

JAIME ALEJANDRO MARTÍNEZ ACOSTA

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS DE *Trichoderma spp.* COM ATIVIDADE
ALELOPÁTICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica, para
obtenção do título *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M385a
2014
Martínez Acosta, Jaime Alejandro, 1988-
Análise de substâncias de *Trichoderma ssp.* com atividade
alelopática / Jaime Alejandro Martínez Acosta. – Viçosa, MG,
2014.
x, 68f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.45-50.

1. *Trichoderma*. 2. Alelopatia. 3. Sorgo. 4. Pepino.
5. Corda de viola. 6. Ácido deshidroacético.
7. Anidromevalonolactona. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em
Agroquímica. II. Título.

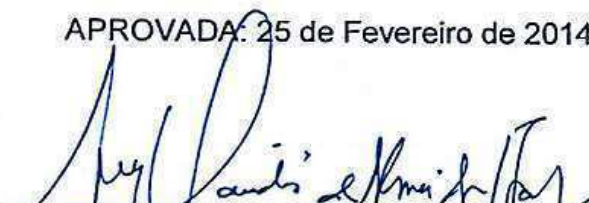
CDD 22. ed. 632.96

JAIME ALEJANDRO MARTÍNEZ ACOSTA

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS DE *Trichoderma* spp. COM ATIVIDADE
ALELOPÁTICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica, para
obtenção do título *Magister Scientiae*

APROVADA: 25 de Fevereiro de 2014.



Prof. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Coorientador)



Prof. Eduardo Vinícius Vieira Varejão



Prof. Antônio Lélis Pinheiro



Prof. Antônio Jacinto Demuner
(Orientador)

Dedicação:

A Deus, a força e amor da nossa vida.

A meu pai Jaime Martínez (†) que me ensinou que a educação e a base do êxito
e seu amor e conselho faz que continue adiante.

A minha mãe, avó e irmã seu apoio e amor me fazem melhor cada dia.

A Edna Gómez, seu apoio e amor são vitais neste caminho.

Família e grandes amigos.

Amo vocês....

AGRADECIMENTOS

O Deus, por me dar a vida e a oportunidade de cursar este mestrado e conhecer tanta gente linda.

A Jaime Martínez (†), meu amado pai por tudo.

A minha família, Edna Gómez, Rosa Acosta, Zulay Acosta, María Martínez, Gloria Acosta, Jaime Acosta, Luisa Acosta, Luisa María, Maria Alejandra, Clemencia, Andrés, Eduardo, Samy e Kitty pelo todo seu amor e carinho.

Ao Brasil, país lindo e cheio de gente boa que me recebeu da melhor forma e a Viçosa e sua gente.

À Universidade Federal de Viçosa e seu programa de convênios com universidade do exterior, sem ele não seria possível a chegada de estrangeiros cheios de desejos de superação.

Ao Professor Antônio Jacinto Demuner, caro orientador cheio de paciência e colaboração, suas dicas e conselhos fizeram possível este trabalho.

Aos membros da banca, os professores Antonio Lélis, Eduardo Varejão e Luiz Cláudio, pelas suas correções e apoio durante a defesa. Principalmente o Luiz que ajudo notavelmente na melhoria do texto e deu dicas excelentes para mim.

Aos integrantes do LASA, cada um cheio de grandes qualidades, gentileza e inteligência, ofereceram sempre toda sua ajuda e seu acompanhamento foi importante demais, principalmente o Diego, Eva, Ricardo, Ulisses e Jodieth, um agradecimento especial.

Aos Integrantes do MIC, gente boa demais, que me ajudaram muito na parte microbiológica, e sempre davam conselhos e cuidavam da gente, à profa. Catarina, Zé Maria e Mateus, um agradecimento especial.

As minhas colegas Maria Cecilia e Gabriella, que se enfrentaram comigo neste trabalho e ajudaram com grande alegria e carinho.

A Claudio Lima, Flavia, Anyela e Johanna, as primeira pessoas com quem teve contato no Brasil, sua ajuda, conselhos e carinho fizeram muito mais fácil minha estadia.

Às maravilhosas pessoas que conheci na minha estadia em Viçosa, Edna, Don Jon, Anyela, Dario, Diego, Blanca M., Paul, Álvaro, Flavia, Sebas, Manuel Ix, Manuel Tico, Astrid, Vivian, Alexander, Catalina e muitas mais, obrigado pela sua amizade.

A todos meus amigos na Colômbia, Daniel, Naty, Gerson, Pipe, Jhon Jairo, Andres, Omar, Lina, Luisa, Jennifer, Johan, Harvy, Julian, Sergio e Jonathan. Amo vocês.

À Universidade Tecnológica de Pereira e aos professores Oscar Marino e Luz Stella, na minha graduação fizeram de mim uma nova pessoa, e sem sua ajuda não estaria neste mestrado, eternamente agradecido.

A todos os professores que deram uma parte de seu conhecimento para eu ser melhor sempre.

A todos os funcionários da UFV pela sua ajuda em vários momentos, principalmente ao Zé Luiz e o Karl, pela sua ajuda e grande personalidade.

"No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer"

Goethe, W.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	9
3. METODOLOGIAS	10
3.1 Condições de cultivo de <i>Trichoderma spp.</i>	10
3.2. Extração líquido-líquido.....	13
3.3. Análise por cromatografia de gases acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	13
3.4. Preparação das soluções para os testes biológicos	14
3.5. Determinação da atividade alelopática	14
3.5.1. Teste de germinação	14
3.5.2. Teste de inibição do crescimento das plantas (teste de pote)	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.2. Extração de metabólitos de <i>Trichoderma spp.</i>	20
4.3. Determinação de atividade alelopática.	28
4.3.1. Teste de germinação.	28
4.3.2. Teste de crescimento de plantas (Teste em pote).....	34
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
APÊNDICES	51

LISTA DE ABREVIATURAS

%A	Porcentagem da área
%C	Porcentagem de crescimento
%simil.	Porcentagem de similaridade
C₀H₂O	Comprimento da raiz o do caule tratada com água somente em mm
m_{H₂O}	Massa seca da raiz o do caule tratada com água somente em mm
m₀	Massa seca da raiz o da parte aérea em g
C₀	Comprimento da raiz o do caule em mm
°C	Grau Celsius
A	Área
A_p	Área padronizada
BDA	Batata-Dextrose Ágar
BDC	Batata-Dextrose Caldo
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia de gases acoplada a espectrômetro de massas
CV	Porcentagem de coeficiente de variação
DMSO	Dimetil sulfóxido
EI	Electronic Impact (Impacto eletrônico)
g	Grama
h	Hora
IA*	Índice aritmético calculado
IA	Índice aritmético teórico

L	Litro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
m_{seca}	Massa seca
N/i	Não identificado
Ø	Diâmetro
PA	Parte aérea
pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
Ta	<i>Trichoderma auroeoviride</i>
Th	<i>Tichoderma harzianum</i>
TI	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
tr	Tempo de retenção
Tr	<i>Trichoderma ressei</i>
Tv	<i>Trichoderma viride</i>
uma	Unidade de massa atômica

RESUMO

MARTÍNEZ ACOSTA, Jaime Alejandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro, 2014. **Análise de substâncias de *Trichoderma spp.* com atividade alelopática.** Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Coorientadores: Luiz Claudio de Almeida Barbosa e Célia Regina Álvares Maltha.

Extratos das espécies *T. harzarium*, *T. viride*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum*, *T. aureoviride* demonstraram atividade alelopática em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) e pepino (*Cucumis sativus*) e sobre a planta daninha “Corda de Viola” (*Ipomoea grandifolia*). A maior inibição foi no sorgo, por encima de 20% tanto a caule como a raiz a concentrações entre 125 e 1000 mg L⁻¹, no teste de germinação, além do teste de crescimento inibindo a 50 mg L⁻¹. As plantas de pepino foram inibidas principalmente por os extratos de *T. reesei* e *T. longibrachiatum* em mais de um 20% a concentrações de acima de 250 mg L⁻¹ para a germinação, além disso, *T. aureoviride* atua induzindo seu crescimento em mais do 100% em todas as concentrações. Finalmente a *I. grandifolia* se vê afetada em seu crescimento inibindo-se pela ação de *T. reesei*, *T. longibrachiatum*, *T. aureoviride* e *T. viride*, e sendo induzida em mais do 100% a 100 mg L⁻¹ por *T. harzianum*. Estudos por CG-EM mostram alguns compostos nestes extratos foram principalmente o ácido desidroacético, a anidromevalonolactona e o 2-feniletanol, alguns não reportados em estas espécies.

ABSTRACT

MARTÍNEZ ACOSTA, Jaime Alejandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Analysis of substances of *Trichoderma* spp. with allelopathic activity**. Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Co-advisers: Luiz Claudio de Almeida Barbosa & Célia Regina Álvares Maltha.

Extracts of *T. harzarium*, *T. viride*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* and *T. aureoviride* species showed allelopathic activity in plants of sorghum (*Sorghum bicolor*), cucumber (*Cucumis sativus*) and the weed "Corda de Viola" (*Ipomoea grandifolia*). The inhibition of sorghum was greater, by 20% on top of both stem and root to concentrations between 125 and 1000 mg L⁻¹ on germination, besides the growth test at 50 mg L⁻¹. The cucumber plants were mostly inhibited by extracts of *T. longibrachiatum* and *T. ressei* in more than 20% at concentrations above 250 mg L⁻¹ for germination, furthermore *T. aureoviride* acts inducing growth more than 100% at all concentrations. Finally *Ipomoea grandifolia* is affected in their growth by inhibiting the action of *T. ressei*, *T. longibrachiatum*, *T. viride* and *T. aureoviride*, and being induced in more than 100 % to 100 mg L⁻¹ by *T. harzianum*. Studies by GC-MS showed some compounds in these extracts were mainly dehydroacetic acid, and the anhydromevalonic lactone and 2- phenylethanol, some not reported in these species.

1. INTRODUÇÃO

Algumas espécies de *Trichoderma* têm sido utilizadas como agente de controle biológico. Esse fungo, considerado um organismo simbiote oportunista avirulento, estabelece com as raízes das plantas uma associação simbiótica. As propriedades antagônicas desse fungo contra organismos fitopatogênicos são baseadas na ativação de múltiplos mecanismos, como competição por nutrientes e espaço, modificação das condições ambientais, ou promoção do crescimento de plantas (BENÍTEZ et al. 2004; VINALE et al. 2008a; VINALE et al. 2008b).

Trichoderma sp. é um fungo cosmopolita do solo e apresenta um rápido crescimento em diferentes condições ambientais. Este é resistente a compostos químicos nocivos e utiliza diversos substratos para seu crescimento micelial, além de ser considerado um importante decompositor da matéria orgânica vegetal (JAVOID et al. 2011).

A cultura de *Trichoderma sp.*, depende da quantidade de inóculo, do pH, da velocidade de agitação e da composição do meio, sendo fatores que exercem influência sobre a morfologia desse microrganismo. De fato, a morfologia micelial tem sido relacionada com o desempenho de culturas submersas, afetando principalmente a produtividade de metabólitos (AHAMED et al. 2009). O pH tem influência direta no crescimento micelial e na esporulação, enquanto que a concentração de carbono e relação carbono e nitrogênio (C:N) alteram o tempo de produção de esporos (AGOSIN et al. 1997).

A necessidade de aumentar a produtividade agrícola vem requerendo o uso crescente de fertilizantes químicos, os quais têm criado problemas sérios de

contaminação ambiental, relacionados com a eutrofização das águas, excesso nutritivo no solo, produção de substâncias nocivas como as nitrosoaminas (SHARPLEY et al. 1987). Nesse contexto, tem sido investigada a aplicação de fertilizantes e pesticidas de origem microbiana, para reduzir o impacto ecológico e muitas vezes aumentar a produtividade de alimentos agrícolas como, por exemplo, o milho, a soja e o feijão.

O gênero *Trichoderma* pode formar associações endofíticas e atuar contra outros microrganismos da rizosfera, além de mostrar um efeito direto no crescimento da planta. Esse efeito benéfico pode ser visto na capacidade de absorção de nutrientes e água do solo, na taxa de germinação das sementes e ou na defesa da planta contra danos bióticos e abióticos (HERMOSA et al. 2012).

A interação simbiótica entre planta-microrganismo está relacionada à produção de compostos específicos reguladores do crescimento de plantas, enzimas hidrolíticas, sideroporas e antibióticos (BENÍTEZ et al. 2004; REINO et al. 2008; VINALE et al. 2008a). Zeatina e giberelina GA3 (fatores do crescimento semelhantes às citoquininas); ácidos glucorônico, cítrico e fumárico (modificadores da acidez do solo); enzimas estimulantes da produção de fitoalexinas (Indutores) como a fenilalanina amônio liase, chalcona sintetase e antifúngicas como as quitinases e glucanases são alguns metabolitos produzidos por *Trichoderma sp.* que estão relacionados com o desenvolvimento vegetal (STACEY et al. 1996; BENÍTEZ et al. 2004).

T. virens, *T. viridee* *T. harzianum* têm sido utilizados como antagonistas de organismos fitopatogênicos para o controle das doenças de plantas (BENÍTEZ et al. 2004). Os mecanismos de ação dependem, em grande parte, das características

físico-químicas do solo. Uma de suas habilidades é a de produzir metabólitos capazes de impedir a germinação de esporos e matar as células para que os patógenos não se desenvolvam (BENÍTEZ et al. 2004). Estudos realizados com *T. virens* têm resultados positivos no controle de *Pythium ultimum* que infecta o algodão e *Rizoctonia solani* que infecta o tabaco (BENÍTEZ et al. 2004). *T. harzianum* contra *Verticillium dahliae* que infeta a cultura de batatas (CHET et al. 1994; BENÍTEZ et al. 2004), *Botrytis cinerea* que infeta talos, flores, frutos e folhas de diversos tipos de culturas (ZIMAND et al. 1996; REINO et al. 2008) e *Phytophthora capsici*, causadora do apodrecimento de pimenta (AHMED et al. 1999).

Os compostos voláteis de *Trichoderma sp.* (Figura 1) são de especial importância no estudo dos metabólitos destes fungos, principalmente devido à rápida ação biocida. Compostos como etileno, cianeto de hidrogênio, sesquiterpenos acoranos (I, II e III), monoterpenos (Felandreno –IV e Curcumeno VII), álcoois (Octan-3-ol -VI), aldeídos, cetonas (Octan-3-ona –V) e ésteres acima de 4 átomos de carbono têm sido isolados e testados em diversos tipos de bactérias, pragas e outros fungos (KESZLER et al. 2000; STOPPACHER et al. 2011). Em outros estudos com *Trichoderma sp.*, foram identificados compostos do tipo pironas, 6-pentil- α -pirona (VIII) e 5,5'-dimetil-2H-piran-2-ona como metabólitos secundários (RAMOS et al. 2008; REINO et al. 2008).

