



## EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DO FUNGO *FUSARIUM* *OXYSPORUM* E SEU EFEITO SOBRE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM PLANTAS DE MILHO

Plant extracts in the control of the fungus *Fusarium oxysporum* and its effect on  
arbuscular mycorrhizal fungi in maize plants

Mariana Moreira Domingos<sup>1</sup>, Rogério Melloni<sup>2</sup>, e Gustavo Magno dos Reis Ferreira<sup>3</sup>

### RESUMO

Com papel importante na agroecologia, extratos vegetais têm sido propostos como método alternativo aos agrotóxicos no controle de fitopatógenos, principalmente os do gênero *Fusarium*, mas questiona-se o seu efeito sobre fungos benéficos formadores de micorriza. Diante disso, o objetivo desse estudo foi compreender o efeito de extratos vegetais aquosos de *Mentha spicata*, *Tagetes patula*, *Cymbopogon nardus* e *Allium sativum* no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e na formação de micorriza, por diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), em condições controladas. Para a avaliação da atividade antifúngica dos extratos em *F. oxysporum*, prepararam-se os extratos aquosos nas concentrações de 0 e 10%, com posterior incorporação em meio de cultura BDA. Para análise da influência sobre a formação de micorriza, foram testadas as concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% do extrato aquoso de *Allium*, espécie de maior atividade antifúngica preliminar. Todas as concentrações apresentaram efeito negativo na formação de micorriza, em milho inoculado com *Gigaspora rosea* ou *Rhizophagus clarus*, principalmente para a primeira espécie de FMA.

**Palavras-chave:** *Fusarium* sp. Agroecologia. Fungos micorrízicos arbusculares.

### ABSTRACT

With an important role in agroecology, plant extracts have been proposed as an alternative method to pesticides in the control of phytopathogens, especially those of the *Fusarium* genus, but their effect on beneficial mycorrhiza-forming fungi is questioned. Therefore, the objective of this study was to verify the effect of aqueous plant extracts of *Mentha spicata*, *Tagetes patula*, *Cymbopogon nardus* and *Allium sativum*, on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and on the formation of mycorrhiza for different species of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), under controlled conditions. For the evaluation of the antifungal activity of the extracts in *F. oxysporum*, aqueous extracts were prepared in concentrations of 0 and 10%, with subsequent incorporation in PDA culture medium. For analysis of the influence on the formation of mycorrhiza, concentrations were tested of 2.5; 5.0; 7.5 and 10.0% of the *Allium* extract, with the highest previous antifungal activity. For all concentrations there was a negative effect on the formation of mycorrhiza, in corn inoculated with *Gigaspora rosea* or *Rhizophagus clarus*, mainly for the first AMF specie.

**Keywords:** *Fusarium* sp. Agroecology. Arbuscular Mycorrhizal Fungi.

<sup>1</sup> Engenheira agrônoma e mestre em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, da Unifei. E-mail: engmarianamoreira@gmail.com

<sup>2</sup> Professor do Instituto de Recursos Naturais - Área: Microbiologia ambiental. E-mail: rmelloni@unifei.edu.br

<sup>3</sup> Doutor em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Lavras. E-mail: gustavo\_mrf@yahoo.com.br

Recebido em: 01/09/2020

Aceito para publicação em: 22/01/2021

Correspondência para:  
engmarianamoreira@gmail.com

## Introdução

A utilização de agrotóxicos para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas tem sido questionada pela sociedade, em decorrência dos sérios problemas na agricultura, meio ambiente e saúde humana (LAMICHHANE et al., 2016). Diante dessa realidade e do avanço dos sistemas agroecológicos de produção, surgiu a necessidade de desenvolver práticas agrícolas de baixo impacto ambiental, que substituíssem os métodos convencionais de controle de pragas e doenças. Na busca por alternativas de controle menos agressivas, tem-se verificado que muitos extratos de plantas medicinais apresentam propriedades antifúngicas e bactericidas (VIEIRA et al., 2016).

Os benefícios do uso dos produtos naturais na agricultura são inúmeros. Segundo Ferraz et al. (2008) podem ser elencados: a) apresentam meia-vida curta, já que as estruturas químicas estão presentes na natureza e são, portanto, de fácil degradação; b) baixo risco do desenvolvimento de mecanismos de resistência, se os produtos forem aplicados na forma de extratos, com mais de um princípio ativo; c) possuem poucos halogênios em suas moléculas e, portanto, apresentam menor risco de impacto ambiental; e d) são derivados de recursos renováveis.

Vários extratos de plantas, como alho (*Allium sativum* L.), hortelã-comum (*Mentha piperita* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e cravo-de-defunto (*Tagetes patula* L.), já foram testados sobre fungos fitopatogênicos em diversos trabalhos (VENTUROSO et al., 2011; KOONA e BUDIDA, 2011; BIGATON et al., 2013; BONA et al., 2014; ARAUJO et al., 2019; BASSEGIO et al., 2019), mostrando seu potencial no controle de fitopatógenos.

