado por filtração, da planta medicinal *Ocimum gratissimum* e do fungicida iprodione+thiram no crescimento micelial e na esporulação de *Bipolaris sorokiniana*. Além disso, sementes de trigo naturalmente infectadas com *B. sorokiniana* foram submetidas aos seguintes tratamentos: 1) fumigação com óleo essencial, 2) imersão em EB autoclavado e 3) não-autoclavado em diferentes concentrações (1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 50% m/v), 4) polvilhamento com folhas secas e com fungicida iprodione+thiram. O EB autoclavado proporcionou maior inibição, ainda que parcial, do crescimento micelial em todas as concentrações testadas (1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 50% m/v), quando comparado ao EB esterilizado por filtração. Em casa-de-vegetação, as sementes fumigadas por 7 dias apresentaram velocidade de emergência (VE) estatisticamente igual à da testemunha (água). Com relação ao tratamento por imersão, não houve diferença estatística entre os parâmetros analisados (VE, porcentagem de emergência, altura, massa fresca e seca e taxa de transmissão (Tt)) e a testemunha. Sementes tratadas com pó de folhas secas não diferiram estatisticamente do controle químico, em relação aos parâmetros anteriores, mas apresentaram maior Tt do patógeno. Em laboratório, as sementes submetidas à fumigação apresentaram maior número de sementes sadias do que a testemunha, enquanto os tratamentos com imersão em EB e polvilhamento não diferiram em relação ao mesmo parâmetro.

**Palavras-chave:** tratamento de sementes, *Bipolaris sorokiniana*, sementes de trigo, *Ocimum gratissimum*, planta medicinal.

**ABSTRACT. Potential of *Ocimum gratissimum* medicinal plant on *Bipolaris sorokiniana* control in the wheat seeds.** The *in vitro* effect of *Ocimum gratissimum* medicinal plant CE (autoclaved and sterilized by filtration) as well as the iprodione+thiram fungicide on the mycelial growth and sporulation of *B. sorokiniana* was evaluated. Besides, wheat seeds naturally infected with *B. sorokiniana* were submitted to the following treatments: 1) fumigation with essential oil; 2) immersion with autoclaved CE and; 3) non autoclaved CE at different concentrations (1, 5, 10, 15, 20, 25, and 50%; m/v); 4) sprinkling with dry leaves of the medicinal plant and with the fungicide. The autoclaved CE showed, even partially, higher inhibition of mycelial growth in all the tested concentrations (1, 5, 10, 15, 20 and 50%, m/v) than CE sterilized by filtration. In greenhouse, the fumigated seeds (7 days) showed the same emergency speed (EV) concerning to the control (water). There were no statistics differences among the analysed parameters (EV, emergency percent, height, dry mass, fresh mass, and transmission rate (TR)) when the treatment by immersion was compared with the no treated check. Seeds treated with the dry powder of medicinal leaves did not differ statistically from the chemical control, when the same parameters were evaluated, but presented higher TR of the pathogen. In the laboratory, seeds submitted to the fumigation process presented a higher number of health seeds than the non treated control, while the treatments by immersion in the CE and sprinkling with dry leaves did not differ concerning to the same parameter.

**Key words:** alternative control, *Bipolaris sorokiniana*, wheat seeds, *Ocimum gratissimum*, medicinal plant.

## Introdução

A cultura do trigo (*Triticum aestivum* (L.) Thell.) no Sul do Brasil é afetada por um grande número de

doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. Dentre as doenças fúngicas, destaca-se a mancha marrom ou helmintosporiose causada pelo fungo

*Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) Shoem., teleomorfa: *Cochliobolus sativus* (Ito e Kuribay). Drechs. Ex. Dastur., que afeta os órgãos aéreos e radiculares. Esse fitopatógeno é transmitido por meio de sementes contaminadas, permitindo o estabelecimento de focos de infecção no campo, a partir dos quais se originam ciclos secundários da doença (Reis et al., 1988; Reis e Forcelini, 1993; Prates e Fernandes, 2001). Por esse motivo, *B. sorokiniana* é considerado o mais importante patógeno associado às sementes de trigo e o alvo principal de controle químico (Forcelini, 1991).

O tratamento químico de sementes por meio do uso de fungicidas é o método mais utilizado no controle de *B. sorokiniana*. Apesar de eficiente, essa prática nem sempre elimina totalmente o fungo na semente e pode, dentre outros problemas, causar prejuízo a microbiota do solo (Pessoa, 1993; Reis, 1987).