Os metabólitos voláteis, têm certa vantagem na capacidade de atuar sinergicamente com as enzimas extracelulares, também secretadas por *Trichoderma sp.*, mostrando um mecanismo de ação complexo, mas eficiente (BENÍTEZ et al. 2004; DOS SANTOS 2008)

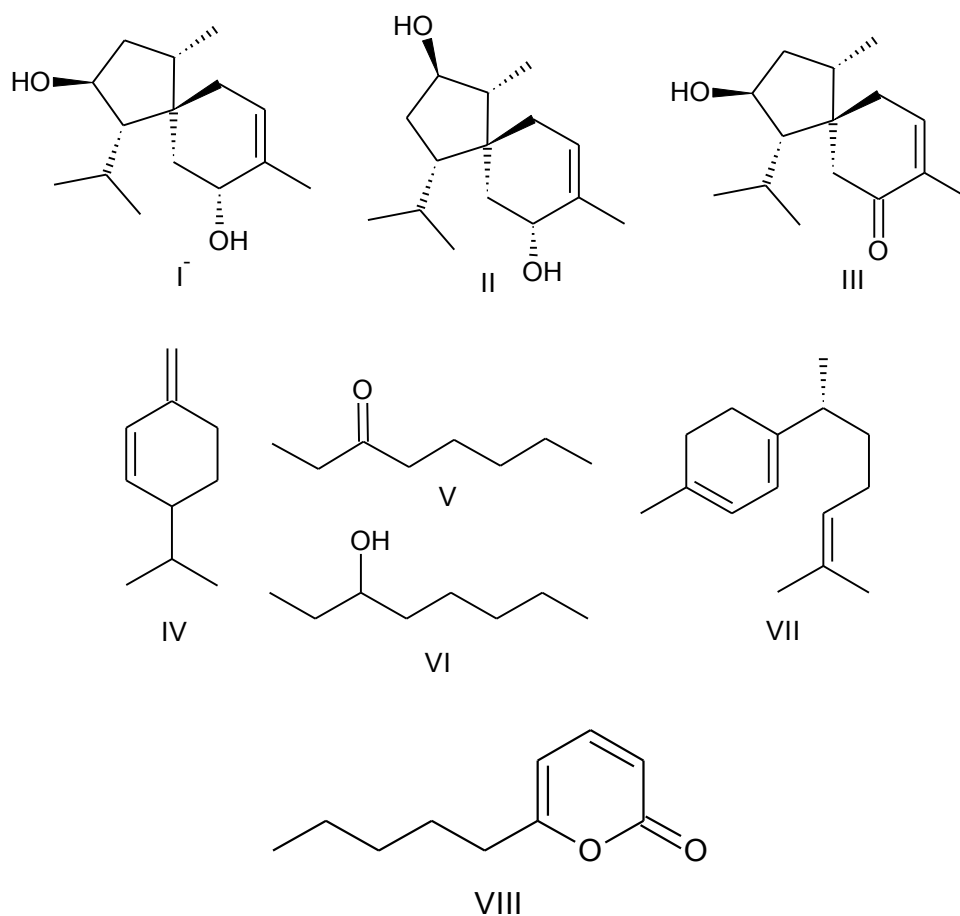


Figura 1: Metabólitos secundários voláteis produzidos por *Trichoderma sp.*

Compostos da classe das pironas, principalmente 6-pentil- α -pirona, apresentam inibição sobre *Fusarium subglutinans* e *Fusarium oxysporum* (ACEVE et al. 2004; REINO et al. 2008). Essa pirona demonstra teratividade semelhante às auxinas em ervilha e afeta a germinação de sementes de tomate e canola. Estudos *in planta* mostraram uma diminuição da sintomatologia por infecção por suspensão de esporos de *B. cinerea* e *Leptosphaeria maculans* após aplicação deste composto (VINALE et al. 2008b). Além disso, o derivado 6-(1'-pentenil)-2H-piran-2-ona (IX) (Figura 2), mostra inibição do crescimento de *Penicillium sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*;

massoillactona (X) e δ -decanolactona (XI) inibem o desenvolvimento de *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, além de controlar os danos em plantas produzidos por *Botrytis phytophthora*. Finalmente, o composto viridepirona (XII), isolado de culturas de *T. viride*, mostra atividade contra *Sclerotium rolfsii*(REINO et al. 2008).

Estes últimos compostos mencionados são de especial interesse neste estudo, revelando importantes usos ao nível industrial como aromatizante (odor a coco no caso da pirona), para controle biológico de culturas de plantas e por suas atividades biológicas, principalmente atividade antibiótica (ACEVE et al. 2004; BENÍTEZ et al. 2004; RAMOS et al. 2008; RAMOS et al. 2009).

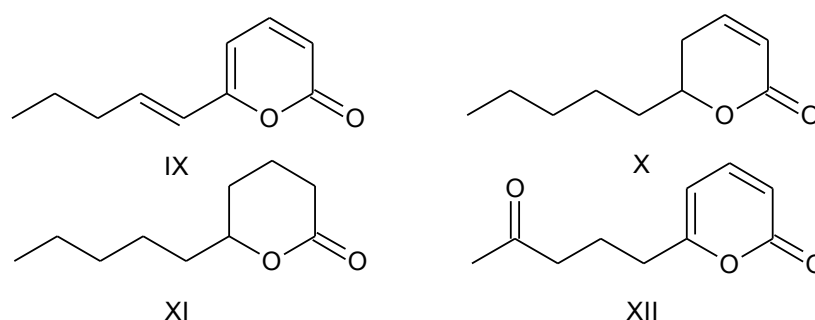


Figura 2: Compostos derivados da 6-pentil- α -pirona.

Além do controle do crescimento de microrganismos, *Trichoderma sp.* têm mecanismos de interação com plantas (Figura3) que permitem um melhor desenvolvimento destas. Diferentes sinais bioquímicos, incluem a produção de diferentes compostos que atuam como indutores de hormônios vegetais (Etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico)e que funcionam como ativadores das defesas químicas das plantas. Os peptídeos alameticina, produzida por *T. viride*, tricokonina, sintetizada por *T. pseudokoningii*, 6-pentil- α -pirona, harzianolida(XIII) e

harzianopiridona (XIV) são exemplos de alguns destes compostos (Figura 4)(HERMOSA et al. 2012).

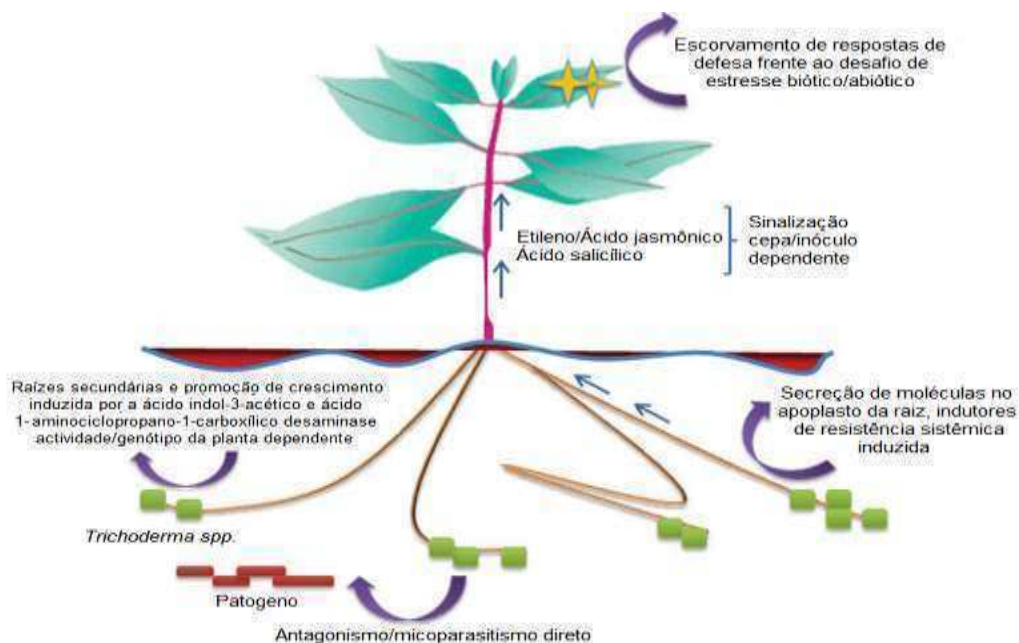


Figura3: Esquema das interações planta-*Trichoderma spe* os sinais moleculares(HERMOSA et al. 2012).

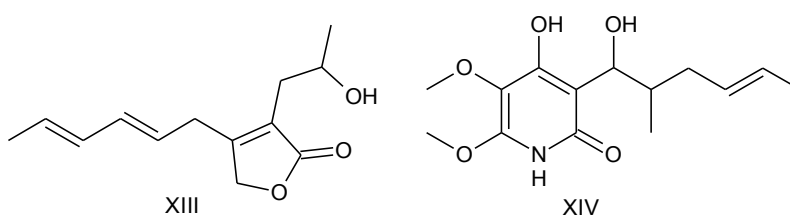


Figura 4: Indutores de resistência de plantas produzidos por *Trichoderma sp.*

Uma das funções mais estudadas de *Trichoderma sp.* é a promoção do crescimento das raízes e da parte aérea de plantas de valor comercial. Além disso, aumenta a produtividade, melhora a qualidade dos frutos, o crescimento de raízes secundárias e o peso fresco das plântulas (HERMOSA et al. 2012).

Alguns reportes de atividades alelopáticas mostram que *T. harzarium* têm atividades positivas em plantas de tabaco, tomate, algodão, soja, pimenta, feijão e milho. Além disso, tem a capacidade de facilitar a absorção dos nutrientes ao solubilizá-los, aumentando a quantidade de massa seca do pepineiro e produção de análogos às auxinas (HARMAN 2000; BENÍTEZ et al. 2004; DOS SANTOS 2008; HOYOS-CARVAJAL et al. 2009; RAHMAN et al. 2012). Outros compostos de interesse alelopático (Figura 5) são o ácido harziânico (XV), que é conhecido por ter atividade antifúngica e afeta o crescimento de plantas de pepino e canola (VINALE et al. 2009). O viridol (XVI) é proveniente de *T. virens* usado contra plantas daninhas do algodão e do arroz (HOWELL et al. 1984; ELYASHBERG et al. 2010). Além disso, essa espécie compete pela rizosfera do meio, reduzindo as plantas daninhas em plantios de tomate. Também é um promotor do crescimento do feijão e *Arabidopsis thaliana* (HÉRAUX et al. 2005; CONTRERAS-CORNEJO et al. 2009; HOYOS-CARVAJAL et al. 2009).

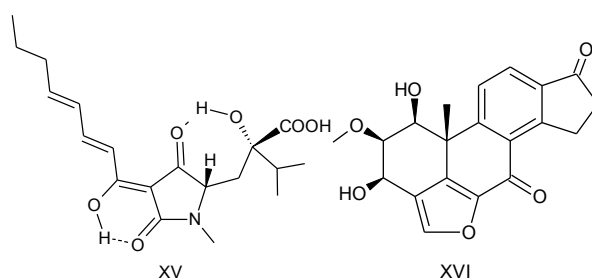


Figura 5: Compostos produzidos por *Trichoderma* com atividade alelopática.

Outro tipo de atividade de *Trichoderma* sp., é a inibição das larvas do nematóide *Meloidogyne javanica* (QURESHI et al. 2012). *T. harzianum*, especialmente, tem sido mais amplamente estudado no caso da atividade

nematicida contra essa espécie, diminuindo o nível de eclosão dos ovos (SIDDIQI et al. 2003; SAHEBANI et al. 2008). Poucos compostos foram isolados de *Trichoderma sp.*, entre eles a trichodermina (XVII) (Figura 6) e a 6-pentil- α -pirona, com capacidade de matar as larvas de *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans* e *Bursaphelenchus xylophilus* (YANG et al. 2010; YANG et al. 2012).

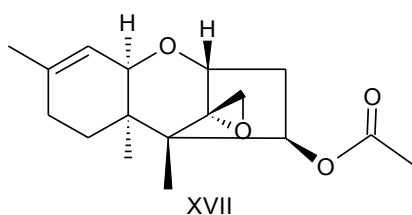


Figura 6: Trichodermin produzida por *Trichoderma sp.*

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O estudo da relação simbiótica entre planta-fungo tem sido bastante investigado para reduzir a aplicação de defensivos agrícolas. *Trichoderma sp.* e/ou seus metabólitos secundários tem mostrado atividade contra microrganismos fitopatogênicos. Essa ação deve-se à produção de antibióticos e compostos alelopáticos ou ainda ao aumentada resistência da planta à invasão de patógenos. Além disso, estudos agrícolas são muito importantes para a área de desenvolvimento em produtos naturais, devido à crescente demanda de alimentos e desenvolvimento de produtos de interesse industriais. Assim esse trabalho tem como objetivo a realização de extrações e identificação dos compostos das culturas de diferentes espécies de *Trichodermaspe* avaliação da atividade alelopáticados extratos em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), pepino (*Cucumis sativus*) e corda de viola(*Ipomoea grandifolia*).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Condições de cultivo de *Trichoderma spp.*

Foram utilizadas nesse trabalho as culturas *T. harzianum* (CCT1202), *T. longibrachiatum* (CCT2771), *T. ressei* (CCT2768), *T. aureoviride* (CCT4567) que foram obtidas da Fundação Andre Tosello (Campinas – SP) e *T. viride* pertencente à coleção do laboratório de Associações Micorrízicas da Universidade Federal de Viçosa. Esses fungos foram mantidos em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA, SIGMA) a 25 °C.

Para determinar a taxa de crescimento e a produção de metabólitos, as culturas de *Trichoderma spp.*, foram cultivadas em diferentes meios: BDA, batata-dextrose-caldo (BDC, SIGMA), ágar aveia, ágar de extrato de malte (MERCK) e em meio líquido de Fries¹(VAN-ETTEN et al. 1980). Os extratos fúngicos foram analisados, inicialmente, em cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando hexano(SIGMA) e acetato de etila (SIGMA) (1:1) como fase móvel. Para isso realizou-se uma extração simples com éter dietílico (SIGMA).

Em seguida, foi realizado uma comparação de crescimento e produção de extrato nos meios BDC e Fries, usando *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* e *T. ressei*. Para isso, foram assepticamente transferidos discos do micélio ($\varnothing = 10$ mm) provenientes da periferia de culturas em crescimento em meio BDA com 7 dias de cultura, para outras duas placas de Petri com o mesmo meio deixando mais 7 dias. Todo o micélio fúngico crescido foi levado a 500 mL dos meios líquidos BDC,

¹ Sacarose 30 g; Tartarato de amônio 5 g; NH_4NO_3 1 g; KH_2PO_4 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; NaCl 0,1 g; CaCl_2 0,1 g; Extrato de levedura 0,5 g; H_2O 1 L.

Fries, BDC+elicitor e Fries+elicitor. O composto elicitor foi o ácido nicotínico (150 mg L⁻¹, SIGMA). O cultivo foi realizado em um erlenmeyer com capacidade de 2 L por 7 dias (Figura 7). Em todas as etapas, a incubação foi realizada na ausência de luz, a 25 °C, pH de 5,6 ± 0,2. Os meios de cultura com crescimento fúngico foram filtrados a vácuo e armazenados a 4 °C para posterior análise. O micélio retido no papel de filtro foi macerado em água por 5 minutos, deixado no ultrassom por 1 h e em repouso escuro por 24 h. Posteriormente, esse material foi filtrado novamente e o volume da primeira e da segunda filtração foi misturado. O micélio retido no filtro foi secado a 60 °C por 24 h e pesado (Figura 8).