Especificamente, o extrato de alho tem ação fungitóxica, em virtude da aliína (um aminoácido) formar a alicina (dialil-tiosulfato), a qual atua reduzindo o crescimento micelial, a germinação de esporos e de conídios e, ainda, induzindo ou ativando o mecanismo de defesa da planta (SOUZA e BLUM, 2013). A hortelã tem sido pesquisada tanto sob o ponto de vista agrônômico quanto químico, não somente pelo fato de potencializar seu conteúdo em óleo essencial, como também à variação dos constituintes importantes desses óleos (VALMORBIDA et al., 2006), sendo os monoterpenos (mentol, mentona, carvona, linalol e acetato de linalila) os componentes de maior valor econômico (DESCHAMPS et al., 2013). Já a citronela, tem sido utilizada na forma de óleo, como repelente, na indústria cosmética e farmacêutica (ROCHA et al., 2000), mas o seu óleo essencial contém componentes como citronelal (cerca de 40%), geraniol e limoneno, com fungitoxicidade devido à presença de monoterpenos e sesquiterpenos (OOTANI et al., 2011). Finalmente, do “cravo-de-defunto” se extrai o óleo essencial rico em terpenóides, flavonóides, alcalóides, tiofenos e ácidos graxos, com propriedades nematocida, inseticida, bactericida e fungicida (ROMAGNOLI et al., 2005).

Dentre os fungos de grande importância para a agricultura mundial, encontram-se os do gênero *Fusarium*, os quais podem colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos, por intermédio de seus conídios, que são disseminados pelo ar, pela água, equipamentos agrícolas, pela complexidade do sistema solo e pela diversidade de espécies existentes nesse ambiente (MILANESI, 2009). Como vários fitopatógenos, *F. oxysporum* é uma espécie com considerável variação morfológica e fisiológica, que infecta muitos hospedeiros, causando diversas doenças, com sintomas de clorose e queda prematura de folhas, redução do crescimento e, finalmente, murcha e morte das plantas (ARMSTRONG e ARMSTRONG, 1981).

Várias pesquisas têm sido relacionadas ao controle de *Fusarium* utilizando extratos e/ou óleos essenciais, como os de Souza et al. (2007), com extratos de alho e capim-santo, reduzindo o crescimento micelial e a germinação dos esporos; de Moraes et al. (2010), com inibição da germinação de conídios e o crescimento micelial do fungo, utilizando extratos de alho e agave; o de Venturoso et al. (2011), com atividade antifúngica, apenas com a utilização dos extratos aquosos de cravo-da-índia, alho e canela; por Diniz et al. (2008), utilizando o óleo essencial de hortelã, na inibição de *Fusarium* e outras espécies fúngicas; de Hussain et al. (2010), que observaram elevada ação fungitóxica do óleo essencial de hortelã-pimenta sobre o desenvolvimento de *F. solani*; o de Seixas et al. (2011), mostrando que óleo essencial de citronela reduziu em 100% o crescimento micelial do fungo *F. subglutinans*, além do trabalho de Rocha et al. (2020), que observaram efeito diferenciado do óleo de araçá-rosa (*Psidium cattleianum*) na germinação e doenças de feijoeiro provocadas por *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Dessa forma, tem sido relatado, na literatura, o efeito de diversos extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos e, indiretamente, na ocorrência de doenças. No entanto, o efeito desses extratos sobre fungos simbióticos obrigatórios, como os micorrízicos arbusculares (FMA), considerados

de grande importância na área agrícola, tem recebido menor atenção. Esses simbiontes formam micorriza e atuam como extensões do sistema radicular das plantas, aumentando sua capacidade em absorver nutrientes (principalmente os íons de baixa mobilidade no solo), melhorando seu estado nutricional e fisiológico. Os FMA possuem função ecológica bastante ampla, atuando, ainda, na ciclagem de nutrientes, na estabilidade de agregados do solo, na diminuição da ocorrência de doenças e na capacidade de suportar estresse hídrico (FOLLI-PEREIRA et al., 2012; CARDOSO e ANDREOTE, 2016; MOITINHO et al., 2020).

Nesse sentido, poucos estudos vêm sendo conduzidos sobre a influência dos metabólitos secundários no desenvolvimento de FMA, de modo a verificar efeitos na germinação dos esporos, no crescimento dos FMA nos tecidos internos das raízes, na formação de micélio extrarradicular e no estabelecimento da simbiose (BAINARD et al., 2009; FARIA et al., 2009; STEFFEN et al., 2012).

A manutenção de uma comunidade de FMAs diversa e ativa na rizosfera das plantas é importante para a sustentabilidade dos agrossistemas (BETHLENFALVAY e LINDERMAN, 1992). Em áreas onde ocorre a aplicação de compostos químicos de origem natural, como os extratos vegetais, a comunidade micorrízica pode ser afetada, tornando-se importante conhecer as espécies vegetais a serem escolhidas no controle fitossanitário dessas áreas, além de suas concentrações e doses.

Diante disso, objetivou-se compreender os efeitos da aplicação de diferentes concentrações de extratos aquosos de *Mentha spicata*, *Tagetes patula*, *Cymbopogon nardus* e *Allium sativum*, no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e na formação de micorriza por diferentes espécies de FMAs, em condições controladas.

## Metodologia

Folhas frescas de *Mentha spicata* L. (hortelã-comum) e *Tagetes patula* L. (cravo-de-defunto), partes aéreas de *Cymbopogon nardus* L. (citronela) e bulbos de *Allium sativum* L. (alho), foram coletados pela manhã, com o objetivo de eliminar o efeito temporal sobre o teor das substâncias bioativas sintetizadas pelas plantas (SILVA et al., 1999). A coleta foi realizada em uma propriedade de produção orgânica, situada na zona rural de Itajubá-MG (coordenadas: latitude 22° 22' 35.6" S e longitude 45° 33' 27.7" W). As folhas e os bulbos foram submetidos à triagem visível, com a finalidade de selecionar amostras íntegras (ausência de fungos, degradação por insetos, entre outros) e encaminhadas ao Centro de Estudos em Qualidade Ambiental (Cequam), na Universidade Federal de Itajubá, sul de Minas Gerais, para o processamento.