Uma alternativa ao controle de fitopatógenos em sementes é a utilização de subprodutos de plantas medicinais (extrato bruto, óleo essencial, tintura), uma vez que apresentam, em sua composição, substâncias com propriedades fungicidas e/ou fungitóxicas (Matos, 1997). Asthana et al. (1989) verificaram que o óleo essencial de *Ocimum adscendes*, na concentração de 0,1%, controlou fungos em sementes de *Capsicum annum*, sendo mais eficiente que o tratamento com fungicidas. Os óleos essenciais das plantas medicinais *Lippia sidoides*, *Carapa guianensis*, *Copaifera reticulata* e *Piper aduncum* foram eficientes no controle de *Fusarium* spp. em sementes de milho; entretanto o óleo de *L. sidoides* apresentou efeito alelopático, inibindo a germinação das mesmas (Pessoa et al., 1998). Óleos essenciais e hidrolato de *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Lavandula* sp. e *Ocimum basilicum* foram eficientes em controlar *Curvularia* sp., *Cercospora kikuchii*, *Fusarium semitectum*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em sementes de soja (Cruz et al., 1999a). Os óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Lavandula* sp. e *Mentha piperita* inibiram o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* var. *ultimum*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum lindemuthianum* (Zambonelli et al., 1996). Uma formulação aquosa de extratos concentrados de folhas de *Reynoutria sachalinensis* (comercialmente: Milsana), aplicada semanalmente, na concentração de 2%, controlou o fungo *Sphaerotheca fuliginea*, em pepino, tão efetivamente quanto o fungicida Benomyl (Dayy et al., 1995).

Assim, o presente trabalho teve por objetivos avaliar, *in vitro* e em casa-de-vegetação, o efeito de subprodutos de *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo)

no crescimento micelial e na esporulação de *Bipolaris sorokiniana*, bem como em sementes de trigo naturalmente infectadas.

## Material e métodos

As sementes de trigo com 78% de incidência de *Bipolaris sorokiniana* foram obtidas de campos de produção do Mato Grosso do Sul, safra 97/98, e cedidas pelo Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste (CPAO) - Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul.

### Crescimento micelial e esporulação

Para obtenção do extrato bruto aquoso, 200 g de folhas frescas de *O. gratissimum* foram cortadas, pesadas e trituradas em liquidificador com água destilada. Esse extrato foi incorporado ao meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) de modo a obterem-se concentrações de 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 50% (m/v), sendo esterilizado por autoclavagem a 121°C por 20min. (Stangarlin et al., 1999) ou distribuído na superfície de placas de Petri com meio BDA, com auxílio de alça de Drigalski, após esterilização por filtração em membrana Millipore (0,2 µm). O tratamento-controle consistiu de meio BDA. Em cada placa de Petri, foi repicado um disco de 8 mm de diâmetro, contendo micélio de *Bipolaris sorokiniana*, com 10 dias de cultivo. As avaliações foram realizadas por meio de medições diárias do diâmetro das colônias (médias de duas medidas diametralmente opostas), 24h após a instalação do experimento, e prosseguiram até o momento em que as colônias fúngicas, no tratamento-controle, atingiram 2/3 da superfície do meio de cultura. Os valores obtidos foram convertidos em porcentagem de inibição do crescimento micelial (Bastos, 1997). Em seguida, realizou-se a avaliação da esporulação em cada tratamento, adicionando-se 5 mL de água destilada esterilizada por placa e raspando-se toda a superfície do micélio com espátula. A suspensão foi filtrada em gaze e a contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições e 13 tratamentos, com esquema fatorial 6 x 2 + 1, cujos fatores foram os seguintes: 6 concentrações dos EBs (1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 50%), 2 formas do EB (autoclavado e não-autoclavado), além de 1 testemunha absoluta.

A inibição do crescimento também foi avaliada na presença do fungicida Iprodione+Thiram (Captan), incorporado ao BDA nas concentrações de

1, 10, 50, 100 e 1000 ppm (m/v), segundo procedimento descrito anteriormente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 5 tratamentos e 4 repetições. Os resultados foram expressos em porcentagem e as médias foram comparadas à testemunha pelo teste Dunnett, em nível de 5% de probabilidade.

#### Tratamento das sementes de trigo

As sementes de trigo foram submetidas a três formas de tratamentos com a planta *O. gratissimum*: fumigação com o óleo essencial, imersão em extrato bruto aquoso e polvilhamento com pó de folhas secas.

#### Fumigação com óleo essencial

Foram utilizadas 100 sementes por repetição/tratamento, os quais foram dispostas em saquinhos de gaze, sendo cada um deles colocado suspenso dentro de frascos de vidro fechados (20 cm x 7,5 cm de diâmetro) contendo, na base, um pequeno recipiente com 2 mL do óleo essencial da planta, obtido por arraste a vapor. Essas sementes ficaram expostas à fumigação por 7, 14, 21 e 28 dias. No tratamento-controle, utilizou-se água destilada e o mesmo período de exposição. Após cada intervalo de tempo, as sementes foram retiradas e a sanidade do lote foi avaliada em laboratório, por meio do *blotter test* (número de sementes sadias germinadas) e em casa-de-vegetação (teste em areia). No teste em areia, após 21 dias do plantio, também foram avaliados os seguintes parâmetros: velocidade e porcentagem de emergência, altura de plântulas, massa fresca e seca e taxa de transmissão de *B. sorokiniana*. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) com 5 tratamentos (0, 7, 14, 21 e 28 dias) e 4 repetições (100 sementes/repetição). Os resultados foram expressos em porcentagem e as médias foram comparadas à testemunha pelo teste Dunnett, em nível de 5% de probabilidade.