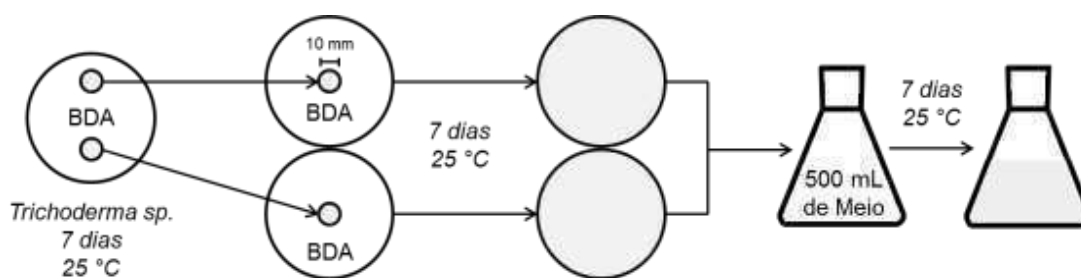


Figura 7: Esquema utilizado no cultivo de *Trichoderma spp.* visando a comparação entre os meios líquidos BDC e Fries com e sem Indutor.

Para produção de maior biomassa, todas as culturas estudadas foram tratadas de igual forma, mas usando neste caso três placas de Petri com meio BDA a meia força. O micélio fúngico crescido depois de 7 dias foi levado a 300 mL de meio BDC a meia força cultivando por outros 7 dias num erlenmeyer de 1 L. Após esse período, esse volume foi transferido para 1700 mL do mesmo meio e incubado por mais 7 dias num erlenmeyer de 4 L (Figura 9), este procedimento foi

realizado duas vezes. Em todas as etapas a incubação foi realizada na ausência de luz, a 25 °C, pH 5,6 ± 0,2 e agitação de 100 rpm,procedendo-se à filtração como mencionado anteriormente (Figura 8).

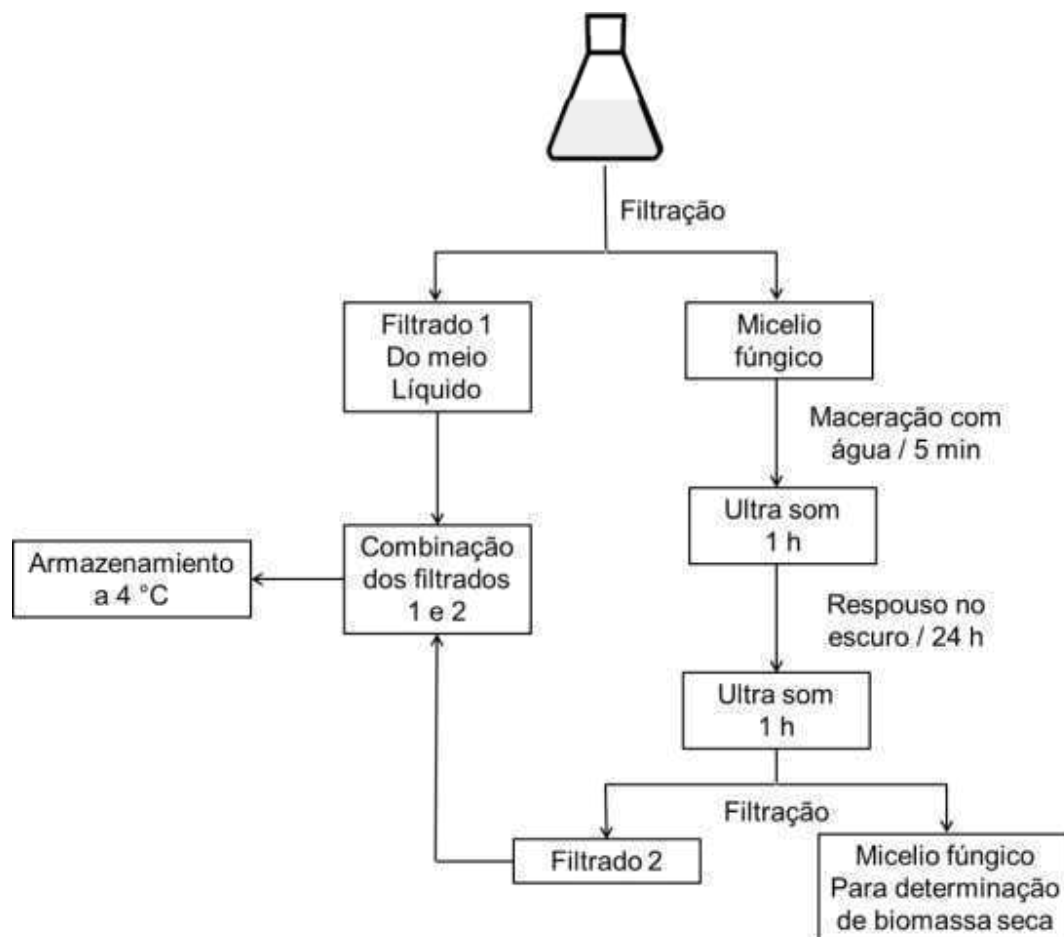


Figura 8: Esquema da filtração depois da incubação de *Trichoderma spp.* nos meios líquidos.

260 °C (mantido 5 min). Parâmetros do detector de massas foram ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV, fonte 230 °C, quadrupolo 150 °C e escâner total (45-400 uma) de acordo como descrito em STOPPACHER et al. (2011).

3.4. Preparação das soluções para os testes biológicos

Os extratos secos foram dissolvidos em DMSO a 0,5%(v/v) e mantidos no sonificador por 10 minutos. Dessa solução de 1000 mgL⁻¹ foram preparadas diluições sucessivas com água destilada nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 mgL⁻¹.

3.5. Determinação da atividade alelopática

3.5.1. Teste de germinação

Foram testados os extratos obtidos dos cinco fungos sobre a germinação de sementes de *Cucumis sativus* (pepino) e *Sorghum bicolor*(sorgo). O procedimento geral consistiu em cultivar 20 sementes de cada planta em placas de petri com papel de germinação Germitest[®] e 5 mL de solução do extrato a avaliar (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 32 mgL⁻¹). Depois de 7 dias de germinação a 25 °C os brotos, a raiz e o caule foram fotografados e medidos no software Photomed 1.0[®]. As análises foram realizadas em triplicata utilizando-se como controle de germinação a água e DMSO 0,5% (v/v). O experimento foi conduzido com três repetições para cada uma das concentrações testadas em delineamento inteiramente casualizado. Finalmente foi analisada a variação no crescimento das plantas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Depois, foram calculadas as porcentagens de crescimento das raízes e caules das plantas tratadas com os extratos, respeito ao tratamento controle com água, segundo a equação (1); o resultado negativo indica inibição do crescimento e o positivo indução do crescimento.

Onde:

% C é a porcentagem de crescimento

$$\%C = - \left(\frac{(L_1 - L_{H_2O})}{L_{H_2O}} \times 100 \right) \quad (1)$$

L_1 é o comprimento da raiz o do caule em mm

L_{H_2O} é o comprimento da raiz o do caule em mm

tratada com água somente

Equação 1: Porcentagem da crescimentopara o teste de germinação

3.5.2. Teste de inibição do crescimento das plantas (teste de pote)

Foi realizado um teste de crescimento de plantas usando soluções dos extratos e como testemunhas o controle de inibição o herbicida Dual[®], água e a solução de DMSO 0,5% (v/v). A cultura das plantas foi realizada na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da UFV. As espécies de plantas foram escolhidas de acordo com a disponibilidade à época dos testes. Três espécies foram utilizadas: sorgo, pepino e a planta daninha *pomoea grandifolia* (corda de viola). O experimento foi conduzido com quatro repetições para cada uma das concentrações testadas em delineamento inteiramente casualizado. As soluções usadas foram 50, 100 e 500 mgL⁻¹.

Foram usados potes de plástico com capacidade de 50 mL totalmente preenchidos com aproximadamente 70 g de areia lavada (substrato isento de qualquer tipo de matéria orgânica, obtido pelo tratamento prévio da areia com ácido sulfúrico concentrado). Sementes pré-germinadas de cada planta (5

sementes por pote) foram acondicionadas a aproximadamente 1 cm abaixo do nível superior de areia e em seguida os potes foram saturados com 5,0 mL da solução a ser testada nas concentrações descritas anteriormente.

As plantas foram cultivadas em estufa durante 21 dias, sendo irrigadas com água várias vezes ao dia para manter a umidade. A cada dois dias as plantas recebiam doses de nutrientes através da aplicação da solução de Hoagland^{®2} à meia força (HEEG et al. 2008).

Decorridos os 21 dias, as plantas foram colhidas e tiveram as raízes e as partes aéreas separadas e acondicionadas em sacos de papel. Esse material foi mantido em estufa de ventilação forçada a 70 °C até que se obtivesse massa constante.

A porcentagem de crescimento da raiz e do caule foi calculada em relação à biomassa do tratamento controle com água, segundo a equação (2). Os dados foram analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). De igual forma, o resultado negativo indica inibição do crescimento e o positivo indução do crescimento.

Onde:

% C é a porcentagem de crescimento

$$\%C = - \left(\frac{(m_1 - m_{H_2O})}{m_{H_2O}} \times 100 \right) \quad (2)$$

m_1 é a massa seca da raiz ou da parte aérea em g,
 m_{H_2O} é a massa seca da raiz ou do caule em g,
tratada com água somente

Equação 2: Porcentagem de crescimento para o teste de crescimento de plantas

²Ca(NO₃)₂ X 4H₂O 2,0 mM; KNO₃ 2,0 mM; NH₄NO₃ 0,5 mM; MgSO₄ X 7H₂O 0,5 mM; KH₂PO₄ 0,25 mM; Fe-EDTA 40 µM; H₃BO₃ 25 µM; MnCl₂ X 4H₂O 2,0 µM; ZnSO₄ X 7 H₂O 2,0 µM; CuSO₄ X 5 H₂O 0,5 µM; KCl 50 µM; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ X 4H₂O 0,075 µM; CoCl₂ X 6 H₂O 0,15 µM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação das condições de cultura.

Considerando apenas o diâmetro da colônia, *T. harzianum* e *T. aureoviride* tiveram uma maior taxa de crescimento que *T. ressei* e *T. longibrachiatum*, ao longo de 10 dias de cultivo e em todos os meios testados. Esses dois últimos apresentaram um crescimento intermediário e produziram uma coloração amarelada, típico dessas culturas (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al. 2012). Essa cor pode ser devido à síntese de pigmentos por essas culturas. *T. viride* tem crescimento mais lento em relação às outras culturas.

Não foi detectado por cromatografia em camada delgada (CCD) nenhum composto quando as culturas fúngicas foram incubadas em aveia ágar e ágar em extrato de malte, embora nesses meios tenha sido observado um bom desenvolvimento dos fungos. Isso pode ser devido à limitação da técnica, pouco tempo de incubação, condições de cultivo ou baixa afinidade dos compostos pelo solvente de extração. Por essa mesma técnica, foram observados diferentes tipos de compostos com polaridades muito variadas a partir do quarto dia de incubação, nos meios BDA, BDC e Fries.

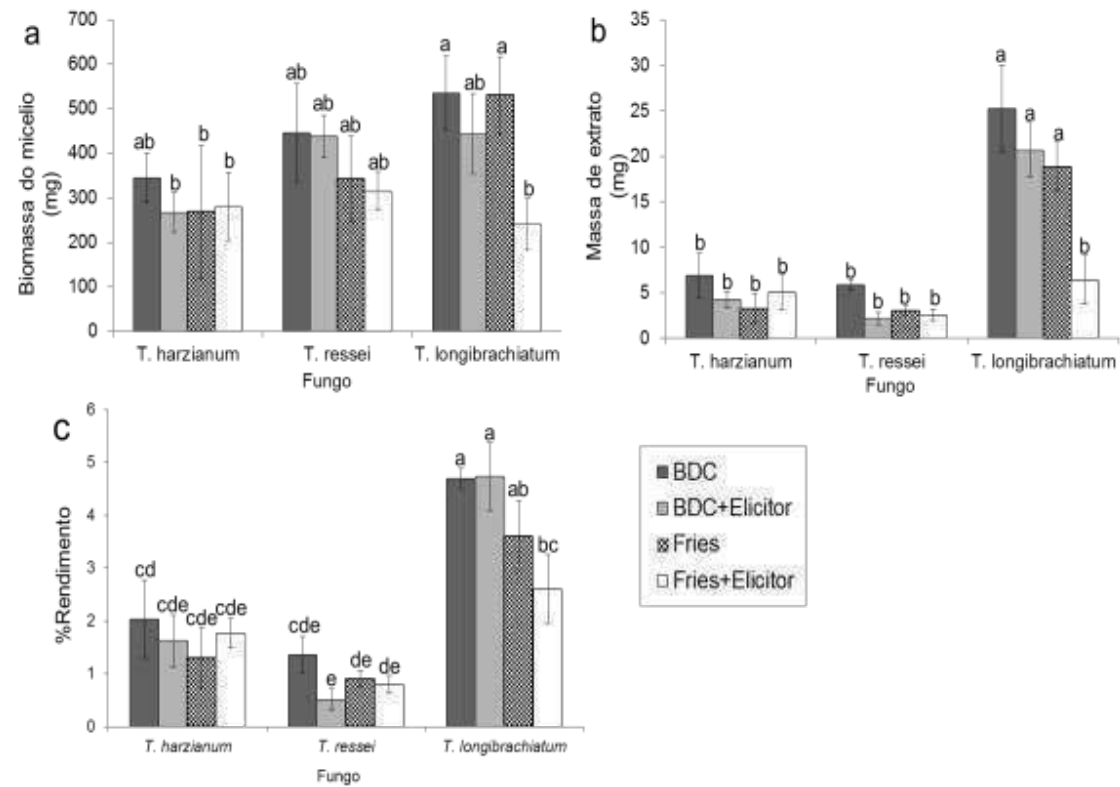
No meio sólido foi notado uma maior intensidade de manchas na placa de CCD que aquelas observadas nos meios líquidos. Isso mostra que alguns compostos permanecem no micélio, o que justifica a necessidade de uma maceração para extração total de um determinado composto fúngico. Contudo, o meio selecionado para continuidade do estudo foi o líquido (BDC e Fries), devido aos bons resultados por CCD, à possibilidade de obtenção de um maior volume de

extratos e à facilidade de manuseio. O meio líquido também tem sido muito utilizado em estudos com *Trichoderma sp.* Além disso, os filtrados e os extratos obtidos destas culturas mostram diversas atividades biológicas, devido, principalmente, à maior quantidade de compostos neste meio (AHAMED et al. 2009; DAOUBIA et al. 2009; JAVAID et al. 2011).

Por apresentarem maiores quantidade de compostos no perfil de CCD, as culturas de *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* e *T. reesei* crescidas em BDC e Fries foram utilizadas para comparar a taxa de crescimento e a produção de extratos.

A maior quantidade de biomassa fúngica, extratos e rendimento foram observados na cultura *T. longibrachiatum* no meio BDC sem o elicitor (Figura 10). O cultivo desse fungo em meio Fries e a adição do ácido nicotínico diminuiu a taxa de crescimento e a quantidade de extratos obtidos (Figura 10). Isso mostra que a composição do meio e a adição de indutor parecem ter uma influência no rendimento. A presença do indutor diminui não só a biomassa, mas também o rendimento da extração. A adição de ácido nicotínico (indutor) permite estudar a influência de um composto contaminante na produção de extrato e de diferentes metabólitos (DAOUBIA et al. 2009) (Apêndice 1, Figura 10).

Em geral, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à biomassa (Figura 10a) e à massa seca dos extratos (Figura 10b) obtidas por *T. harzianum* e *T. reesei*. Apenas no rendimento nota-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre esses fungos (Figura 10c). Além disso, as culturas crescidas no meio BDC sem indutor tiveram maiores rendimentos (Figura 10c).



$$\%Rendimento = \frac{\text{massa de extrato (mg)}}{\text{biomassa (mg)}} \times 100$$

BDC: Meio líquido batata-dextrose caldo, Indutor: Ácido nicotínico a 150 mg L⁻¹, Fries: Meio líquido de Fries.