O material vegetal foi lavado com água corrente e disposto sobre papel toalha, em uma bancada para secagem, por um período de 12h. Em seguida, as folhas e os bulbos (sem casca) foram colocados em sacos de papel kraft e permaneceram em estufa de ventilação forçada a 45°C, até o peso constante. As amostras foram trituradas, separadamente, em um moinho de facas, até a obtenção de um pó fino, e armazenadas em frascos de vidro herméticos, em temperatura ambiente, para utilização em todos os ensaios (COSTA et al., 2005).

Para a obtenção do extrato aquoso, foram adicionados 100 mL de água destilada sobre 10g de biomassa seca, para resultar no extrato aquoso bruto (10% m/v), permanecendo por 24h em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e agitado 1 vez ao dia. Após esse período, foi realizada a filtração em papel filtro. O extrato resultante foi recolhido em um béquer e, a partir dele, foram feitas diluições em água destilada para as concentrações 10,0, 7,5, 5,0 e 2,5% m/v (GRISE et al., 2012). Os extratos aquosos, em todos os ensaios, foram utilizados no mesmo dia da filtração, permanecendo em refrigeração até o momento da aplicação.

### Avaliação da atividade antifúngica dos extratos vegetais em meio de cultura

Um isolado de *Fusarium oxysporum* foi obtido na Universidade Federal de Lavras (UFLA), no Departamento de Fitopatologia. Após a obtenção do isolado, discos de 5 mm do fungo foram repicados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), para obtenção de cultura pura. Em seguida, as placas foram identificadas e levadas em incubação, em câmara de crescimento, sob temperatura de 25°C ± 2 °C, por 10 dias, onde permaneceram até a condução do experimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 2, sendo 4 extratos aquosos (alho, citronela, hortelã e cravo-de-defunto) e duas concentrações de cada extrato (0 e 10,0%), onde a concentração 0 correspondeu ao tratamento controle. Foram usadas 4 repetições para avaliação do crescimento micelial, onde cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

Os extratos foram esterilizados por filtração em membrana Millipore, de 0,22 mm de diâmetro e incorporados em meio de cultura BDA, já autoclavado e semi-fundentes, para obter a concentração de 10,0%. Os meios de cultura contendo os extratos foram vertidos em placas de Petri e, após a sua solidificação, um disco de micélio (5 mm de diâmetro) do fitopatógeno, com 8 dias de idade, retirado de colônias puras, foi repicado para o centro de cada placa, que foram vedadas com filme plástico e colocadas em câmara de incubação a uma temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12h. O tratamento controle foi representado pelo cultivo dos discos de micélio do fungo, em meio à cultura pura.

As avaliações foram realizadas por meio da medição do diâmetro das colônias (mm) (média de duas medidas diretamente opostas), com um paquímetro manual no sentido horizontal e vertical da colônia, a cada 48 h a partir da instalação do experimento, perdurando até três avaliações (2, 4 e 6 dias de incubação), ou seja, até o momento em que as colônias fúngicas do tratamento testemunha atingiram toda a superfície do meio de cultura (7 dias após a montagem do teste). A partir dos dados obtidos, foi determinada a percentagem de inibição do crescimento micelial (PICM), por meio da fórmula abaixo, para cada tratamento, em relação ao tratamento controle (CELOTO, 2005).

$$\text{PICM} = [(DTE - DTR) / DTE] \times 100$$

Onde:

DTE = diâmetro do patógeno no tratamento testemunha;

DTR = diâmetro do patógeno no tratamento específico.

O extrato que apresentou maior inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* foi escolhido para a avaliação do seu efeito em fungos benéficos formadores de micorriza.

#### Avaliação do extrato vegetal na colonização radicular e crescimento da planta-teste

Para esse ensaio, os tratamentos constaram de duas espécies de FMA, previamente identificados como *Gigaspora rosea* e *Rhizophagus clarus*. Essas espécies fazem parte da coleção da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo, Departamento de Ciência do Solo, Laboratório de Microbiologia do Solo.

O experimento foi instalado e conduzido em casa de vegetação, com ventilação forçada de ar, sob temperatura controlada. Foi empregado delineamento inteiramente casualizado (DIC), organizado em esquema fatorial 2 x 5, sendo o fator 1 correspondente às duas espécies de FMA (*G. rosea* e *R. clarus*), e o fator 2 correspondente às cinco concentrações do extrato (0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0%), com 4 repetições por tratamento, totalizando 40 unidades experimentais.

Cada unidade experimental foi composta por recipientes plásticos de 700 cm<sup>3</sup>, os quais tiveram seu volume preenchido por uma mistura de amostra de solo e areia média, na proporção de 2:1, esterilizado em autoclave, ora denominado substrato. A esterilização das amostras de solo que receberam a inoculação foi realizada em autoclave, com elevada temperatura e pressão (121°C – 1 atm) por uma hora, seguida de repouso da amostra em temperatura ambiente durante a noite. Esse processo foi repetido por dois dias consecutivos.

As amostras de solo utilizadas tiveram origem de um Argissolo vermelho distrófico latossólico, de textura argilosa e média. Esse material foi coletado nas seguintes coordenadas: latitude 22°24'18.93" S e longitude 45°25'42.18" W, altitude 889 metros, em mediações do perímetro urbano da cidade de Itajubá-MG. As análises das amostras do solo foram realizadas para determinar sua composição química, conforme segue: pH 4,77, K 36,18 mg dm<sup>-3</sup>; P 1,62 mg dm<sup>-3</sup>; Ca 0,45 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg 0,23 cmolc dm<sup>-3</sup>; Al 1,36 cmolc dm<sup>-3</sup>; SB 0,77 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC efetiva 2,13 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC total 9,33 cmolc dm<sup>-3</sup>; V 8,46%; m 63,85%; Matéria orgânica 2,30 dag kg<sup>-1</sup>.