#### Imersão em Extrato Bruto

As sementes (100 sementes/tratamento) foram imersas por 3 minutos nas diferentes concentrações do EB aquoso (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 50%) autoclavado e não-autoclavado. Em seguida, foram distribuídas em folhas de papel de filtro para secagem por 2 horas e avaliadas em laboratório (*Blotter test*) e em casa-de-vegetação, utilizando-se os mesmos parâmetros analisados anteriormente. Como testemunha, utilizou-se água destilada esterilizada em substituição ao EB. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições e 15 tratamentos, com esquema fatorial 2

x 7 + 1, cujos fatores foram os seguintes: 2 tratamentos de imersão (EB autoclavado e não-autoclavado), 7 concentrações do EB, além de uma testemunha absoluta. Os resultados foram expressos em porcentagem e as médias foram comparadas à testemunha pelo teste Dunnett, em nível de 5% de probabilidade.

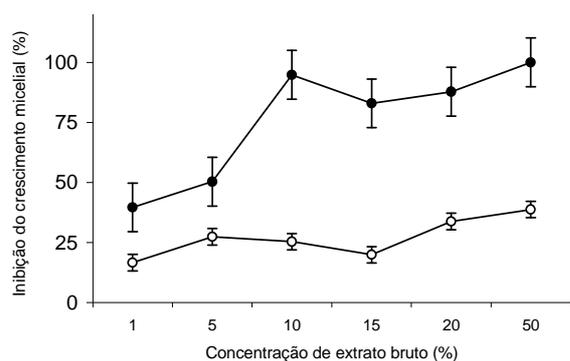
#### Polvilhamento com pó de folhas secas e tratamento com Iprodione + Thiram

As folhas de *O. gratissimum* foram secas naturalmente e trituradas em moinho MA 048 (Marconi) com *mesh* 0,2 para a obtenção de um pó fino. Esse pó foi utilizado nas dosagens de 12,5; 62,5; 125 e 250 g/100 kg de sementes, sendo misturado às sementes por meio de agitação manual durante 5 minutos para a distribuição uniforme do produto. As sementes foram avaliadas segundo os mesmos parâmetros anteriormente descritos. Esse tratamento foi comparado com o tratamento padrão iprodione + thiram, utilizando-se as mesmas dosagens. Como testemunha absoluta, utilizou-se água destilada esterilizada. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições e 9 tratamentos, com esquema fatorial 4 x 2 + 1, cujos fatores foram os seguintes: 4 dosagens, 2 formas de tratamento (EB e fungicida), além de 1 testemunha absoluta. Os resultados foram expressos em porcentagem e as médias foram comparadas à testemunha pelo teste Dunnett, em nível de 5% de probabilidade.

## Resultados e discussão

#### Inibição do crescimento micelial e da esporulação

Pela Figura 1, pode-se verificar que o EB aquoso de *O. gratissimum*, quando autoclavado, induziu maior inibição do crescimento micelial em todas as concentrações utilizadas quando comparado ao EB esterilizado por filtração, evidenciando, dessa forma, que o princípio ativo da planta não é termosensível. Destaque deve ser dado para a concentração de 50% do EB autoclavado que proporcionou inibição de 100% do crescimento micelial de *B. sorokiniana*. Com relação à produção de esporos, verificou-se que, quando o EB foi autoclavado, a inibição total de esporos foi observada a partir da concentração de 10%. Já no meio de cultivo com EB esterilizado por filtração, os esporos foram detectados em todas as concentrações estudadas, e a quantidade produzida se estabilizou à medida que concentrações mais altas do EB foram utilizadas (Tabela 1).



**Figura 1.** Inibição do crescimento micelial (%) de *B. sorokiniana* em diferentes concentrações do extrato bruto (%) autoclavado (●) e esterilizado por filtração (○). As barras representam o Erro Padrão da média.

**Tabela 1.** Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto (EB) autoclavado e esterilizado por filtração de *O. gratissimum*, na esporulação de *B. sorokiniana*.

Concentrações do EB (%)	Autoclavado	Esterilizado por filtração
	Número de esporos/mL	
1	$20 \times 10^2$	$20 \times 10^2$
5	$0,06 \times 10^2$	$0,1 \times 10^2$
10	0	$0,3 \times 10^2$
15	0	$0,4 \times 10^2$
20	0	$0,4 \times 10^2$
50	0	$0,4 \times 10^2$
Controle	$41,3 \times 10^2$	

Quando se avaliou o tratamento com o fungicida iprodione+thiram, verificou-se que houve inibição total, tanto do crescimento micelial quanto da produção de esporos, a partir da concentração de 50 ppm (dados não mostrados). Esses resultados estão de acordo com Pessoa (1993), cuja inibição de 100% de crescimento micelial de *B. sorokiniana* foi observada quando se utilizou iprodione+thiram nas concentrações de 50, 100 e 1000 ppm. Ahmed et al. (2002) verificaram que os fungicidas (Bavistin, Hinosan, Tilt 250 Ce e Dithane M-45), nas suas diferentes concentrações, inibiram significativamente o crescimento micelial de *Bipolaris oryzae*, sendo a mais baixa inibição observada com o uso de 50 ppm de Bavistin.