Letras semelhantes significam que não há diferença significativa os dados, segundo teste de Tukey (p < 0,05).

Figura 10: Resultados da comparação de meios líquidos a) biomassa de micélio, b) massa de extrato e c) porcentagem de rendimento.

As diferenças na taxa de crescimento do fungo mostram ter uma influência no rendimento da extração, na massa de extrato obtido e, portanto na quantidade de compostos extraídos. Essa influência pode ser devido à característica fisiológica, à composição de meio de cultura e às condições de cultivo. Isso pode ser observado no baixo rendimento obtido no meio de Fries em relação aos outros meios. Uma desvantagem do meio BDC é o fato de não apresentar composição química definida. Mas esse problema pode ser evitado usando controles, que permitam conhecer os compostos presentes no meio. Além disso, o meio BDC e o BDA são muito usados na obtenção de metabólitos secundários por microorganismos (VINALE et al. 2008b; DAOUBIA et al. 2009; STOPPACHER et al. 2011). A redução da concentração de nutrientes no meio de cultura é uma das maneiras de provocar uma condição de estresse para o fungo sem necessariamente utilizar um indutor. Essa condição pode levar a maior produção de metabólitos secundários pelo fungo. Esse procedimento tem sido utilizado em estudos com *Trichoderma sp.* (VINALE et al. 2008b). Segundo esse estudo, a redução de até cinco vezes na concentração normal do BDC provoca um aumento significativo na síntese de metabólitos fúngicos extraídos do meio de cultivo.

4.2. Extração de metabólitos de *Trichoderma spp.*

A maior quantidade de extratos e rendimento foram obtidos no cultivo de *T. longibrachiatum* (Tabela 1), seguido do extrato *T. aureoviride* que, além disso, tem o maior número de metabólitos (Tabela 2). Em *T. viride* foi observado maior biomassa e menor rendimento.

Tabela1: Biomassa, massa de extrato e porcentagem de rendimento obtidas das extrações em meio caldo batata-dextrose.

Fungo	Biomassa^a	Massa do extrato^b	Rendimento (%)^c
<i>T. harzianum</i>	6340	179,6	2,83
<i>T. aureoviride</i>	5970	260,3	4,36
<i>T. ressei</i>	12450	177,4	1,43
<i>T. longibrachiatum</i>	8850	469,0	5,30
<i>T. viride</i>	19290	120,8	0,63

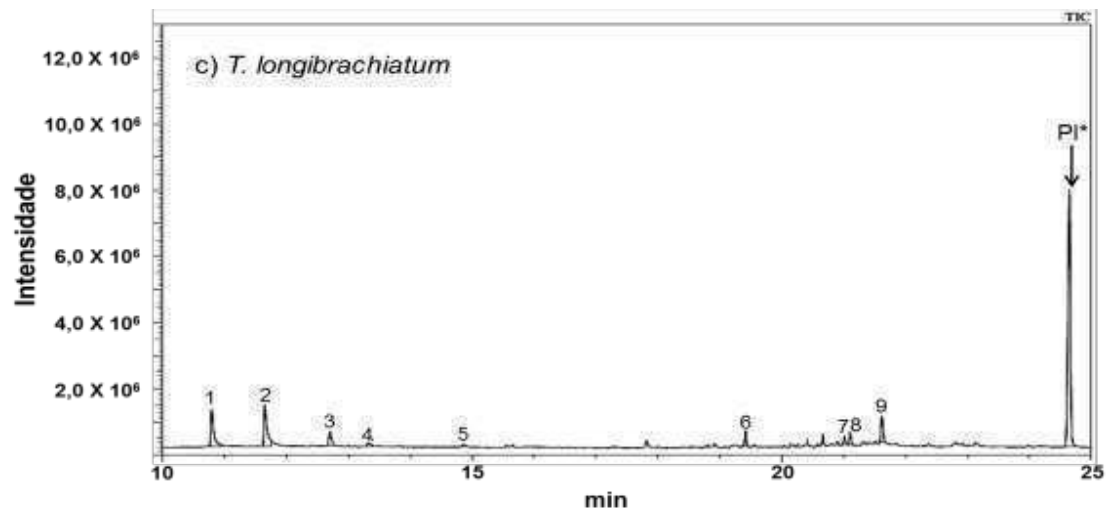
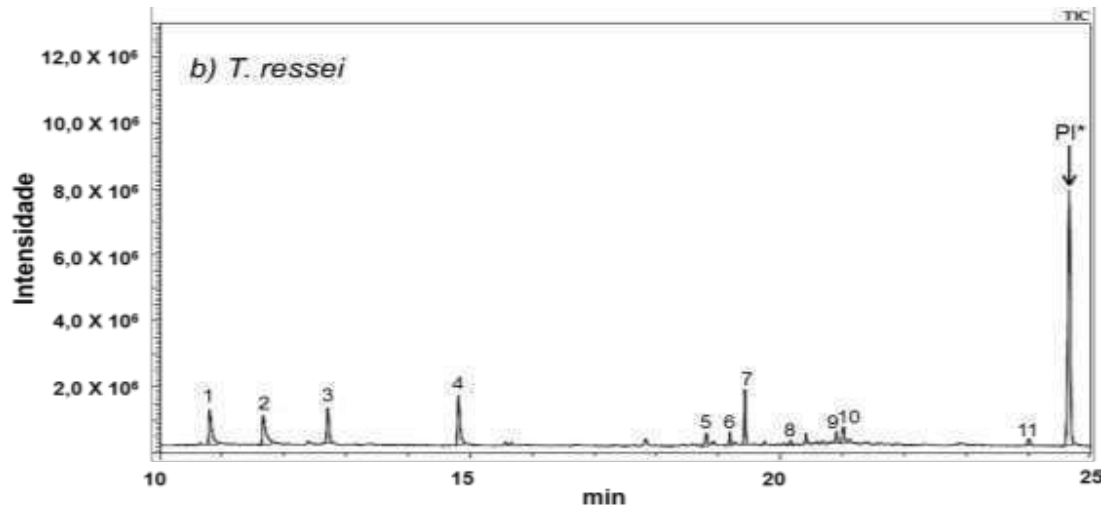
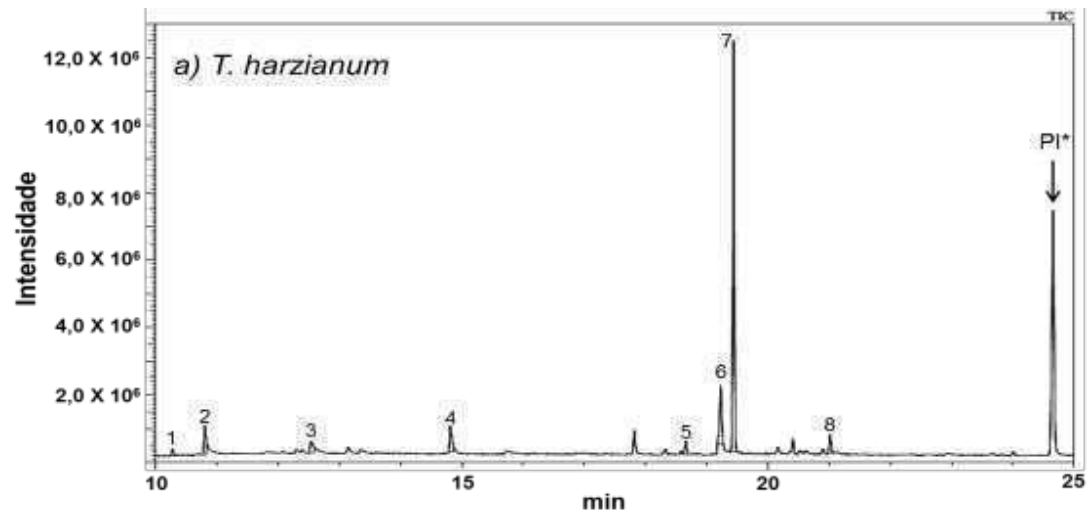
^a Biomassa seca do micélio em mg obtida depois da cultura em 4 L de meio.

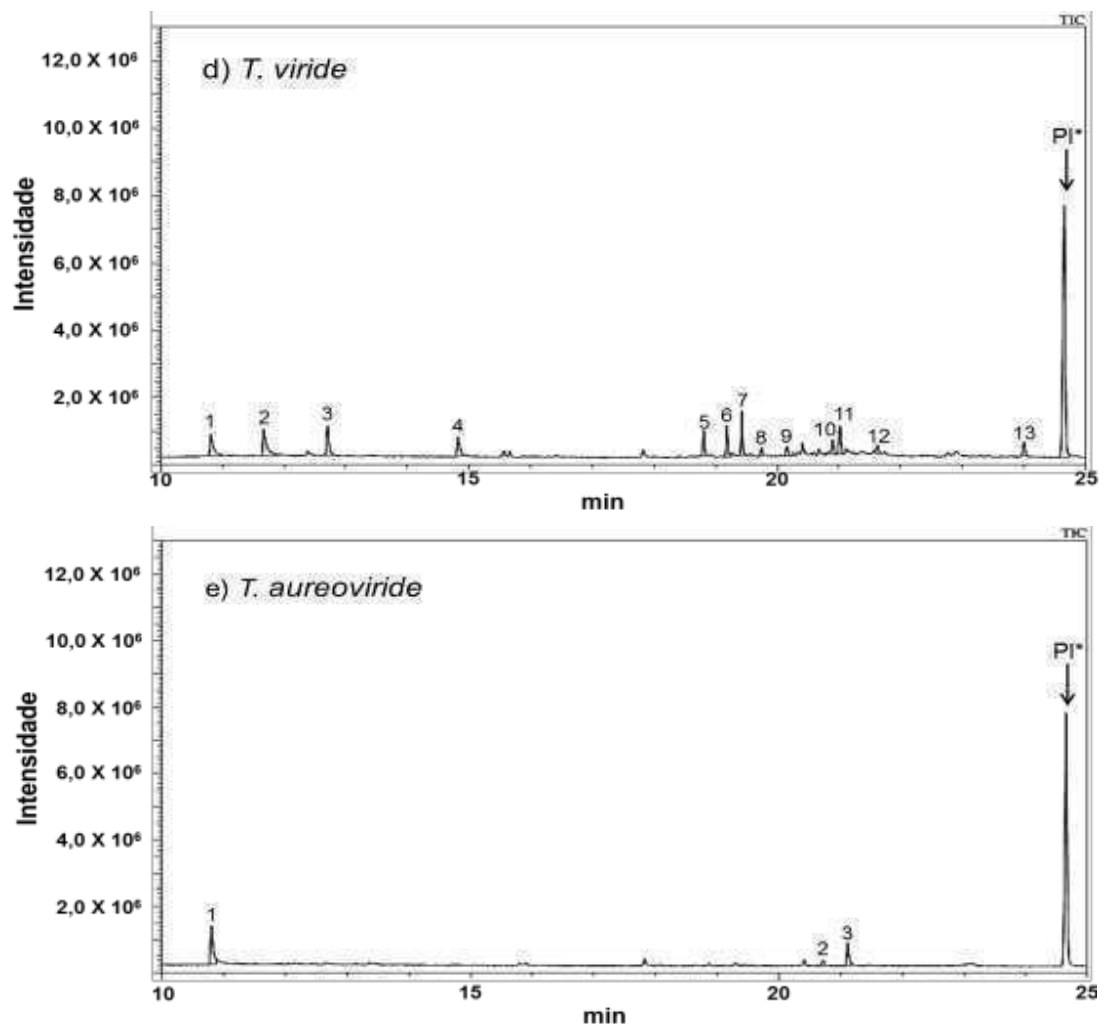
^b Massa de extrato em mg obtida depois da extração líquido-líquido dos filtrados das culturas em 4 L de meio.

$$^c\% \text{Rendimento} = \frac{\text{massa de extrato}}{\text{biomassa}} \times 100$$

Os cromatogramas (Figura 11) mostram uma diferença de composição de componentes voláteis em cada extrato. O padrão interno apresentou áreas sem variação em todos os extratos, permitindo comparar a concentração dos compostos comuns entre eles. Pelo método cromatográfico utilizado, *T. viride* mostrou a maior diversidade de compostos, enquanto o *T. aureoviride* mostrou a menor (Figura 12, Tabela 2). As áreas padronizadas (Ap) (Figura 12, Apêndice 3b) confrontam as concentrações dos compostos entre os extratos para dar uma ideia da variabilidade de produção desses entre espécies.

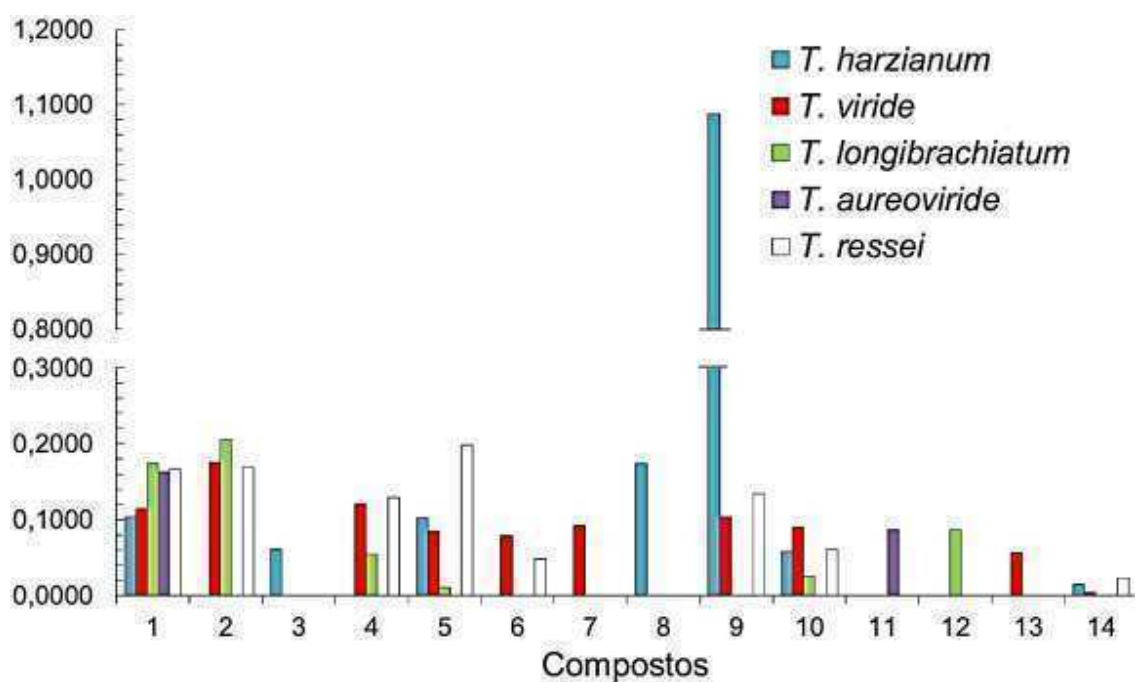
Os compostos identificados (Tabela 2) foram baseados na coincidência no espectro de massas com o espectro teórico (Apêndice 2) e o índice aritmético.





*PI: Padrão interno

Figura 11: Cromatogramas obtidos dos extratos fúngicos de a) *T. harzianum*, b) *T. ressei*, c) *T. longibrachiatum*, d) *T. viride* e e) *T. aureoviride*.