As amostras de solo foram coletadas a uma profundidade entre 0-10 cm, logo abaixo da camada de vegetação que compunha o local da coleta. Em seguida, esse material foi peneirado em partículas de

tamanho inferior a 2,0 mm e submetido à refrigeração ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) para a manutenção da umidade correspondente ao momento da coleta.

Cada substrato foi infestado com 50 esporos de FMA, veiculado por porções de terra do material recebido, a 1,5 cm de profundidade. Posteriormente, cada recipiente plástico recebeu, como planta-teste, três sementes de milho orgânico (*Zea mays* L.), variedade BRS Caimbé, previamente desinfestadas com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 1%, de acordo com Lazarotto et al. (2010). As sementes de milho orgânico foram utilizadas pelo fato de não receberem nenhum pré-tratamento com agrotóxicos.

Foram aplicados 60 mL de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND e ARNON, 1950), com 1/3 da dose de P, de forma a favorecer a colonização micorrízica da planta-teste (FERNANDES et al., 1987). A umidade dos substratos foi mantida em torno de 60% da capacidade de campo, sendo a sua correção feita com água destilada, após pesagens constantes. O número de sementes germinadas foi verificado 8 dias após a semeadura, quando realizado o desbaste para uma planta por vaso.

Cada extrato vegetal, nas suas respectivas concentrações, foi aplicado sobre o substrato dos tratamentos correspondentes, com uma pipeta graduada, em duas doses, aos dez e trinta dias após a semeadura. As plantas receberam 20 mL de extrato (FARIA et al., 2009) por vaso. Para o tratamento dose 0, foram aplicados 20 mL de água destilada por vaso, no mesmo dia da aplicação dos extratos.

As avaliações do experimento foram realizadas aos 45 dias, após a infestação do substrato. Para a avaliação do crescimento vegetal do milho foram determinadas e analisadas as seguintes variáveis: altura da muda (cm), massa da matéria seca da parte aérea (mg) e massa da matéria fresca das raízes (mg).

A altura foi determinada com paquímetro, sendo obtida pela distância do colo da planta até a extremidade das últimas axilas foliares. Posteriormente, separou-se a parte aérea do sistema radicular das plantas, cortando-se com tesoura o colo da planta rente à superfície do solo, e acondicionadas, individualmente, em sacos de papel devidamente identificados. A matéria seca da parte aérea do milho foi determinada após secagem em estufa de circulação de ar forçado, à temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram até peso constante. A massa da matéria fresca das raízes do milho foi determinada pesando-se a raiz, após lavagem em água corrente, e secagem à temperatura ambiente sobre papel toalha.

Após a pesagem da massa da matéria fresca das raízes, elas foram acondicionadas em frascos com álcool 70%, identificadas e armazenadas à temperatura ambiente. Para a colonização radicular pelos FMA, foi determinada a porcentagem de colonização micorrízica. As raízes finas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de álcool, cortadas com o auxílio de um bisturi em pedaços de 1cm, acondicionadas em cassetes plásticos identificados e imersas em solução de KOH 10%, em banho-maria a  $90^{\circ}\text{C}$  por 25 min. As amostras de raízes foram removidas do banho-maria, lavadas em água corrente e cobertas com ácido acético 7% ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) por 3 minutos, para acidificar, facilitando a posterior impregnação do corante "Trypan Blue". Após o processo de clareamento, as raízes foram lavadas em água corrente em abundância, para a remoção de todos os reagentes e, posteriormente, foram adicionadas em solução de azul de tripano 0,05%, ácido clorídrico 0,5% e glicerol, e fervidas em banho-maria a  $90^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, observando-se a intensidade da coloração das amostras (PHILLIPS e HAYMAN, 1970). Ao retirar as amostras do banho-maria, o excesso de corante foi descartado e as amostras de raízes coradas foram armazenadas em tubos, contendo solução de ácido láctico, água destilada e glicerina (1:1:1) até o momento da determinação da porcentagem e intensidade de colonização micorrízica.

Após a coloração das raízes, determinou-se a porcentagem de colonização micorrízica, com auxílio de microscópio estereoscópico (lupa), com aumento mínimo de 40x, utilizando o método de intercessão de linhas cruzadas (grid line method), com registro de segmentos radiculares colonizados e não colonizados (GIOVANETTI e MOSSE, 1980).

### Análises estatísticas

Os dados obtidos de todos os atributos analisados foram submetidos ao teste de normalidade por Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) (SHAPIRO e WILK, 1965) e à análise de variância pelo teste F (ANOVA), utilizando-se o software SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2011). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a  $p > 0,05$ , e as análises de regressão pelo mesmo software. Para os dados que não seguiram o pressuposto da normalidade, aplicou-se a transformação  $\sqrt{x+0,5}$  (STORCK et al., 2016).

## Resultados e discussão

### Avaliação da atividade antifúngica dos extratos vegetais em meio de cultura

Os resultados referentes à porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) de *F. oxysporum* pelos quatro extratos vegetais incorporados em meio de cultura sólida estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Efeito de extratos aquosos de *Allium sativum*, *Mentha spicata*, *Cymbopogon nardus* e *Tagetes patula* a 10,0% de concentração, na inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* em meio de cultura BDA *in vitro*. Itajubá-MG, 2019.