Considerando-se que o ingrediente ativo do EB de uma planta medicinal encontra-se misturado aos demais metabólitos e que, no controle químico, o princípio ativo utilizado foi purificado e concentrado, pode-se dizer que o EB aquoso foi tão ou mais eficiente que o fungicida testado, nas condições estudadas.

É provável que o aumento nas concentrações do EB aquoso, aliado à temperatura de autoclavagem (121°C), tenha ativado ou transformado algum composto do metabolismo secundário da planta, otimizando sua ação fungicida e/ou fungitóxica.

Além disso, o fato de se utilizar o EB aquoso de *O. gratissimum* ao invés de um extrato alcoólico, como usado por Lemos et al. (2005), pode ter influenciado o seu potencial fungitóxico, não permitindo, assim, retirada de compostos com tais propriedades, a ponto de promover inibição total das variáveis analisadas em concentrações mais baixas do EB.

O efeito fungitóxico de *O. gratissimum* já foi identificado *in vitro*, em diversas formas de extrato. Lemos et al. (2005) verificaram que as formas de extrato de *O. gratissimum* (EB etanólico, frações de acetato de etila, hexano e clorofórmio, óleo essencial e eugenol) mostraram atividade *in vitro* a *Cryptococcus neoformans*. Também Cafarchia et al. (2002) observaram que óleos essenciais de *Artemisia verlotorum*, *Lavandula angustifolia*, *Ocimum gratissimum* e *Inula viscosa* apresentaram atividade acaricida, fungicida e antibacteriana. A fungitoxicidade de extratos hexânicos e metanólicos de plantas de copaíba foi avaliada por meio de testes biológicos contra os patógenos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Bipolaris sorokiniana*. Uma redução de 32% no crescimento de *B. sorokiniana* foi observada na presença do extrato metanólico, enquanto o extrato hexânico foi efetivo contra ambos os patógenos, resultando em uma redução de 49% no crescimento de *B. sorokiniana* e 18% no crescimento de *C. gloeosporioides*.

Outros trabalhos com plantas medicinais demonstraram a inibição do crescimento micelial bem como a inibição da germinação de conídios de fungos fitopatogênicos (Valarini et al., 1994; Cruz et al., 1997). Fiori et al. (2000) estudaram o efeito do extrato bruto de *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Ageratum conyzoides* e *Achillea millefolium*, em diferentes concentrações, sobre o crescimento micelial de *Didymella bryoniae* e verificaram que os extratos de *E. citriodora* e *A. conyzoides* foram os mais eficientes na inibição do crescimento e da esporulação do patógeno.

#### Tratamento de sementes de trigo com *Ocimum gratissimum*

##### Fumigação com óleo essencial

Os resultados obtidos com o tratamento de sementes indicaram que a fumigação com o óleo essencial de *O. gratissimum* não teve influência na emergência, na altura e na massa fresca de plântulas, bem como na taxa de transmissão do patógeno, uma vez que tais parâmetros não se diferenciaram da testemunha (Tabela 2). Para a variável velocidade de emergência (VE), o tratamento com o óleo essencial passou a exercer algum efeito quando a fumigação se

prolongou por um tempo superior a 14 dias. Avaliando-se o teor de massa seca das plântulas, observou-se seu aumento quando a fumigação ocorreu com 7, 14 e 21 dias.

**Tabela 2.** Efeito do tratamento de fumigação em diferentes tempos (dias) de exposição sobre as variáveis: velocidade de emergência (VE), percentagem de emergência (PE), altura (cm), massa fresca (MF), massa seca (MS) e taxa de transmissão (Tt) de plântulas de trigo.

Tempo (dias)	VE (%)	PE (%)	Altura (cm)	MF (g)	MS (g)	Tt (%)
7	24,25 <sup>NS</sup>	97,00 <sup>NS</sup>	16,05 <sup>NS</sup>	13,15 <sup>NS</sup>	3,36 <sup>(+)</sup>	29,43 <sup>NS</sup>
14	19,37 <sup>(-)</sup>	96,25 <sup>NS</sup>	15,10 <sup>NS</sup>	20,79 <sup>NS</sup>	3,15 <sup>(+)</sup>	30,73 <sup>NS</sup>
21	19,65 <sup>(-)</sup>	98,25 <sup>NS</sup>	17,68 <sup>NS</sup>	18,42 <sup>NS</sup>	3,46 <sup>(+)</sup>	30,28 <sup>NS</sup>
28	19,75 <sup>(-)</sup>	98,75 <sup>NS</sup>	15,16 <sup>NS</sup>	19,94 <sup>NS</sup>	1,60 <sup>NS</sup>	32,44 <sup>NS</sup>
Água esterilizada	24,50	97,75	15,29	12,02	1,6	32,25

Médias seguidas por (+) foram superiores à testemunha absoluta ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05\%$ ). Médias seguidas por (-) foram inferiores à testemunha absoluta ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05\%$ ). NS - Médias não diferem da testemunha absoluta ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

Quando se avaliou em laboratório o efeito do tempo de fumigação do óleo essencial sobre as sementes de trigo infectadas com *B. sorokiniana* (Tabela 3), verificou-se que as sementes fumigadas por um menor tempo (7 dias) apresentaram menor taxa de colonização (31%) pelo patógeno, diferenciando-se da testemunha em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett. Tal resultado pode ser explicado pela volatilidade que a maioria dos óleos essenciais apresentam. Segundo Brandares *et al.* (1987) e Silva *et al.* (2005), os óleos essenciais são instáveis, podendo ser afetados pela presença de oxigênio, de calor e de umidade e catalisados pela exposição à luz e possivelmente por metais, ocasionando oxidação, polimerização, resinificação, hidrólise de ésteres e interações de grupos funcionais.