***Compostos.**

1.2-Feniletanol,

2.Anidromevalonolactona

3.N/i^a

4.N/i

5.Ácido desidroacético

6.N/i

7.N/i

8.N/i

9.N/i

10.3-Isobutilhexaidropirrol[1,2-a]-piperazina-1,4-diona (Ciclopeucilprolina)

11.N/i

12.N/i

13.N/i

14.N/i

^aN/i: Não identificado.

** $A_p = \frac{\text{Área do pico}}{\text{Área do padrão interno}}$, valores das áreas padronizadas se apresentam no Apêndice 3b

Figura 12: Áreas padronizadas (Ap) dos picos obtidos dos extratos de *Trichoderma spp.*

Tabela 2: % de áreas (%A) dos metabólitos secundários identificados nos cromatogramas dos extratos das cepas de *Trichoderma spp.*

#	Compostos	tr ^b (min)	% simil. c	IA* ^d	IA ^e	%A ^g				
						Th ^h	Tv ⁱ	Tl ^j	Ta ^k	Tr ^l
1	2-Feniletanol	10,80	97	1.124	1.116	6,16	10,19	26,53	59,23	15,45
2	Anidromevalonolactona	11,67	96	1.177	1.160		15,58	31,43		15,58
3	N/i ^a	12,53	91	1.231	- ^f	3,60				
4	N/i	12,71	81	1.243	-		10,73	8,40		11,90
5	Ácido desidroacético	14,82	92	1.384	-	6,07	7,52	1,68		18,34
6	N/i	18,81	87	1.698	-		6,97			4,46
7	N/i	19,18	75	1.738	-		8,19			
8	N/i	19,23	78	1.743	-	10,27				
9	N/i	19,44	87	1.766	-	64,22	9,19			12,46
10	3-Isobutilhexaidropirrol[1,2-a]-piperazina-1,4-diona (Cicloleucilprolina)	21,02	89	1.969	-	3,43	7,98	3,92		5,58
11	N/i	21,11	67	1.981	-				31,67	
12	N/i	21,61	76	2.051	-			13,30		
13	N/i	24,01	77	2.336	-		5,01			
14	N/i	25,21	71	2.442	-	0,88	0,42			2,12

^aN/i: Não identificado

^btr: tempo de retenção em minutos.

^c% simil.: Porcentagem de similaridade segundo o programa GCMSolution[®].

^dIA*: Índice aritmético calculado, ^eIA: Índice aritmético teórico (ADAMS 2007; STOPPACHER et al. 2011; ZHANG et al. 2012).

^f- Índice não encontrado na literatura, ^g%A: Porcentagem de área.

^h Th: *Trichoderma harzianum*, ⁱ Tv: *Trichoderma viride*, ^j Tl: *Trichoderma longibrachiatum*, ^k Ta: *Trichoderma aureoviride*, ^l Tr: *Trichoderma reesei*.

*As áreas correspondentes a todos os picos se apresentam no Apêndice3a.

**As estruturas dos possíveis compostos podem ser vistas no Apêndice4.

Os compostos mais representativos (Figura 13) foram o 2-Feniletanol (XVIII) encontrado em todas as culturas fúngicas, comparativamente em concentrações muito similares nos extratos (Figura 12). Em *T. aureoviride* não foi detectado ácido desidroacético (XIX), Cicloleucilprolina (XX) e a Anidromevalonolactona (XXI) (Figura 12). Esse último composto também não foi observado em *T. harzianum* (Figura 12).

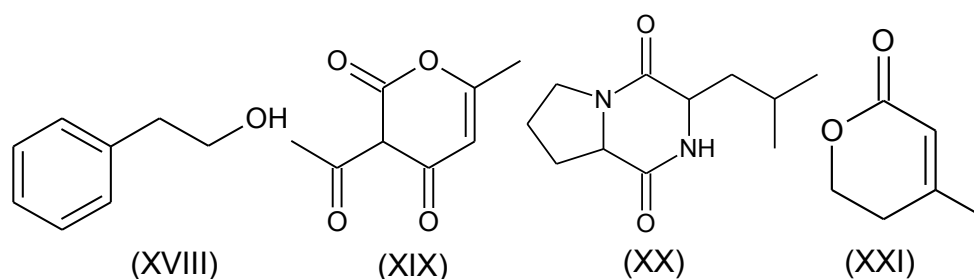


Figura 13: Principais compostos encontrados nas culturas de *Trichodermaspp.* nomeio BDC.

O 2-Feniletanol é um composto derivado da via do shikimato e já tinhasido identificado em *T. Harzianum* e *T. longibrachiatum*, em meio de malte (TARUS et al., 2003). Em outro trabalho, realizado por STOPPACHER et al. (2011), foi encontrado em culturas de *T. atroviride* no meio BDA, além de algumas espécies vegetais. Esse composto tem função de antibiótico, feromônio e protetor de folhas e flores (SHARMA et al. 2011). Uma característica importante dentro de sua atividade antibiótica é a capacidade de promover a produção de enzimas celulases em diferentes micro-organismos. Estudos realizados por STRANKS et al. (1975), com *T. viride*, verificam a capacidade deste composto para aumentar a

produção de celulase. Neste caso, poderia supor uma atividade com ação auto-indutora, ou seja um composto produzido pelo fungo atue nele mesmo, provocando a produção de enzimas, afetando tanto outros micro-organismos como às plantas. Além disso, a presença de 2-feniletanol em todos os fungos estudados mostra a importância desse composto para esse gênero. Neste estudo está sendo reportada pela primeira vez a produção de 2-feniletanol por *T. aureoviride*, *T. ressei* e *T. viride* (Tabela 2).

O ácido desidroacético está presente em quatro dos extratos obtidos, em maior proporção no *T. ressei* (Figura 12). Esse é proveniente da via metabólica do acetato e pode ser reconhecido como um derivado do núcleo lactônico das pironas (DOMNIN et al. 2008), compostos de muita importância em *Trichoderma* sp. e com amplas atividades biológicas (REINO et al. 2008). Esse composto é bem reconhecido pelos seus usos como conservante, graças a suas atividades fungicidas e antibacterianas (ZHANG et al. 2012). TAKUO (2004), identificou esse composto nos extratos de acetato de etila de *T. viride*, que apresentou atividade inibitória do crescimento de sementes de alface. Até este estudo, o ácido desidroacético tinha sido observado apenas em *T. viride*.

O Cicloleucilprolina é um composto derivado das 2,5-dicetopiperazinas que são resultado de hidrólise de proteínas e peptídeos e da condensação de aminoácidos. Possuem atividades antibacterianas, citotóxicas, além de controle da germinação de plantas e do sistema cardíaco humano (BORTHWICK 2012.). Esses compostos foram identificados nas espécies marinhas *T. koningii* e *T. atroviride* (SUN et al. 2009). Essa é primeira vez que reporta esse composto em *T.*

harzianum, *T. ressei*, *T. longibrachiatum* e *T. viride*, estando em maior concentração neste último (Tabela 2, Figura 12)

A anidromevalonolactona foi identificada nos extratos de *T. viride*, *T. ressei* e *T. longibrachiatum*. Essa lactona, derivada das pironas, tem se encontrado em espécies marinhas de *Penicillium* sp., e *Aspergillus* sp., além de *Alternaria euphorbiicola* e *T. harzianum* e em plantas de *Cornus walteri* e *Vanilla planifolia*, e é reconhecida pela sua atividade citotóxica e antibacteriana (REINO et al. 2008; KIM et al. 2011; ZHANG et al. 2012; VAREJÃO et al. 2013). Também é a primeira vez que esse composto é reportado em *T. ressei*, *T. longibrachiatum* e *T. viride*, mostrando concentrações similares nos extratos dessas espécies (Figura 12, Tabela 2).

Cabe ressaltar a grande variedade de sesquiterpenos apresentados nos extratos, principalmente o sesquiterpeno alcoólico encontrado em *T. harzianum*, que é maioritário nesse extrato (Figura 12). Esses são compostos principalmente de origem vegetal, mas que vem se apresentado em grande quantidade nas espécies fúngicas estudadas (Tabela 2). Esses compostos possuem atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral (LI et al. 2011; ZHENG et al. 2011; DINGA et al. 2012).

4.3. Determinação de atividade alelopática.

4.3.1. Teste de germinação.

Nas concentrações acima de 62,5 mg L⁻¹, o extrato *T. ressei* inibe em maior proporção o crescimento da raiz (acima de 37%) e do caule (acima de 14%)

de pepino (Figura 14, Apêndice 7 e 8). No entanto, as concentrações mais baixas apresentam uma indução da germinação das sementes (Figura 14, Apêndice 5, 6, 7 e 8).

Relacionando um pouco a atividade com a natureza do extrato, o ácido desidroacético foi encontrado no extrato de *T. ressei* (Tabela 2), que poderia ter essa atividade. Dependendo da concentração esse composto pode inibir o crescimento em alface (TAKUO 2004). Nesse estudo foi observado que altas concentrações do extrato fúngico causam a inibição do crescimento de pepino e à concentração de 62,5 mg L⁻¹ estimula o crescimento dessa planta. O fato da mudança na atividade pode ser devido a um efeito antagônico propiciado pelos outros compostos presentes nos extratos (Tabela 2). Interações aditivas, sinérgicas e antagônicas entre compostos têm sido reportadas (RASMUSSEN et al. 1977; JARAMILLO, 2006).

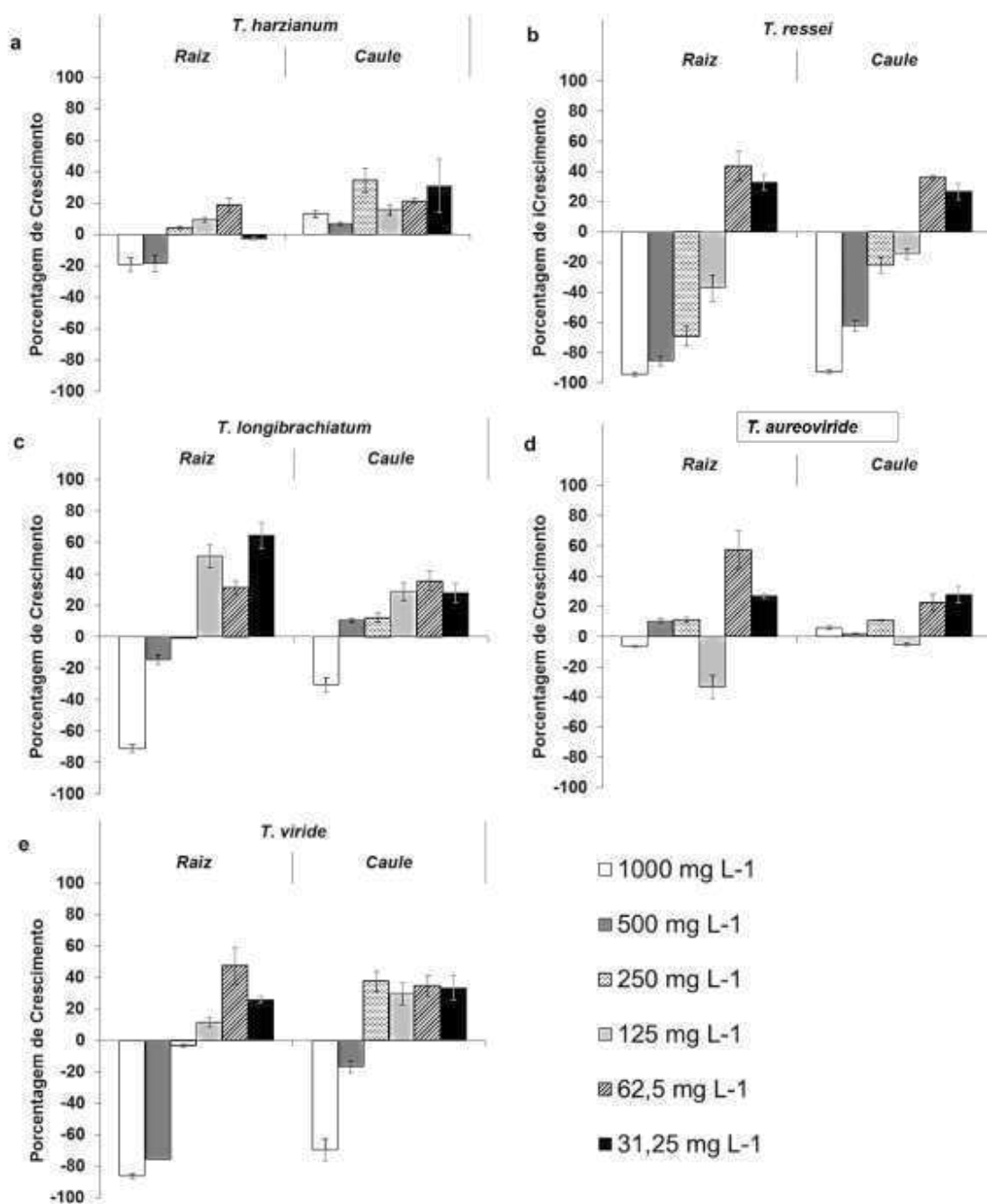


Figura 14: Percentagem de crescimento da raiz e caule do pepino respeito ao tratamento como água às concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 mg L⁻¹ dos extratos de a) *T. harzianum*, b) *T. reesei*, c) *T. longibrachiatum*, d) *T. aureoviride* e e) *T. viride*

O extrato obtido de *T. viride* também causou alta inibição do crescimento de pepino quando foi utilizado nas concentrações de 1000 e 500 mg L⁻¹. Nessas concentrações não foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos de *T. viride* e *T. ressei* em relação a inibição do crescimento de pepino. Como observado nos extratos de *T. ressei* (Apêndice 5 e 6). Altas concentrações dos extratos causam inibição e ao contrario, baixas concentrações estimulam o crescimento de pepino (Figura 14). No entanto, no extrato de *T. viride*, os compostos encontrados em sua maioria, estavam menos concentrados que no extrato de *T. ressei* (Figura 12), por isso o efeito indutor do crescimento foi observado na concentração de 250 mg L⁻¹.

Em relação ao crescimento da raiz também à indução do caule de pepino, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) (Apêndice 5 e 6) nas concentrações 62,5 e 31,25 mg L⁻¹ dos extratos de *T. ressei* e *T. viride* (Figura 14). Isso mostra que a indução estabiliza a partir de certas concentrações, indicando um bom resultado já que as concentrações baixas tem uma indução de aproximadamente 40%.

Semelhante ao observado para *T. ressei* e *T. viride*, o extrato de *T. longibrachiatum* causou inibição em altas concentrações e, abaixo de 500 mg L⁻¹, induz o crescimento do caule e a raiz (Figura 14).

Em geral, a maior proporção de indução do desenvolvimento de pepino (60%) foi observada no extrato de *T. longibrachiatum* (Figura 14). Nesse extrato foram encontrados os compostos anidromevalonolactona e 2-Feniletanol (Tabela 2).

O extrato de *T. harzianum* causou baixa inibição ou indução no desenvolvimento de pepino quando comparado com outros *Trichoderma* sp. utilizados (Figura 14).

O extrato de *T. aureoviride* a partir de 125 mg L⁻¹ causou baixa (33%) inibição da raiz e baixo crescimento do caule. No entanto nas concentrações menores que 62,5 mg L⁻¹ foi observado um aumento (57%) no crescimento da raiz (Figura 14). Nesse extrato o 2-feniletanol é o composto mais representativo (Tabela 2). Esse composto tem ação protetora de folhas e fruto e em baixas concentrações provoca a indução de raízes (SHARMA et al. 2011). Assim, esse composto pode estar diretamente envolvido na indução do crescimento de pepino, pois foi encontrado em todos os extratos testados (Tabela 2).