Tratamento	% Inibição do Crescimento Micelial
Testemunha	0,0 d
Extrato de <i>Allium sativum</i>	76,9 a
Extrato de <i>Mentha spicata</i>	54,7 b
Extrato de <i>Cymbopogon nardus</i>	22,7 c
Extrato de <i>Tagetes patula</i>	0,0 d
Coeficiente de variação (%)	25,2

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Os extratos aquosos de alho (*Allium sativum*), hortelã (*Mentha spicata*) e citronela (*Cymbopogon nardus*), na concentração padronizada de 10,0%, apresentaram maior porcentagem de inibição do *Fusarium oxysporum* em relação à testemunha, com diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 1). Observou-se que o melhor resultado foi obtido com o extrato de alho, que reduziu o crescimento micelial em 76,9%, diferindo estatisticamente das demais plantas testadas. Esse resultado reflete a possível existência de compostos secundários, biologicamente ativos, com capacidade de exercer ação antifúngica sobre o patógeno. Nesse sentido, a toxicidade de extratos vegetais de alho sobre patógenos, especificamente envolvendo fungos do gênero *Fusarium*, tem sido constatada por vários pesquisadores (STAUFFER et al., 2000; LORENZI e MATOS, 2008; MORAIS et al., 2010).

O extrato aquoso de hortelã promoveu 54,7% de inibição do crescimento micelial do fungo *F. oxysporum*, assim, juntamente com o extrato de alho, foram os que apresentaram maior potencial de utilização como método alternativo ao controle do fungo fitopatogênico. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2012), que constataram para o extrato de hortelã o controle do crescimento micelial dos seguintes fitopatógenos *C. gloeosporioides*, *P. oryzae* e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

O extrato de cravo-de-defunto não apresentou efeitos positivos na inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* (Tabela 1), diferindo dos resultados relatados por Maia et al. (2015) e Santos et al. (2016). Há de se destacar as divergências nos trabalhos que visam avaliar a atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento de fitopatógenos, mesmo àqueles que estudam a mesma planta.

Esses resultados podem estar associados às condições edafoclimáticas, em que as plantas foram cultivadas ou, ainda, à época em que foram coletadas, já que esses fatores têm sido relatados. Nesse sentido, Di Stasi (1996) destaca que a concentração de princípios ativos não se apresenta uniforme no decorrer do ciclo da planta, podendo apresentar variações conforme as condições de cultivo, a colheita e o processamento do material vegetal. Além disso, Rocha et al. (2020) também observaram efeito diferenciado da época de coleta de araçá-rosa (*Psidium cattleyanum*) na ação antifúngica a *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, com menor incidência de *A. flavus*, com uso de óleo puro, e no óleo de folhas novas e durante a floração.

### Efeito do extrato de alho na colonização micorrízica radicular e crescimento da planta-teste

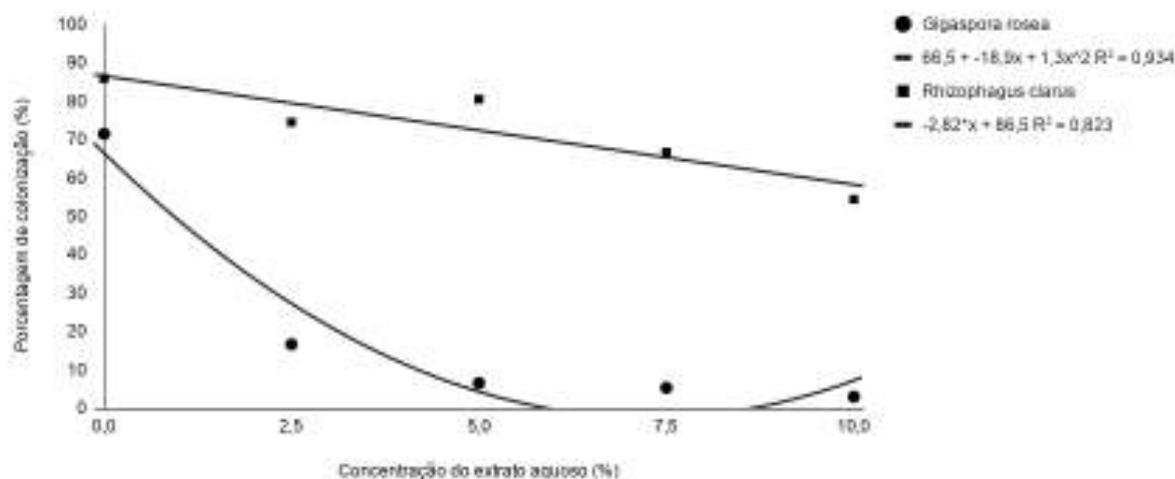
Os resultados da análise de variância mostraram interação significativa do efeito do extrato de alho e suas concentrações para a espécie fúngica e sua capacidade de formar micorriza (colonização) em milho. Houve efeito negativo das diferentes concentrações do extrato de alho na formação da micorriza pelos FMAs estudados (Tabela 2). Para *G. rosea*, houve redução acentuada na porcentagem de colonização micorrízica ao longo das concentrações, cujo comportamento pode ser representado por

regressão quadrática, enquanto para *R. clarus*, houve baixo efeito da formação de micorriza, com comportamento representado por regressão linear (Figura 1), sempre com os maiores valores de colonização em relação à primeira espécie (Tabela 2).