O tratamento de sementes com extratos vegetais e óleos essenciais pode ser uma opção no controle de fitopatógenos. Dikshit *et al.* (1983) observaram a ação fungitóxica do óleo de *Cedrus deodora* no controle de *Alternaria alternata*,

*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata* e *Paecilomyces variotti*, em sementes de *Coriandrum sativum*. Nas condições daquele experimento, o óleo essencial mostrou-se mais efetivo do que os fungicidas sintéticos, não apresentando efeito adverso algum à germinação das sementes e ao crescimento das plântulas. Cruz *et al.* (1999b) avaliaram o efeito de *Ocimum*, *Artemisia*, *Rosmarinus* e *Zingiber* em sementes de trigo, tratadas por fumigação com hidrolatos, no controle de *Helminthosporium sativum*, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium*, observando redução no número de sementes infectadas e maior número de plântulas sadias e normais, com controle de 100% dos fitopatógenos em todos os tratamentos.

**Tabela 3.** Efeito, *in vitro*, de fumigação com óleo essencial em diferentes tempos (dias) de exposição sobre as variáveis sementes infectadas (SI) e não-infectadas (SNI).

Tempo de exposição (dias)	Sem. Infectadas (SI) (%)	Sem. Não-infectadas (SNI) (%)
7	31,00 <sup>(-)</sup>	69,00 <sup>(+)</sup>
14	88,00 <sup>NS</sup>	12,00 <sup>NS</sup>
21	67,00 <sup>(-)</sup>	33,00 <sup>(+)</sup>
28	74,00 <sup>NS</sup>	26,00 <sup>NS</sup>
Água esterilizada	75,00	25,00

Médias seguidas por (+) foram superiores à testemunha absoluta em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). Médias seguidas por (-) foram inferiores à testemunha absoluta em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). NS - Médias não diferem da testemunha absoluta em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett. ( $P \leq 0,05$ ).

### Imersão em extrato bruto

Em casa-de-vegetação, os resultados obtidos com a imersão das sementes de trigo em diferentes concentrações do EB (Tabela 4) mostraram que as variáveis analisadas (PE, altura e MS) não apresentaram qualquer tipo de influência do tratamento. As sementes submetidas ao processo de imersão em EB autoclavado tiveram sua VE diminuída em todas as concentrações testadas quando comparadas à testemunha.

**Tabela 4.** Efeito do tratamento de sementes imersas em diferentes concentrações de extrato bruto autoclavado e não- autoclavado, realizado em casa-de-vegetação, sobre as variáveis: velocidade de emergência (VE), percentagem de emergência (PE), altura (cm), massa fresca (MF), massa seca (MS) e taxa de transmissão (Tt) do patógeno.