Em geral, o crescimento da raiz foi mais afetado que o de caule. Isso é devido ao fato da raiz ser a primeira em entrar em contato com os aleloquímicos presentes na rizosfera. Esses compostos podem influenciar a absorção de água e íons e a germinação das sementes (KIRKBY et al. 2008; SUÁREZ et al. 2011). Estudos com o pepino mostram que o ácido vanílico e o ácido ferúlico alteram a absorção de fosfato, que é vital para o desenvolvimento inicial da raiz (GNIAZDOWSKA et al. 2005).

Os extratos foram mais efetivos em causar a inibição de sorgo que de pepino. Essa inibição foi observada tanto para desenvolvimento do caule quanto da raiz (Figura 15, Apêndice 11 e 12). Por outro lado, foi verificado uma indução no desenvolvimento de sorgo na concentração de 31,25 mg L⁻¹ de todos os extratos. Isso reforça a sugestão de um efeito sinérgico e, ou antagonismo entre outros compostos presentes nos extratos (Tabela 2).

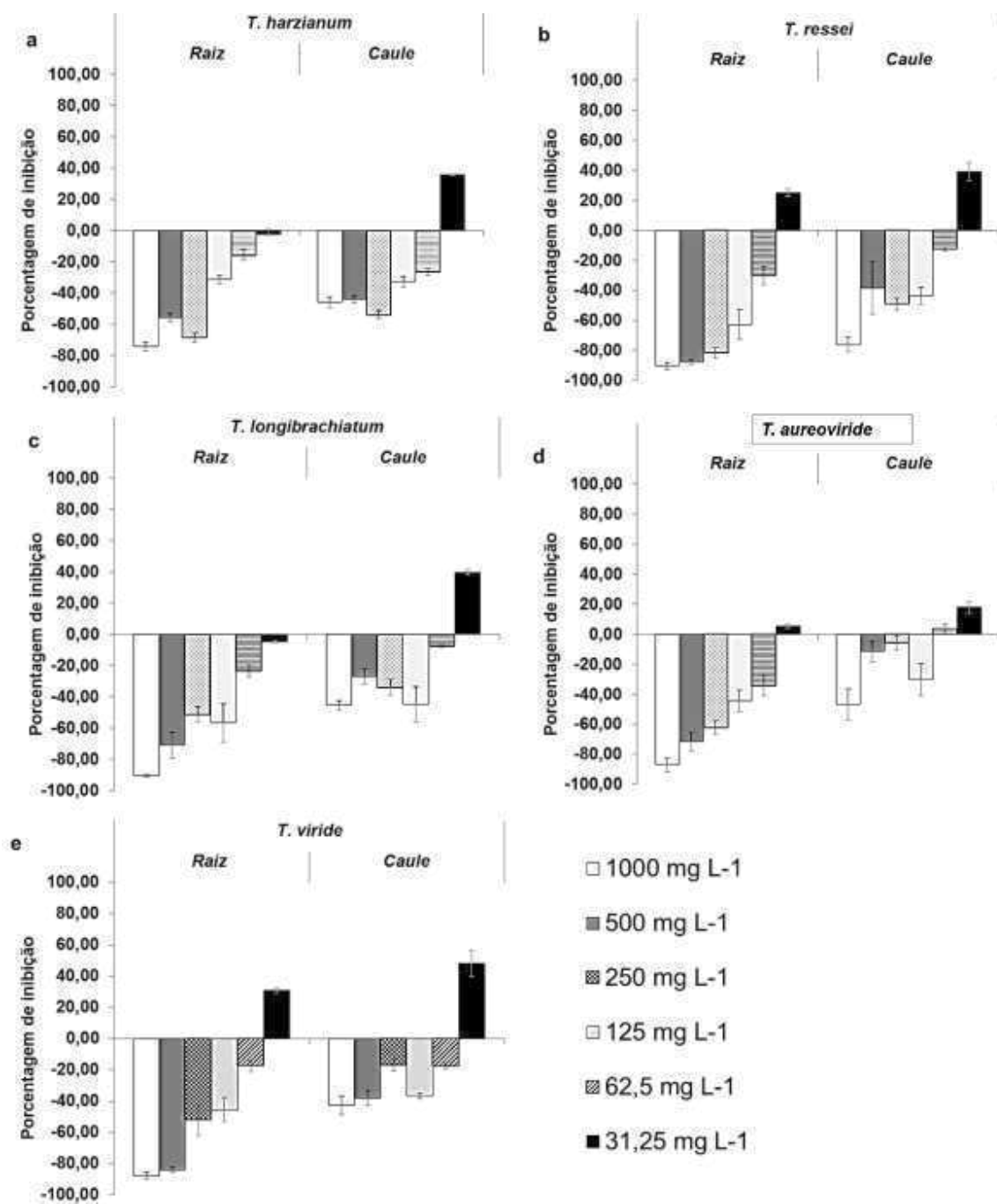


Figura15: Percentagem de crescimento da raiz e caule do sorgo respeito ao tratamento como agua às concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 mg L⁻¹ dos extratos de a) *T. harzianum*, b) *T. resei*, c) *T. longibrachiatum*, d) *T. aureoviride* e e) *T. viride*.

Todos os extratos inibem em mais de 50% o crescimento da raiz do sorgo a concentrações de até 250 mg L⁻¹. No caso do caule, a inibição entre 30 e 50% foi observada nas concentrações de até 125 mg L⁻¹ (Figura 15). Esses resultados são importantes para o controle do crescimento das gramíneas.

4.3.2. Teste de crescimento de plantas (Teste em pote).

Neste teste foi avaliada a capacidade dos extratos fúngicos em inibir o crescimento de plantas após germinação. Assim as soluções dos extratos foram usadas em plantas de pepino, sorgo e corda de viola. Essa última é uma invasora muito comum, que infesta principalmente linhas de cercas, terrenos baldios, lavouras perene como pomares, cafezais e cana-de-açúcar (ROSSI et al. 2010).

Este teste permite estudar as interações químicas entre os compostos no extrato e as múltiplas variações que sofre a planta ao longo do seu crescimento.

O extrato *T. aureoviride* induziu fortemente o crescimento da raiz (em mais de um 100%) em todas as concentrações avaliadas. Nesse caso não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações dos extratos utilizadas (Apêndice 13 e 14). Além de inibir entre 30 e 40% (Figura 16, Apêndice 15 e 16) o crescimento da parte aérea, também não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações. Esse extrato se caracteriza por ter o 2-feniletanol e anteriormente foi visto como este extrato igualmente aumentava a germinação de sementes de pepino (Figura 14) podendo indicar que a presença deste composto levaria a uma indução do crescimento destas plantas.

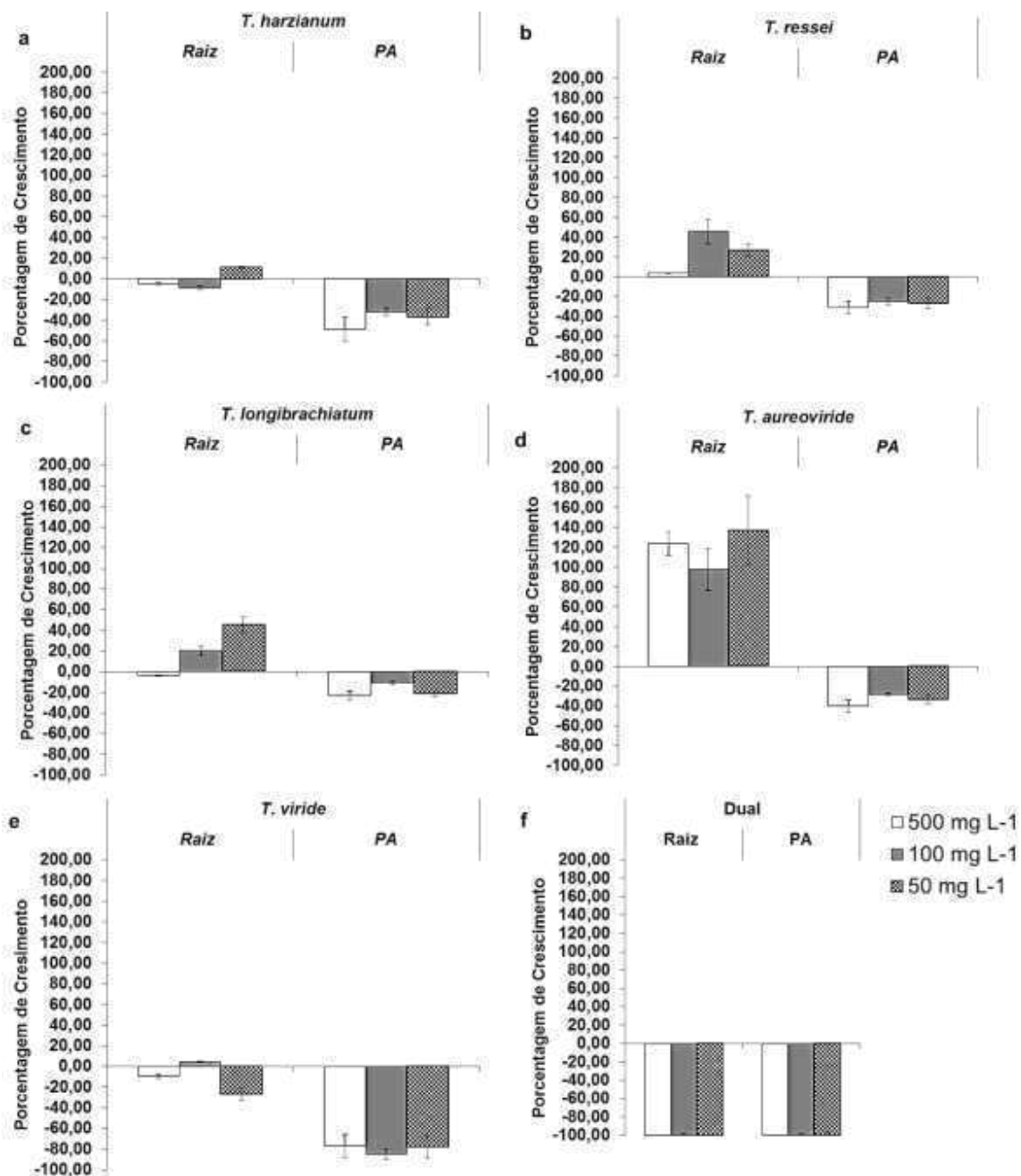


Figura 16: Porcentagem de crescimento da raiz e a parte aérea (PA) do pepino respeito ao tratamento como água às concentrações de 500, 100 e 50mg L⁻¹ dos extratos de a) *T. harzianum*, b) *T. resei*, c) *T. longibrachiatum*, d) *T. aureoviride*, e) *T. viride* e o controle f) DUAL®.

O extrato *T. viride* apresentou inibição, tanto da raiz (aprox. 30% a 50 mg L⁻¹) como da parte aérea (Figura 16e). Essa inibição foi similar a aquelas obtidas pelo herbicida usado como controle (Figura 16f). Sendo assim, esse extrato foi muito efetivo para inibir a parte aérea do pepino. Resultado similar foi obtido para teste de germinação (Figura 14). No extrato de *T. viride* teve uma grande gama de compostos, mas a anidromevalonolactona foi aquele mais representativo (Tabela 2). Isso também foi visto no teste de germinação em que o extrato inibiu nas maiores concentrações testadas (Figura 14).

O *T. harzianum* foi outro fungo que apresentou resultados bons de inibição da parte aérea e de germinação, com uma inibição entre 30 e 50% (Figura 16a), sem apresentar diferença significativa (Apêndice 15 e 16). Além disso, parece que a raiz não foi afetada pelo extrato desse fungo.

T. reesei e *T. longibrachiatum* tiveram resultados similares. Ambos aumentaram o crescimento das raízes nas menores concentrações utilizadas. Esses extratos também inibiu em 30 % o desenvolvimento da parte aérea (Figura 16). Devido aos resultados similares entre os extratos, os compostos como o ácido deidroacético, a anidromevalonolactona e o 2-feniletanol podem estar envolvidos nessas atividades. Esses dois *Trichoderma* spp. são bem reconhecidos pela capacidade de aumentar o crescimento das raízes primárias e secundárias e no controle biológico, melhorando a absorção de nutrientes e de água (BENÍTEZ et al. 2004; VINALE et al. 2008a).

Ao contrário do teste de germinação, a raiz e a parte aérea de sorgo foram pouco afetadas pelos extratos fúngicos (Figura 17, Apêndice 19 e 20). Parece que depois da germinação, o sorgo tem uma boa capacidade de crescimento e

fatores externos como os químicos tem pouco feito no desenvolvimento dessa planta. Os compostos presentes nos extratos parecem inibir apenas as etapas iniciais da germinação, tais como absorção de água e nutrientes, além da biossíntese de macromoléculas e divisão celular (SUÁREZ et al. 2011).

Na parte aérea, a ação dos extratos não foi muito pronunciada, com médias de inibições menores aos 20% (Figura 17, Apêndice 20). Na raiz, os extratos de *T. resseina* concentração de 50 mg L⁻¹ parece aumentar o crescimento em apenas 30% e 100 mg L⁻¹ de extrato (Figura 17b). *T. aureoviride* inibe em 45% o crescimento da raiz do sorgo (Figura 16d).