**Tabela 2.** Colonização micorrízica de plantas de milho frente às concentrações crescentes de extrato aquoso de alho (*Allium sativum*) aplicadas no substrato utilizado para o cultivo das plantas, aos dez e trinta dias após a semeadura. Itajubá-MG, 2019.

Concentração do extrato aquoso de <i>Allium sativum</i> (%) no substrato	Colonização de fungo micorrízico arbuscular (%)	
	<i>Gigaspora rosea</i>	<i>Rhizophagus clarus</i>
0	71,4029 a	85,8324 a
2,5	16,7107 b	74,4561 a
5,0	6,6367 b	80,4429 a
7,5	5,4374 b	66,6860 a
10,0	3,1231 b	54,4118 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, na linha, não diferem pelo teste de Scott-Knott a ( $p < 0,05$ ). Dados transformados em  $\sqrt{Y + 0,5}$ .



**Figura 1.** Relação entre o percentual de colonização micorrízica em raízes de plantas de milho, com doses crescentes de extrato de alho (*Allium sativum*), aplicadas sobre o substrato de crescimento das plantas. Itajubá-MG, 2019.

Esse resultado evidencia a variação da intensidade do impacto negativo das concentrações do extrato de alho e das doses aplicadas (10 e 30 dias após semeadura) na formação da micorriza pelos fungos estudados. Especificamente para *G. rosea*, a inibição total da formação de micorriza ocorre na dose aproximada de 5,9%, enquanto para *R. clarus* essa inibição ocorreria na dose aproximada de 30,6%. Tal resultado confirma a maior sensibilidade do primeiro às doses utilizadas de extrato de alho, cujos fatores de interferência são diversos, como discutidos a seguir. Deve-se enfatizar que as maiores taxas de colonização micorrízica nem sempre retratam maior efetividade ao hospedeiro. Essa, por sua vez, está relacionada aos benefícios adquiridos pelo vegetal com a presença do micobionte, tais como: maior crescimento, produtividade e absorção de nutrientes. Por outro lado, a colonização micorrízica pode contribuir na manutenção de propágulos de FMA no solo, aumentando, sobretudo, as chances de permanência no ambiente (SIQUEIRA et al., 2010; CARDOSO e ANDREOTE, 2016).

No entanto, a colonização micorrízica é uma característica que pode ser afetada, segundo Afek et al. (1990), por inúmeros fatores, como a espécie vegetal, a idade da planta, a densidade de raízes, número dos propágulos de FMA, a eficiência de colonização de FMA e o manejo do solo, dentre outros. Assim sendo, as diferentes concentrações do extrato aquoso de alho mostraram interferência variável na eficiência das espécies de FMAs em formarem micorriza, menos negativa para *Rhizophagus clarus* em relação à *Gigaspora rosea*. Para extratos de outras plantas, redução de colonização micorrízica e número

de esporos de FMA têm sido observados (PIOTROWSKIA et al., 2008; BAINARD et al., 2009; FARIA et al., 2009).

Quanto ao crescimento da planta teste inoculada com FMA e submetida a concentrações crescentes do extrato de alho, houve interação estatística significativa somente para o fator inoculação de FMA, para as variáveis altura de planta e massa da matéria seca da parte aérea, sem efeito das concentrações. Dessa forma, não houve efeito estatístico significativo desses fatores para a variável matéria fresca de raiz. Especificamente, houve diferença estatística significativa entre as duas espécies de FMA para altura de planta e massa da matéria seca da parte aérea (Figura 2). Os resultados mostraram que as plantas inoculadas com *Rhizophagus clarus* apresentaram aumento significativo no crescimento, quando comparadas às inoculadas com *Gigaspora rosea*, independentemente das concentrações de extrato de alho.

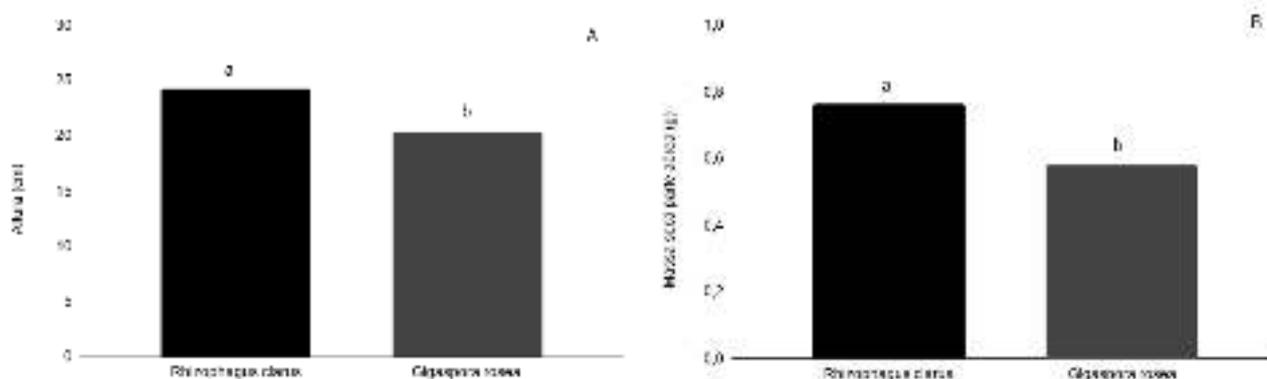


Figura 2. Crescimento do milho micorrizado com as espécies *Gigaspora rosea* e *Rhizophagus clarus*, independente das concentrações do extrato de alho. A- Altura de plantas de milho (cm). B- Massa da matéria seca da parte aérea (g). Médias com as mesmas letras não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Itajubá-MG, 2019.