Concentrações de Extrato bruto (%)	VE (%)		PE (%)		Altura (cm)		MF (g)		MS (g)		Tt (%)	
	Autocl.	Não-autocl.	Autocl.	Não-autocl.	Autocl.	Não-autocl.	Autocl.	Não-autocl.	Autocl.	Não-autocl.	Autocl.	Não-autocl.
1	19,70 <sup>(-)</sup>	24,75 <sup>NS</sup>	98,50 <sup>NS</sup>	99,00 <sup>S</sup>	15,59 <sup>NS</sup>	15,23 <sup>NS</sup>	20,77 <sup>NS</sup>	8,34 <sup>(-)</sup>	3,66 <sup>NS</sup>	3,76 <sup>NS</sup>	31,75 <sup>NS</sup>	27,77 <sup>NS</sup>
5	19,85 <sup>(-)</sup>	24,43 <sup>NS</sup>	99,25 <sup>NS</sup>	97,75 <sup>NS</sup>	14,20 <sup>NS</sup>	13,22 <sup>NS</sup>	18,21 <sup>NS</sup>	9,68 <sup>NS</sup>	3,76 <sup>NS</sup>	5,35 <sup>NS</sup>	30,47 <sup>NS</sup>	18,89 <sup>(-)</sup>
10	19,65 <sup>(-)</sup>	16,24 <sup>(-)</sup>	98,25 <sup>S</sup>	98,50 <sup>NS</sup>	15,45 <sup>NS</sup>	13,48 <sup>NS</sup>	23,72 <sup>NS</sup>	7,51 <sup>(-)</sup>	3,96 <sup>NS</sup>	3,20 <sup>NS</sup>	28,99 <sup>NS</sup>	24,53 <sup>NS</sup>
15	19,95 <sup>(-)</sup>	19,75 <sup>(-)</sup>	99,75 <sup>NS</sup>	98,75 <sup>NS</sup>	14,17 <sup>NS</sup>	14,82 <sup>NS</sup>	23,46 <sup>NS</sup>	7,04 <sup>(-)</sup>	3,39 <sup>NS</sup>	3,23 <sup>NS</sup>	25,56 <sup>NS</sup>	28,14 <sup>NS</sup>
20	20,00 <sup>(-)</sup>	20,00 <sup>(-)</sup>	100,00 <sup>NS</sup>	100,00 <sup>NS</sup>	14,50 <sup>NS</sup>	14,47 <sup>NS</sup>	23,42 <sup>NS</sup>	5,95 <sup>(-)</sup>	3,17 <sup>NS</sup>	2,71 <sup>NS</sup>	29,25 <sup>NS</sup>	24,25 <sup>NS</sup>
25	10,90 <sup>(-)</sup>	16,28 <sup>(-)</sup>	99,50 <sup>NS</sup>	97,75 <sup>NS</sup>	14,43 <sup>NS</sup>	14,30 <sup>NS</sup>	29,80 <sup>(+)</sup>	7,17 <sup>(-)</sup>	3,15 <sup>NS</sup>	3,89 <sup>NS</sup>	24,15 <sup>NS</sup>	28,88 <sup>NS</sup>
50	19,85 <sup>(-)</sup>	19,65 <sup>(-)</sup>	99,25 <sup>NS</sup>	98,25 <sup>NS</sup>	12,94 <sup>NS</sup>	14,28 <sup>NS</sup>	21,58 <sup>NS</sup>	7,74 <sup>(-)</sup>	3,60 <sup>NS</sup>	4,31 <sup>NS</sup>	21,18 <sup>NS</sup>	26,46 <sup>NS</sup>
Sem Extrato Bruto	25,00		100,00		14,50	16,70		3,75		31,25		

Médias seguidas por (+) foram superiores à testemunha absoluta, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). Médias seguidas por (-) foram inferiores à testemunha absoluta, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). NS - Médias não diferem da testemunha absoluta em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

Quando se utilizou o EB não-autoclavado, essa diminuição da VE (%) só foi observada a partir da concentração de 10%. Em termos de MF, verificou-se que apenas o EB autoclavado na concentração de 25% proporcionou um aumento em seu teor. Situação inversa foi observada quando se utilizou o EB não-autoclavado, sendo quase todos os valores inferiores à testemunha, de acordo com o teste Dunnett, em nível de 5% de probabilidade. Em relação à taxa de transmissão do patógeno, verificou-se que essa não teve qualquer influência do tratamento de imersão com EB, com exceção do EB não-autoclavado na concentração de 5%, cujo valor foi inferior à testemunha (18,89%).

As variáveis analisadas em laboratório (Tabela 5), quando submetidas ao teste Dunnett, revelaram efeito positivo do EB não-autoclavado em relação à colonização do patógeno nas sementes. Observou-se ainda que, com o aumento das concentrações, esse efeito protetor foi suavemente reduzido. Holetz et al. (2002) testaram os extratos de 13 plantas medicinais sobre microrganismos patogênicos ao homem, avaliando o MIC (concentração mínima inibitória), e observaram que os extratos que possuíam MIC abaixo de 100 mg/L apresentavam boa atividade antimicrobiana e, à medida que se aumentava o MIC (acima de 1000 mg/L), os extratos foram considerados inativos. Fiori et al. (2000) observaram que, em concentrações mais elevadas (25 e 50%) do extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* e *Eucalyptus citriodora*, houve decréscimos na porcentagem de inibição de crescimento micelial de *Didymella bryoniae*, o que pode provavelmente ser atribuído à concentração de algum fator de crescimento, o qual, em elevadas concentrações do extrato, passou a se constituir em um substrato, estimulando o desenvolvimento do patógeno.

**Tabela 5.** Efeito do tratamento de imersão em diferentes concentrações de extrato bruto autoclavado e não-autoclavado sobre as sementes de trigo infectadas com *B. sorokiniana*, em laboratório.

Concentrações do EB (%)	Autoclavado	Esterilizado por filtração
	Sementes infectadas(%)	
1	91,00 <sup>(+)</sup>	18,00 <sup>(-)</sup>
5	89,00 <sup>(+)</sup>	18,00 <sup>(-)</sup>
10	86,00 <sup>(+)</sup>	14,00 <sup>(-)</sup>
15	80,00 <sup>(+)</sup>	14,00 <sup>(-)</sup>
20	67,00 <sup>NS</sup>	26,00 <sup>(-)</sup>
25	92,00 <sup>(+)</sup>	27,00 <sup>(-)</sup>
50	78,00 <sup>(+)</sup>	28,00 <sup>(-)</sup>
Controle	69,00	

Médias seguidas por (+) foram superiores à testemunha absoluta, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). Médias seguidas por (-) foram inferiores à testemunha absoluta, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). NS - Médias não diferem da testemunha absoluta em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

O controle alternativo de patógenos transmitidos por sementes tem apresentado resultados promissores.