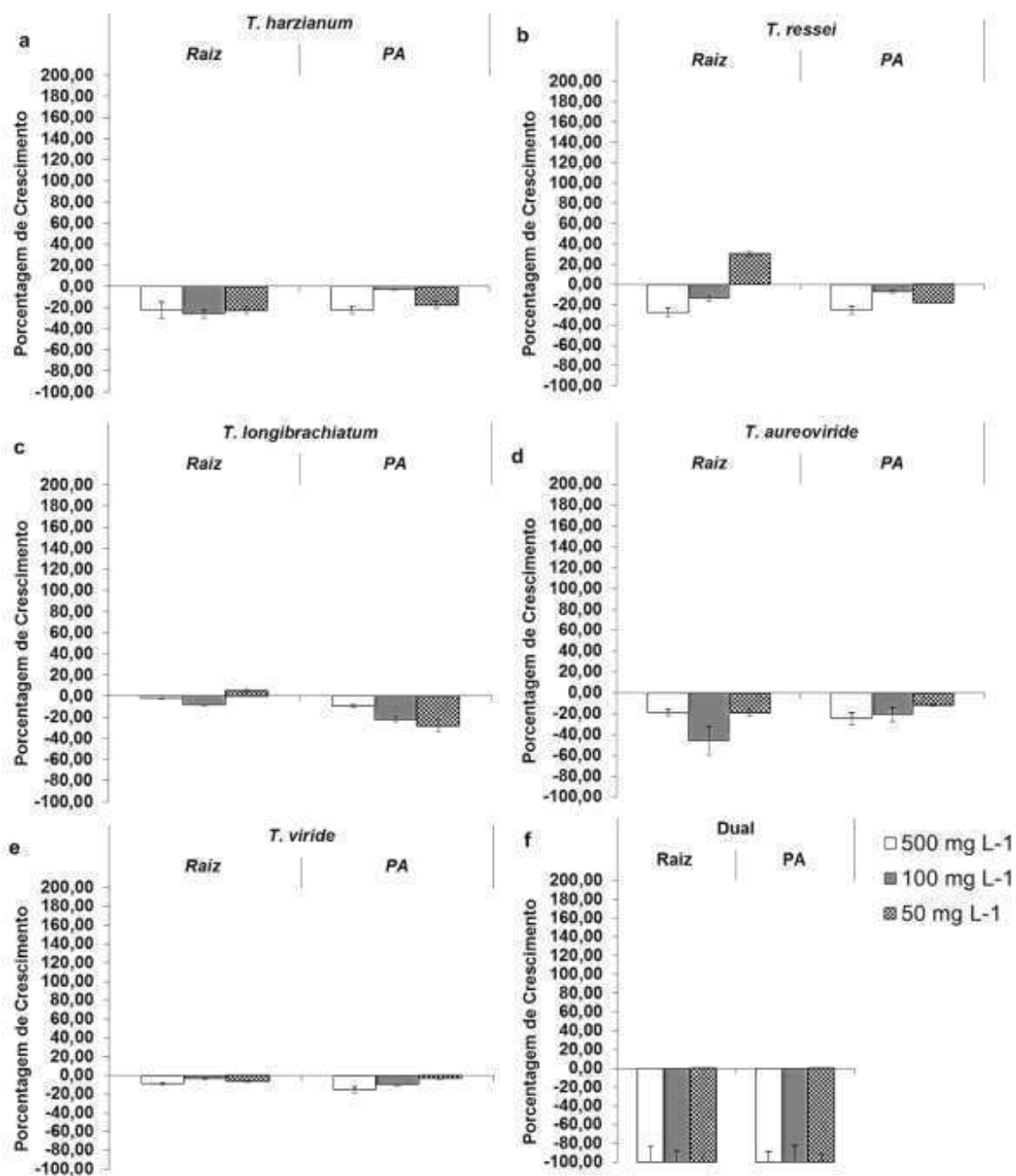


Figura 17: Percentagem de crescimento da raiz e a parte aérea (PA) do sorgo respeito ao tratamento como água às concentrações de 500, 100 e 50 mg L⁻¹ dos extratos de a) *T. harzianum*, b) *T. reesei*, c) *T. longibrachiatum*, d) *T. aureoviride*, e) *T. viride* e o controle f) DUAL®.

Em geral, os extratos de *T. longibrachiatum* e *T. harzianum* parecem ter favorecido o crescimento de corda de viola (Figura 18, Apêndice 23 e 24). *T. harzianum* apresenta um grande aumento do crescimento (maior aos 100%) à concentração de 100 mg L⁻¹, diminuindo a 28% a 50 mg L⁻¹ (Figura 18a) e parece que o efeito dos extratos são máximos nesta concentração. Esta resposta da planta poderia dar-se pelos compostos apresentados neste extrato (Tabela 2), que inclusive a concentrações altas parece ter interferências na sua atividade pelos outros compostos, razão pela qual à maior concentração a atividade é menor. A parte aérea não responde de igual forma tendo pouca resposta e sem diferenças significativas, só aumentando o crescimento até um 22% a 500 mg L⁻¹ e inibindo este até um 10% a 50 mg L⁻¹ (Figura 18, Apêndice 24).

O *T. longibrachiatum* mostra uma tendência a aumentar o crescimento da raiz a medida que diminui a concentração. Assim, na concentração de 50 mg L⁻¹ teve uma indução maior, tanto para a raiz como para a parte aérea (Figura 18c). Como já mencionado parece ter um efeito antagônico com a mudança de concentração. É importante ressaltar também a capacidade de inibir em mais de 50% do crescimento da raiz a 500 mg L⁻¹. Tendo certa capacidade de ajudar na eliminação desta planta daninha.

O extrato *T. aureoviride* foi o que inibiu em maior proporção (70%) do crescimento da raiz de corda de viola na concentração de 50 mg L⁻¹, diminuindo também o crescimento da parte aérea nas concentrações de 50 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹ (Figura 18d). A tendência deste extrato é inibir em menores concentrações que seria importante na busca de novos herbicidas.

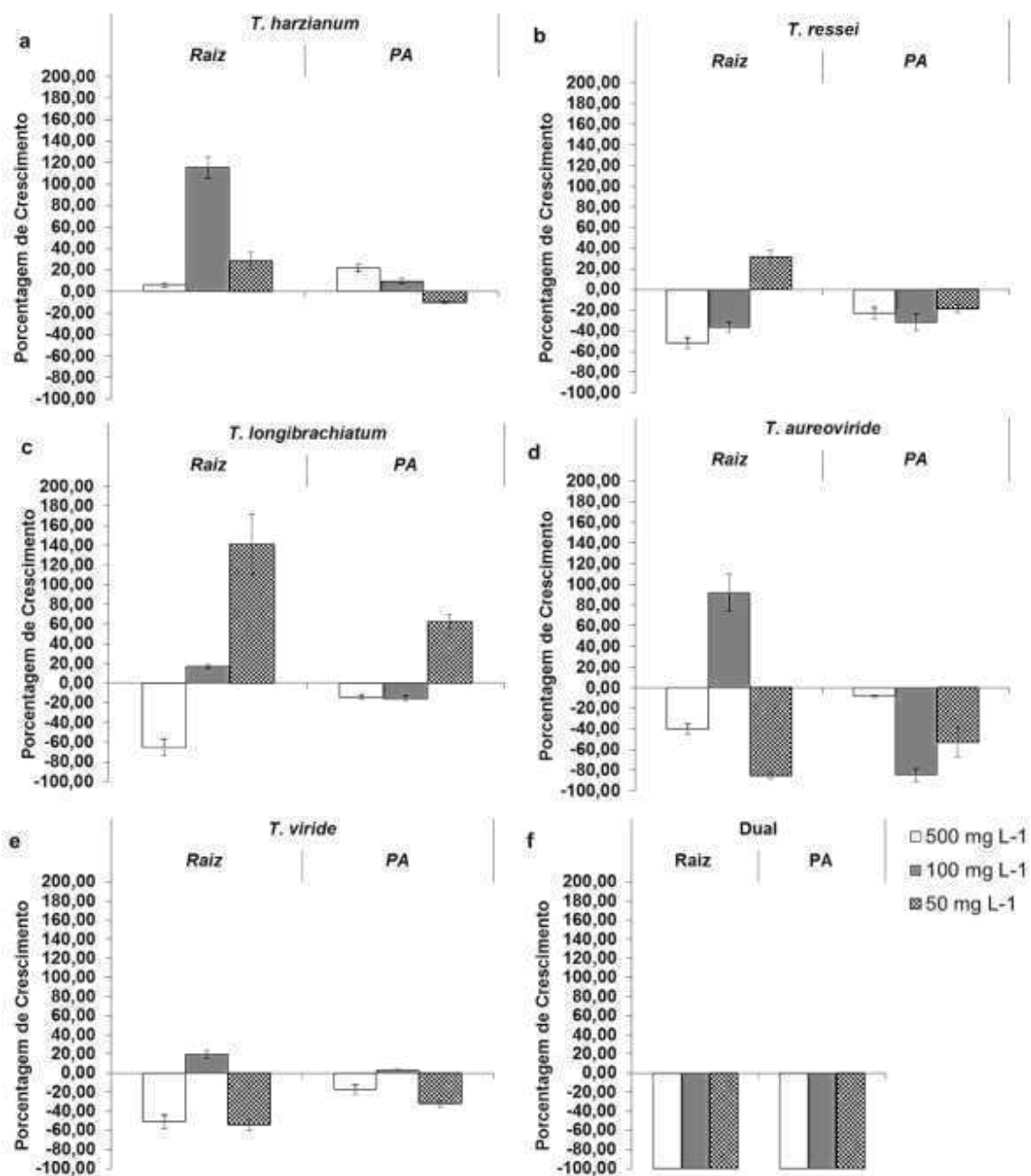


Figura 18: Percentagem de crescimento da raiz e a parte aérea (PA) da corda de viola respeito ao tratamento como água às concentrações de 500, 100 e 50 mg L⁻¹ dos extratos de a) *T. harzianum*, b) *T. reesei*, c) *T. longibrachiatum*, d) *T. aureoviride*, e) *T. viride* e o controle f) DUAL®.

O *T. ressei*, inibe o desenvolvimento da corda de viola em altas concentrações, em 50% a 500 mg L⁻¹. Esse extrato tem sido o mais ativo, mas em alta concentração (Figura 18b). Na parte aérea os resultados variam pouco entre concentrações, inibindo entre 20 e 30% do desenvolvimento dessa planta daninha.

O extrato *T. viride*, teve uma inibição ao redor de 50% e sem diferença significativa entre as concentrações de 500 e 50 mg L⁻¹. Sua ação na parte aérea só foi importante na concentração 50 mg L⁻¹ com 30% de inibição (Figura 18e). Pode ser observado que os extratos de *Trichoderma* spp. afetam tanto a germinação como o crescimento das plantas estudadas. Dependendo da planta e da sua sensibilidade tem valores bastante diversos.

Anteriormente foi mencionada a capacidade deste fungo de atuar como agente de controle biológico e do controle do crescimento das plantas (SUÁREZ et al. 2011; REGLINSKI et al. 2012). Isto permite supor que este tipo de atividade pode ser devida aos compostos identificados nos extratos testados.

Analisando os resultados dos ensaios dos extratos de *T. viride* e *T. ressei* sobre a germinação, esses inibiram majoritariamente o crescimento das plantas na etapa de germinação. Sendo, as pironas os compostos majoritários pode ser essas responsáveis por essa inibição observada. Considerando a inibição do crescimento, o extrato *T. aureoviride* que tem o composto 2-feniletanol, cujas atividades alopáticas não estão reportadas, parece ser um potente regulador do crescimento. Esse fato é importante para investigação do uso desse composto para regular o desenvolvimento de planta de interesse comercial.

Por fim, nota-se que os extratos de *Trichoderma spp.* tiveram ação direta no desenvolvimento das plantas investigadas, considerando nesse caso a planta daninha, mas necessita de mais investigação utilizando os compostos purificados.

5. CONCLUSÕES

Inicialmente falando das condições de cultura ideais para o crescimento do fungo foram aquelas dos meios de cultura BDA e BDCa meia força a 25°C e 100 rpm de agitação durante 21 dias que permitiram ao fungo a se adaptar à quantidade de meio e crescer de forma mais eficiente. Além disso, a agitação permitiu um aumento na massa seca e na produção de metabólitos secundários.

Entre os metabólitos encontrados nos extratos de *Trichoderma* spp. são muito importantes os sesquiterpenos que parecem ter uma ação direta no metabolismo secundário deste tipo de fungos estando bem disseminados nos extratos. Outros compostos de importância são o 2-feniletanol, presente em todos os fungos e que parece ter uma atuação importante nas atividades biológicas. Também as pironas (o ácido desidroacético e a anidromevalonolactona) e os derivados das 2,5-dicetopiperazinas são importantes nesses fungos.

Os fungos que apresentaram melhores resultados na atividade alelopática foram *T. longibrachiatum* e *T. reesei*, que produzem uma grande variedade de metabólitos secundários. Além disso, junto com *T. viride*, são aqueles que afetam em maior proporção a germinação de pepino e sorgo. Estes resultados são importantes na hora de usar estes extratos como material agroquímico.

O teste de crescimento de plantas revela resultados muito satisfatórios mostrando que o extrato de *T. aureoviride* tem um efeito promotor do crescimento das raízes do pepino, mas que afeta pouco o desenvolvimento de sorgo e corda de viola.

Também *T. viride* e *T. ressei* inibem em maior proporção as o sorgo e pepino, incluindo a germinação, além de afetar o crescimento da planta daninha estudada. O efeito do primeiro poderia ser atribuído ao 2-feniletanol que é um dos seus compostos encontrados, igualmente para os outros dois, além das pironas que são os compostos geradores desta mistura ativa, que parece ter ações sinérgicas e/ou antagônicas, mas se precisaria além de mais testes para cada composto puro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVE, A., OTERO, M., REOLLEDO, O. e LEZAMA, R. Producción y actividad antibiótica del 6-pentil-a-pirona de *Trichoderma spp.*, sobre especies de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, v. 22, p. 14-21, **2004**.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. Ed. 4. *Allured*. p. 804, **2007**.
- AGOSIN, E., VOLPE, D., MUÑOZ, G., SAN MARTIN, R. e CRAWFORD, A. Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 13, p. 225 - 232, **1997**.
- AHAMED, A. e VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5979 – 5987, **2009**.
- AHMED, A., PÉREZ-SÁNCHEZ, C., EGEA, C. e CANDELA, E. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology*, v. 48, p. 58-65, **1999**.
- BENÍTEZ, T., RINCÓN, A., LIMÓN, C. e CODÓN, A. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* stains. *International Microbiology*, v. 7, p. 249-260, **2004**.
- BORTHWICK, A. D. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chemical Reviews*, v. 112, p. 3641 – 3716, **2012**.
- CONTRERAS-CORNEJO, H., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., CORTÉS-PENAGOS, C. e LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 149, p. 1579-1592, **2009**.
- CHET, I. e JACOB, I. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 48, p. 37-43, **1994**.
- DAOUBIA, M., PINEDO-RIVILLA, C., BELÉN, M., HERMOSA, R., MONTE, E., ALEU, J. e COLLADO, I. Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2H-pyran-2-one derivatives from *Trichoderma spp.* *Tetrahedron*, v. 65, p. 4834 - 4840, **2009**.

- DINGA, G., JUAN-CHENA, A., LAN, J., ZHANGA, H., CHENA, X., LIUB, X. e ZOU, A. Sesquiterpenes and Cyclopeptides from the Endophytic Fungus *Trichoderma asperellum*. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*, v. 9, p. 1205 - 1212, **2012**.
- DOMNIN, I. N., REMIZOVA, L. A., MISHAREV, A. D. e TAKHISTOV, V. V. Fragmentation of some 4H-Pyran-4-one and Pyridin-4-one derivatives under electron impact *Russian journal of organic chemistry*, v. 44, p. 1369 - 1373, **2008**.
- DOS SANTOS, H. *Trichoderma spp.* como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum*. Tese de, Universidade de Brasília. p. **2008**.
- ELYASHBERG, M., WILLIAMS, A. e BLINOV, K. Structural revisions of natural products by Computer-Assisted Structure Elucidation (CASE) systems. *Natural Product Reports*, v. 27, p. 1296-1328, **2010**.
- GNIAZDOWSKA, A. e BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 27, p. 395 - 407, **2005**.
- HARMAN, G. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, v. 84, p. 377-393, **2000**.
- HEEG, C., KRUSE, C., JOST, R., GUTENSOHN, M., RUPPERT, T., WIRTZ, M. e HELL, R. Analysis of the Arabidopsis O-Acetylserine(thiol)lyase Gene Family Demonstrates Compartment-Specific Differences in the Regulation of Cysteine Synthesis. *The Plant Cell*, v. 20, p. 168 - 185, **2008**.
- HÉRAUX, F., HALLETT, S. e WELLER, S. Combining *Trichoderma virens*-inoculated compost and a rye cover crop for weed control in transplanted vegetables. *Biological Control*, v. 34, p. 21-26, **2005**.
- HERMOSA, R., VITERBO, A., CHET, I. e MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, v. 158, p. 17-25, **2012**.
- HOWELL, C. R. e STIPANOVIC, R. D. Phytotoxicity to crop plants and herbicidal effects on weeds of viridol produced by *Gliocladium virens*. *Phytopatology*, v. 74, p. 1346 - 1349, **1984**.
- HOYOS-CARVAJAL, L., ORDUZ, S. e BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, v. 51, p. 409-416, **2009**.