Os efeitos da inoculação com FMA, segundo Smith e Read (1997), podem ser variados nas plantas hospedeiras. A colonização micorrízica pelo fungo *Gigaspora rosea* foi afetada negativamente e de forma mais contundente pelas concentrações do extrato de alho (Tabela 2 e figura 1), nas duas doses aplicadas, do que pelo fungo *Rhizophagus clarus*, o que influenciou o menor crescimento do milho inoculada com a primeira espécie.

Os maiores valores de massa da matéria seca da parte aérea, observados para as plantas inoculadas *Rhizophagus clarus*, provavelmente estão relacionados ao aumento da absorção de nutrientes, ocasionado pela maior colonização micorrízica e maior superfície de contato das hifas ao substrato, e a efeitos fitoprotetores que os fungos micorrízicos oferecem às plantas (BERBARA et al., 2006; GADD, 2007). Esses fatores propiciam um melhor desenvolvimento das plantas, e o aumento de altura refletirá em maior biomassa adquirida advinda da colonização.

## Conclusões

Os extratos aquosos de alho, hortelã e citronela, na concentração de 10,0%, apresentaram atividade inibitória sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* em meio de cultura BDA, onde o extrato de alho apresentou maior efeito na porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo. As concentrações do extrato aquoso de alho de 2,5 a 10,0%, interferiram negativamente na colonização micorrízica de plantas de milho.

A espécie *Rhizophagus clarus*, em relação à *Gigaspora rosea*, independentemente das concentrações, mostrou-se menos sensível e proporcionou maior colonização, altura e produção de massa de matéria seca da parte aérea das plantas de milho.

Novos estudos são recomendados, variando as concentrações do extrato aquoso de alho e o número de doses, para que sua ação fitopatogênica não atue, também, sobre fungos micorrízicos arbusculares e, conseqüentemente, na formação de micorriza de seus hospedeiros.

## Referências Bibliográficas

- AFEK, U.; RINALDELLI, E.; MENGE, J. A.; JOHNSON, E. L. V.; POND, E. Mycorrhizal inoculum influence colonization of cotton, onion and pepper seedlings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, n. 1, p. 938-942, 1990.
- ARAUJO, A. K. O.; GOMES, R. S. S.; SILVA, M. L. M.; SANTOS, A. M. S.; NASCIMENTO, L. C. Sanidade e qualidade fisiológica de sementes de *Chorisia Glaziovii* O. Kuntze tratadas com extratos vegetais. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 2, p. 649-659, 2019.
- ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. (Ed.). **Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy**. The Pennsylvania State University Press, University Park. 1981. p. 391-399.
- BAINARD, L. D.; BROWN, P. D.; UPADHYAYA, M. K. Inhibitory effect of tall hedge mustard (*Sisymbrium loeselii*) allelochemicals on rangeland plants and arbuscular mycorrhizal fungi. **Weed Science**, v. 57, n. 4, p. 386-393, 2009.
- BASSEGIO, E. R.; GIACOBBO, C. L.; GALON, L.; MILANESI, P.M. Compostos voláteis de óleos essenciais na inibição do desenvolvimento de *Monilinia fructicola* in vitro. **Revista de Ciências Agrárias**, v.42, n. 3, p. 761-766, 2019.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. Nutrição Mineral de Plantas. In: FERNANDES, M. S. **Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição**. Viçosa: SBCS. 2006. p. 432.
- BETHLENFALVAY, G. J.; LINDERMAN, R. G. **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison: American Society of Agronomy. 1992. p. 1-25.
- BIGATON, D.; BACCHI, L. M. A.; FORMAGIO, A. S. N.; GAVASSONI, W. L.; ZANELLA, C. S. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 4, p. 757-763, 2013.
- BONA, E. A. M.; SILVA, F. G.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016.
- CELOTO, M. I. B. **Atividade antifúngica de extratos de melão-são-caetano (*Momordica charantia* L.) sobre *Colletotrichum musae* (Berk. & Curtis) Arx**. 2005. Dissertação (Mestrado em área de concentração em Sistemas de Produção) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2005.
- COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.956-959, 2005.
- DESCHAMPS, C.; MONTEIRO, R.; MACHADO, M. P.; SCHEER, A. P.; COCCO, L.; YAMAMOTO, C. Avaliação de genótipos de *Mentha arvensis*, *Mentha x piperita* e *Mentha* spp. para produção de mentol. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 178- 183, 2013.
- DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L.C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudos multidisciplinar. São Paulo: Universidade Paulista. 1996. p. 109-127.
- DINIZ, S. P. S. S.; COELHO, J. S.; ROSA, G. S.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R. C.; OLIVEIRA, R. R. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fungos fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 4, p. 9- 11, 2008.
- FARIA, T. M.; GOMES, F. G.; SÁ, M. E.; CASSIOLATO, A. R. Efeitos alelopáticos de extratos vegetais na germinação, colonização micorrízica e crescimento inicial de milho, soja e feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 6, p. 1625-1633, 2009.
- FERNANDES, A. B.; SIQUEIRA, J.O.; MENEZES, M.A.; GUEDES, G.A.A. Efeito diferenciado do P sobre o estabelecimento e efetividade da simbiose endomicorrízica em milho e soja. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 11, n. 2, p. 101-108, 1987.
- FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; AMORA, D. X. Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA, A. K. N. (Ed). **Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas**. Panorama atual e perspectivas na agricultura. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008. 308 p.
- FERREIRA; D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FOLLI-PEREIRA, M. S.; MEIRA-HADDAD, L. S.; BAZZOLLI, D. M. S.; KASUYA, M. C.M. Micorriza Arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1663-1679, 2012.
- GADD, G. M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research**, v. 111, p. 3–49, 2007.
- GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500, 1980.
- GRISE, P. U.; GUALTIERI, S. C. J.; RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. Interferência alelopática da raiz de *Sapindus saponaria* e extratos aquosos de folhas maduras na germinação de diásporos e no crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Botânica**, v.35, n.1, p. 1-9, 2012.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method of growing plants without soil**. Berkeley: University of California. 1950. p. 32.
- HUSSAIN, A.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. Seasonal variation in content, chemical

- composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha species*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1827-1836, 2010.
- KOONA, S.; BUDIDA, S. Antibacterial potential of the extracts of the leaves of *Azadirachta indica* Linn. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 3, n. 1, p. 65-69, 2011.
- LAMICHHANE, J.R.; DACHBRODT-SAAAYDEH, S.; KUDSK, P.; MESSÉAN, A. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. **Plant Disease**, v.100, n.1, p. 10-24, 2016.
- LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M, F, B.; SANTOS, A, F. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.134-139, 2010.
- LORENZI, H.; MATTOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil** - Nativas e Exóticas. 2. ed., Nova Odessa: Plantarum. 2008.
- MAIA, T. F.; DONATO, A. D.; FRAGA, M. E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.17, n.1, p.105-116, 2015.
- MILANESI, P. M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema plantio direto**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- MOITINHO, M. R.; FERNANDES, C.; TRUBER, P. V.; VALENTE, A.; CORÁ, M. J. E.; BICALHO, E. S. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregation in a no-tillage system with crop rotation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 183, p. 482-491, 2020.
- MORAIS, M. S.; ARAÚJO, E.; ARAÚJO, A. C.; BELÉM, L. F. Eficiência dos extratos de alho e agave no controle de *Fusarium oxysporum* S. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, n. 2, p. 89-98, 2010.
- OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W. S.; MELLO, A. V.; DIDONET, J.; PORTELLA, A. C. F.; NASCIMENTO, I. R. Toxicidade de óleos essenciais de eucalipto e citronela sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Bioscience Journal**, v. 27, n. 4, p. 609-618, 2011.
- PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-161, Aug. 1970.
- PIOTROWSKIA, J. S.; MORFORD, S. L.; RILLIGA, M. C. Inhibition of colonization by a native arbuscular mycorrhizal fungal community via *Populus trichocarpa* litter, litter extract, and soluble phenolic compounds. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 709-717, 2008.
- ROCHA, S R.; MING, L. C.; MARQUES, M. M. Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composição do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowwitt). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 3, n. 1, p. 73-78. 2000.
- ROCHA, C. H.; AGOSTINETTO, L.; BOFF, P.; WERNER, S. S.; SOLDI, C.; BOFF, M. I. C. Óleo essencial de *Psidium cattleianum* no controle de fitopatógenos em sementes de feijão. **Revista Verde**, v. 15, p. 14-19, 2020.
- ROMAGNOLI, C.; BRUNI, R.; ANDREOTTI, E.; RAI, M.K.; VICENTINI, C.B.; MARES, D. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. **Protoplasma**, v. 225, p. 57- 65, 2005.
- SANTOS, P. C.; SANTOS, V. H. M.; MECINA, G. F.; ANDRADE, A. R.; FIGUEIREDO, P. A.; MORAES, V. M. O.; SILVA, L. P.; SILVA, R. M. G. Insecticidal activity of *Tagetes* sp. on *Sitophilus zeamais* Mots. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 2, n. 4, p. 31-38, 2016.
- SEIXAS, P. T. L.; CASTRO, H. C.; SANTOS, G. R.; CARDOSO, D. P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, especial, p. 523-526, 2011.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, London, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, dez. 1965.
- SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V.; SANTOS, D. I. P.; PESSOA, J. O. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de fitopatógenos. **Revista Verde**, v.7, n.1, p. 80 – 86, 2012.
- SILVA, V. M. G.; CRAVEIRO, A. A.; ABREU MATOS, F. J.; MACHADO, M. I. L.; ALENCAR, J. W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.
- SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. cap. 6. p. 153-214.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Micorrhizal Symbiosis**. London: Academic Press. 1997.
- SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 465-471, 2007.
- SOUZA, T. G.; BLUM, L. E. B. Uso de *Trichoderma harzianum* e condicionador orgânico de solo para controle da podridão por *Sclerotium rolfsii* em alho. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 1, p. 1616-1623, nov., 2013.
- STAUFFER, B. A.; ORREGO, F. A.; AQUINO, J. A. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y bactericida. **Revista Ciencia y Tecnología: Dirección de Investigaciones – UMA**, v. 1, n. 2, 2000.
- STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K.; SILVA, R. F. Óleo essencial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden no estímulo à micorrização de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth.). **Ciência Florestal**, v. 22, n.

1, p. 69-78, 2012.

STORCK, L.; GARCIA, D.C.; LOPES, S.J.; ESTEFANEL, V. **Experimentação Vegetal**. 3. ed. Santa Maria: UFSM. 2016.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C. S. F.; MARQUES, M. O. M.; FERRI, A. F. Rendimento e Composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 56-61, 2006.

VENTUROSO, L.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VIEIRA, B. A. H.; PRADO, J. S. M.; NECHET, K. L.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas. In: MORAES, R. M.; CERDEIRA, A. L.; DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; CANTRELL, C.; QUEIROZ, S. C. N. **Pesticidas naturais derivados de plantas: descoberta e usos**. Brasília: EMBRAPA, 2016. p. 523-524.