Esse controle pode envolver tanto o uso de microrganismos antagonistas quanto de extratos de plantas medicinais. Ao utilizarem-se microrganismos antagonistas (espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas*) na microbiolização de sementes de trigo no controle de *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis* e *Stagonospora nodorum*, em comparação com o tratamento químico iprodione + thiram, Luz (1998) verificou que as sementes microbiolizadas apresentaram uma menor porcentagem de sementes infectadas em relação ao tratamento químico. Já com plantas medicinais, Cruz et al. (1999b) verificaram que o óleo essencial de capim-limão e o extrato bruto a 10% (utilizado como infusão) foram eficientes no controle de *Penicillium*, *Rhizopus* e *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo, apresentando uma melhor porcentagem de germinação em relação à testemunha (água esterilizada). Entretanto, nas maiores concentrações, observou-se efeito alelopático.

#### Polvilhamento com folhas secas e fungicida iprodione + thiram

A análise de variância revelou que houve efeito significativo dos tratamentos (alternativo e químico), das dosagens e da interação (trat x dosagens) ( $P \leq 0,05$ ) realizadas em casa-de-vegetação, apenas para a variável taxa de transmissão do patógeno (Tt).

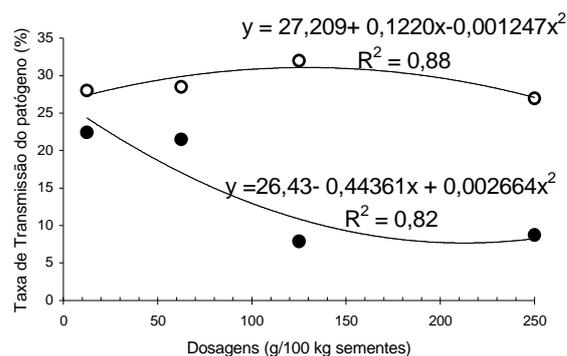
Por meio do teste Dunnett, em nível de 5% de probabilidade, verificou-se que, em laboratório, com exceção da dosagem de 62,5 g/100 kg sementes, todas as demais dosagens do tratamento alternativo diferenciaram-se da testemunha e foram inferiores a ela. Nas maiores dosagens (125 e 250 g/100 kg de sementes), observou-se ainda que a taxa de transmissão do patógeno, avaliada no controle alternativo, não se diferenciou do controle químico, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste F. Comportamento inverso ocorreu em casa-de-vegetação, verificando-se diferenças estatísticas entre os tratamentos quando as menores dosagens (12,5 e 62,5 g/100 g sementes) foram utilizadas (Tabela 6).

**Tabela 6.** Efeito das dosagens do polvilhamento com o extrato bruto de *O. gratissimum* (tratamento alternativo) e Iprodione+thiram (trat. químico) na taxa de transmissão de *B. sorokiniana* em plântulas de trigo e na porcentagem de sementes infectadas em laboratório.

Dosagens (g/100kg sementes)	Casa-de-vegetação		Laboratório	
	Taxa de transmissão (Tt%)		Sem. Infectadas (SI%)	
	Trat. Alternativo	Trat. Químico	Trat. Alternativo	Trat. Químico
12,5	28,10 A <sup>NS</sup>	22,30 A <sup>(-)</sup>	28,00 B <sup>(-)</sup>	51,30 A <sup>(-)</sup>
62,5	28,46 A <sup>NS</sup>	21,51 A <sup>(-)</sup>	69,00 A <sup>NS</sup>	26,00 B <sup>(-)</sup>
125	30,67 A <sup>NS</sup>	7,90 B <sup>(-)</sup>	27,00 A <sup>(-)</sup>	15,00 A <sup>(-)</sup>
250	26,86 A <sup>NS</sup>	9,00 B <sup>(-)</sup>	22,00 A <sup>(-)</sup>	8,00 A <sup>(-)</sup>
Controle	36,42		64,00	

Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si, pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade ( $P \leq 0,05$ ). Médias seguidas por (-) foram inferiores à testemunha absoluta, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). NS - Médias não diferem da testemunha absoluta, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

Pela análise de regressão, obtida do desdobramento da interação (trat. X dosagens), ajustaram-se curvas quadráticas tanto para o tratamento alternativo quanto para o tratamento químico (Figura 2). Enquanto o pó de folhas secas de *O. gratissimum* demonstrou maior potencial quando se utilizou a maior dosagem do material (250 g/100 kg sementes), verificou-se que o potencial de controle do fungicida foi crescente à medida que suas dosagens foram aumentadas.



**Figura 2.** Taxa de Transmissão (%) de *B. sorokiniana* em diferentes dosagens do pó de folhas secas de *O. gratissimum* (○) e do fungicida (iprodione + thiram) (●), em plântulas de trigo.

Luz (1998), ao trabalhar com microbiolização de sementes de trigo no controle de *Bipolaris sorokiniana*, *Pyricularia oryzae*, *Dreschlera tritici-repentis* e *Stagonospora nodorum*, verificou que esse tratamento mostrou eficiência superior (5-9%) em relação ao tratamento com fungicida sintético, quando avaliada a presença de fungos nas sementes. Pessoa *et al.* (1991) verificaram o efeito dos antagonistas *Streptomyces* sp., *Bacillus subtilis* e *Trichoderma viride* aplicados às sementes de trigo portadoras de *H. sativum*, em laboratório, e observaram maior eficiência quando se utilizou o antagonista *T. viride*, o qual reduziu significativamente a incidência do patógeno e não se diferenciou do tratamento com o fungicida padrão (iprodione + thiram).

Alternativas para o tratamento químico de sementes no controle de fitopatógenos são uma medida viável e promissora. As plantas medicinais apresentam características (não tóxicas; não poluentes) que podem contribuir para o seu uso na agricultura.

## Conclusão

A planta *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo), estudada neste trabalho, revelou-se promissora para a aplicação no tratamento de sementes, seja na forma de óleo essencial ou como pó das suas folhas secas.

## Referências

- AHMED, F. *et al.* Effect of fungicides against *Bipolaris oryzae* of rice under in vitro condition. *Pakistan J. Plant Pathol.*, Faisalabad, v. 1, n. 1, p. 4-7, 2002.
- ASTHANA, A; *et al.* Efficacy of *Ocimum* oil against fungi attacking chilli seed during storage. *Trop. Sci.*, San José, v. 49, p. 15-20, 1989.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 22, p. 441-443, 1997.
- BRANDARES, M.F.T. *et al.* Stability studies of essential Oils from some phillippine plants II. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. *Philippine J. Sci.*, Manila, v. 116, n. 4, p. 391-402, 1987.
- CAFARCHIA, C. *et al.* Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parassitologia*, Bari, v. 44, n. 3-4, p. 153-156, 2002.
- CRUZ, M.E.S. *et al.* Potencial de plantas medicinais no controle de patógenos que incidem sobre sementes de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1., 1999, Londrina. *Anais...* Londrina: Embrapa, 1999a. p. 459.
- CRUZ, M.E.S. *et al.* Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 23, p. 63, 1997. Resumos.
- CRUZ, M.E.S. *et al.* Água aromatizada de plantas medicinais no tratamento de sementes de trigo. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 24, p. 278. 1999b. Resumos.
- DAYYF, F. *et al.* The effects of plant extracts of *Reunoutria sachalinensis* on powder mildew development and leaf physiology of long English cucumber. *Plant Dis.*, St. Paul, v. 79, p. 577-580, 1995.
- DIKSHIT, A. *et al.* Cedrus oil – a promising storage fungitoxicant. *J. Stored Prod. Res.*, New York, v. 19, p. 159-162, 1983.
- HOLETZ, F.B. *et al.* Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1027-1031, 2002.
- FIORI, A.C.G. *et al.* Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicine plants against *Didymella bryoniae*. *J. Phytopathol.*, Berlin, v. 148, p. 483-487, 2000.
- FORCELINI, C.A. Tratamento de sementes de trigo no Brasil. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., 1991, Piracicaba, p. 247-264. 1991.
- LEMO, J. de A. *et al.* Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 55-58, 2005.
- LUZ, W.C da. Microbiolização das sementes: uma comparação com o tratamento químico no controle dos principais patógenos das sementes de trigo. *Pesq. Agropecu. Bras.*, Brasília, v. 33, n. 5, 1998.
- MATOS, F.J.A. *As plantas da farmácia viva*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1997.
- PESSOA, M.N.G. *Controle biológico de Bipolaris sorokiniana*

- em sementes de trigo (*Triticum aestivum*). 1993. Tese (Doutorado em Agronomia)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.
- PESSOA, M.N.G. et al. Controle de *Helminthosporium sativum* através do tratamento biológico de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 17, p. 22, 1991. Resumos.
- PESSOA, M.N.G. et al. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais sobre *Fusarium* spp. em sementes de milho. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 5., 1998, Ponta Grossa. *Anais...* Ponta Grossa, 1998.
- PRATES, L.G.; FERNANDES, J.M.C. Avaliando a taxa de expansão de lesões de *Bipolaris sorokiniana* em trigo. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 26, n. 2, p. 185-191, 2001.
- REIS, E.M. Patologia de sementes de cereais de inverno. São Paulo: Embrapa/CNDA, 1987.
- REIS, E.M. et al. *Estratégias para o controle de doenças do trigo*. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1988.
- REIS, E.M.; FORCELINI, C.A. Transmissão de *B. sorokiniana* em sementes para órgãos radiculares e aéreos do trigo. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.18, p. 76-85, 1993.
- SILVA, F et al. Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage period. *Pesq. Agropecu. Bras.*, Brasília, v. 40, n. 4, p. 323-328, 2005.
- STANGARLIN, J.R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnol.: Cienc. Desenv.*, Brasília, v. 11, p. 16-21, 1999.
- VALARINI, J. P. et al. Potencial da erva medicinal *Cymbopogon citratus* (capim-limão) no controle de fitopatógenos do feijociro. *Rev. Agríc.*, Piracicaba, v. 69, p. 139-150, 1994.
- ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *J. Phytopathol.*, Berlin, v. 144, p. 491-494, 1996.

Received on April 19, 2005.

Accepted on May 12, 2006.