- JARAMILLO, M. Aditividad, Sinergismo y Antagonismo entre Micotoxinas y sus Efectos en Pollos de Engorde. Obtido de <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/aditividad-sinergismo-antagonismo-entre-t972/p0.htm>, no 10 / 02 / 2014 de. **2006**.
- JAVOID, A. e ALI, S. Herbicidal activity of culture filtrates of *Trichoderma spp.* against two problematic weeds of wheat. *Natural Product Research*, v. 25, p. 730 – 740, **2011**.
- KESZLER, Á., FORGÁCS, E. e KÓTAI, L. Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatographics Science*, v. 38, p. 421-424, **2000**.
- KIM, K. H., SHIN, Y. J., CHOI, S. U. e LEE, K. R. New Cytotoxic δ -Valerolactones from *Cornus walteri*. *Bull. Korean Chem. Soc.*, v. 32, p. 2443 - 2445, **2011**.
- KIRKBY, E. e RÖMHELD, V. Micronutrientes en la fisiología de las plantas: Funciones, absorción y movilidad. *Informaciones Agroquímicas*, v. 68, p. 1 - 6, **2008**.
- LI, G.-H., YANG, Z.-S., ZHAO, P.-J., ZHENG, X., LUO, S.-L., SUN, R., NIU, X.-M. e ZHANG, K.-Q. Three new acorane sesquiterpenes from *Trichoderma sp.* YMF1.02647. *Phytochemistry Letters*, v. 4, p. 86 – 88, **2011**.
- QURESHI, S. A., RUQQIA, SULTANA, V., ARA, J. e EHTESHAMUL-HAQUE, S. Nematicidal potential of culture filtrates of soil fungi associated with rhizosphere and rhizoplane of cultivated and wild plants. *Pak. J. Bot.*, v. 44, p. 1041 - 1046, **2012**.
- RAHMAN, M., SULTANA, R., FERDOUSI, M. e FIROZ, M. Effect of culture filtrates of *Trichoderma* on seed germination and seedling growth in chili *International Journal of Biosciences*, v. 2, p. 46-55, **2012**.
- RAMOS, A. D. S., FIAUX, S. B. e FERREIRA, S. G. Production of 6-pentyl-a-pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 712-717, **2008**.
- RAMOS, A. D. S., FIAUX, S. B., MARTINS, P. S. e FERREIRA, S. G. Microextração em fase sólida de 6-pentil-a-pirona produzida por fermentação em estado sólido. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, p. 523-528, **2009**.
- RASMUSSEN, J. A. e EINHELLIG, F. A. Synergistic inhibitory effects of p-coumaric and ferulic acids on germination and growth of grain sorghum. *Journal of Chemical Ecology*, v. 3, p. 197 - 205, **1977**.

- REGLINSKI, T., RODENBURG, N., TAYLOR, J., NORTHCOTT, G., AH CHEE, A., SPIERS, T. e HILL, A. *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. *Forest Pathology*, v. 42, p. 75-78, **2012**.
- REINO, J. L., GUERRERO, R., HERNÁNDEZ-GALÁN, R. e COLLADO, I. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev*, v. 7, p. 89-123, **2008**.
- ROSSI, C. V., MAGALHÃES, P. M. e BENETTI, E. Eficácia de associação de herbicidas no controle de ipomoea grandifolia em canade-açúcar. . *XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas. Ribeirão Preto - SP (Brasil)*, v. 1, p. 1425 - 1429, **2010**.
- SAHEBANI, N. e HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 40, p. 2016 – 2020, **2008**.
- SÁNCHEZ-LÓPEZ, V., MARTÍNEZ-BOLAÑOS, L., A., Z.-G. E. e RAMÍREZ-LEPE, M. Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas *Revista Mexicana de Micología*, v. 36, p. 17 - 26, **2012**.
- SHARMA, V., JOSHI, R. e GULATI, A. Seasonal clonal variations and effects of stresses on quality chemicals and prephenate dehydratase enzyme activity in tea (*Camellia sinensis*). *Eur Food Res Technol*, v. 232, p. 307 – 317, **2011**.
- SHARPLEY, A. N., SMITH, S. J. e NANEY, J. W. Environmental Impact of Agricultural Nitrogen and Phosphorus Use. *J. Agric. Food Chem*, v. 35, p. 812 - 817, **1987**.
- SIDDIQUI, I. A. e SHAUKAT, S. S. *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds *in vitro* and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. *Letters in Applied Microbiology*, v. 38, p. 169 – 175 **2003**.
- STACEY, G. e KEEN, N. Plant-microbe interactions. Ed. 1. *Chapman & Hall*. p. 54, 60-63, **1996**.
- STOPPACHER, N., KLUGER, B., ZEILINGER, S., KRSKA, R. e SCHUHMACHER, R. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, v. 81, p. 187-193, **2011**.

- STRANKS, D. W. e BIENIADA, J. Effect of Phenethyl alcohol and other organic substances on cellulase production. *Mycopathologia* v. 55, p. 57 - 63, **1975**.
- SUÁREZ, D. e MELGAREJO, L. M. Biología y germinación de semillas. Ed. 1. *Universidad Nacional de Colombia*. p. 24, **2011**.
- SUN, S., TIAN, L., WANG, Y., WU, H., LU, X. e PEI, Y. A novel natural product from the fermentation liquid of marine fungus *Trichoderma atroviride* G20-12. *Asian Journal of Traditional Medicine*, v. 4, p. 123 - 127, **2009**.
- TAKUO, A. Biological active substance produced by *Trichoderma viride* isolated from allyl alcohol-partial sterilized soils. *Meijo Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku*, v. 40, p. 21 - 26, **2004**.
- TARUS, P. K., LANG'AT-THORUWA, C. C., WANYONYI, A. W. e CHHABRA, S. C. Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum* *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, v. 17, p. 185 - 190., **2003**.
- VAN-ETTEN, J. e DALY, J. Production of Host-Specific toxins by *Helminthosporium victoriae* and *H. maydis* in liquid shake culture. *Physiology and Biochemistry*, v. 70, p. 727 - 729, **1980**.
- VAREJÃO, E. V., DEMUNER, A. J., BARBOSA, L. C. e BARRETO, R. W. Phytotoxic effects of metabolites from *Alternaria euphorbiicola* against its host plant *Euphorbia heterophylla*. *Quim. Nova*, v. 36, p. 1004 - 1007, **2013**.
- VINALE, F., FLEMATTI, G., SIVASITHAMPARAM, K., LORITO, M., MARRA, R., SKELTON, B. e GHISALBERTI, E. Harzianic Acid, an Antifungal and Plant Growth Promoting Metabolite from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, v. 72, p. 2032-2035, **2009**.
- VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E., MARRA, R., BARBETTI, M., LI, S., WOO, S. e LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 72, p. 80-86, **2008b**.
- VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E., MARRA, R., WOO, S. e LORITO, M. Trichoderma-plan-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 40, p. 1-10, **2008a**.
- YANG, Z.-S., LI, G.-H., ZHAO, P.-J., ZHENG, X., LUO, S.-L., LI, L., NIU, X.-M. e ZHANG, K.-Q. Nematicidal activity of *Trichoderma spp.* and isolation of an active compound. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 2297 - 2302, **2010**.

- YANG, Z., YU, Z., LEI, L., XIA, Z., SHAO, L., ZHANG, K. e LI, G. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma sp.* *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 15, p. 647 – 650, **2012**.
- ZHANG, S. e MUELLER, C. Comparative Analysis of Volatiles in Traditionally Cured Bourbon and Ugandan Vanilla Bean (*Vanilla planifolia*) Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 10433 – 10444, **2012**.
- ZHANG, Y., DU, Y., YIN, J., HU, C., LIU, X. e CUI, W. Determination and depletion of dehydroacetic acid residue in chicken tissues. *Food Additives and Contaminants*, v. 29, p. 918 - 924, **2012**.
- ZHENG, C.-J., SUN, P.-X., JIN, G.-L. e QIN, L.-P. Sesquiterpenoids from *Trichoderma atroviride*, an endophytic fungus in *Cephalotaxus fortunei*. *Fitoterapia*, v. 82, p. 1035 - 1038, **2011**.
- ZIMAND, G., ELAD, Y. e CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Biological Control*, v. 86, p. 1255-1260, **1996**.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Biomassa seca (mg) de *Trichodermaharzianum*(Th), *Trichoderma ressei* (Tr) e *Trichoderma longibrachiatum* (TI), massa seca dos extratos obtidas para a primeira extração e percentagem de rendimento da extração.

Cepas	Variável medida	BDC ^d	CV ^e	BDC+Indutor ^f	CV	Fries ^g	CV	Fries+Indutor	CV
Th	Massa de extrato ^a	6,8805 ± 2,4547 b*	35,68	4,2049 ± 0,8914 b	21,20	3,2321 ± 1,6965 b	52,49	5,0624 ± 1,9179 b	37,89
	Biomassa ^b	344,8 ± 56,1 ab	16,26	266,9 ± 44,7 b	16,76	267,7 ± 148,7 b	55,56	280,1 ± 76,0 b	27,12
	%Rendimento ^c	2,03 ± 0,74 cd	36,62	1,62 ± 0,49 cde	30,37	1,30 ± 0,57 cde	43,98	1,77 ± 0,27 cde	15,53
Tr	Massa de extrato	5,8549 ± 0,6215 b	10,62	2,1513 ± 0,6811 b	31,66	2,9963 ± 0,5674 b	18,94	2,5302 ± 0,6298 b	24,89
	Biomassa	446,0 ± 110,6 ab	24,81	437,6 ± 47,1 ab	10,77	342,6 ± 95,8 ab	27,95	315,1 ± 42,9 ab	13,63
	%Rendimento	1,36 ± 0,34 cde	24,68	0,51 ± 0,20 e	39,96	0,90 ± 0,16 de	17,27	0,80 ± 0,16 de	19,62
TI	Massa de extrato	25,2243 ± 4,8109 a	19,07	20,6501 ± 2,9839 a	14,45	18,8348 ± 2,7180 a	14,43	6,4050 ± 2,6647 b	41,61
	Biomassa	534,5 ± 82,9 a	15,52	443,2 ± 90,0 ab	20,31	530,3 ± 86,5 a	16,32	240,0 ± 57,2 b	23,85
	%Rendimento	4,70 ± 0,19 a	3,99	4,73 ± 0,64 a	13,43	3,60 ± 0,68 ab	19,00	2,60 ± 0,65 bc	25,21

^a É a massa de extrato em mg obtida depois da extração líquido-líquido dos filtrados das culturas em 500 mL de meio.

^b É a biomassa seca do micélio em mg obtida depois da cultura em 500 mL de meio.

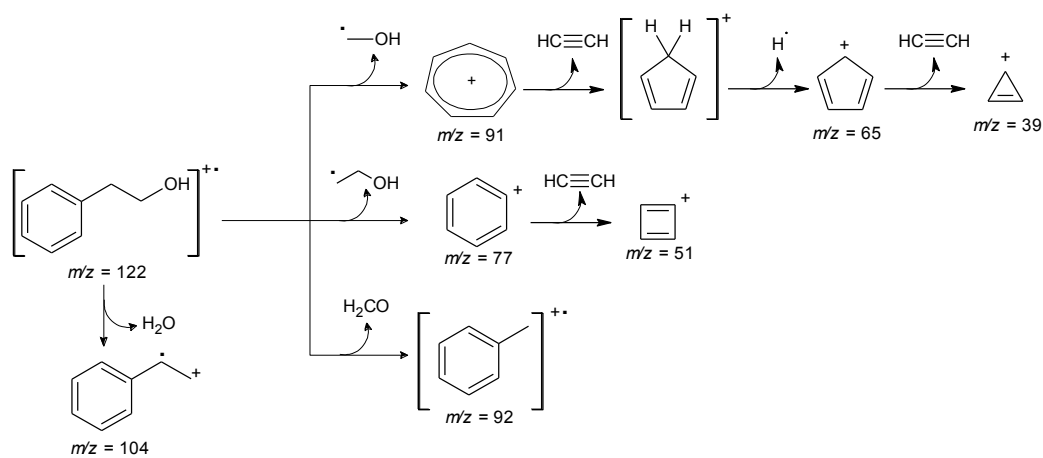
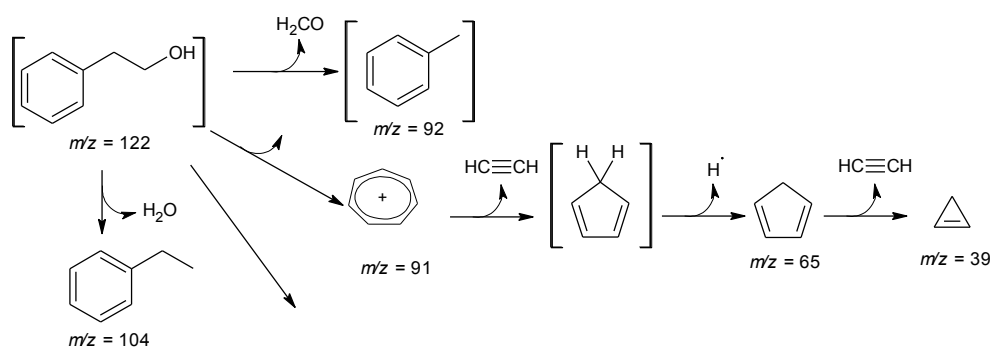
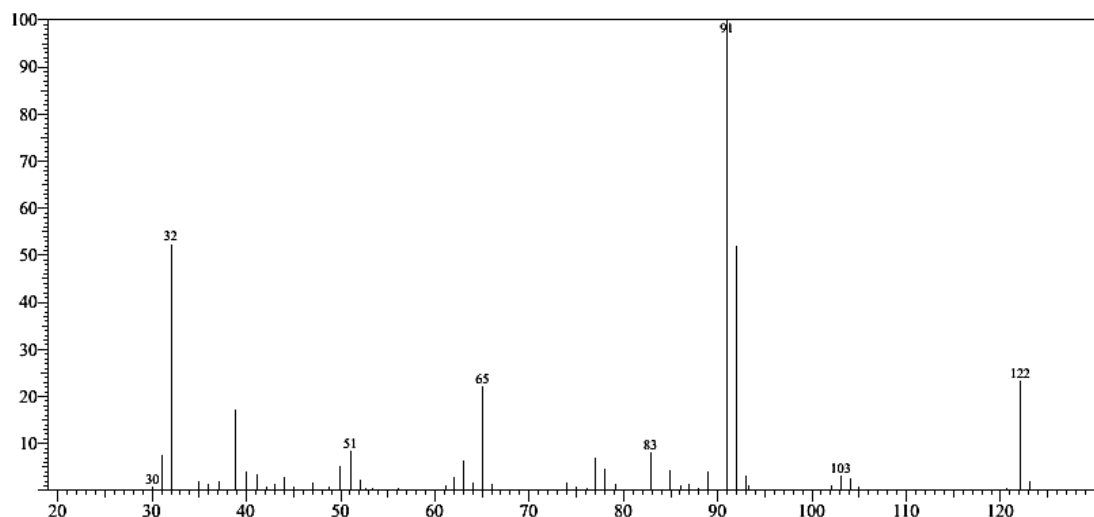
$$\text{\%Rendimento} = \frac{\text{massa de extrato}}{\text{biomassa}} \times 100$$

^d BDC: Meio líquido batata-dextrose caldo, ^e CV: Coeficiente de variação, ^f Indutor: Ácido nicotínico a 150 mg L⁻¹, ^g Fries: Meio líquido de Fries.

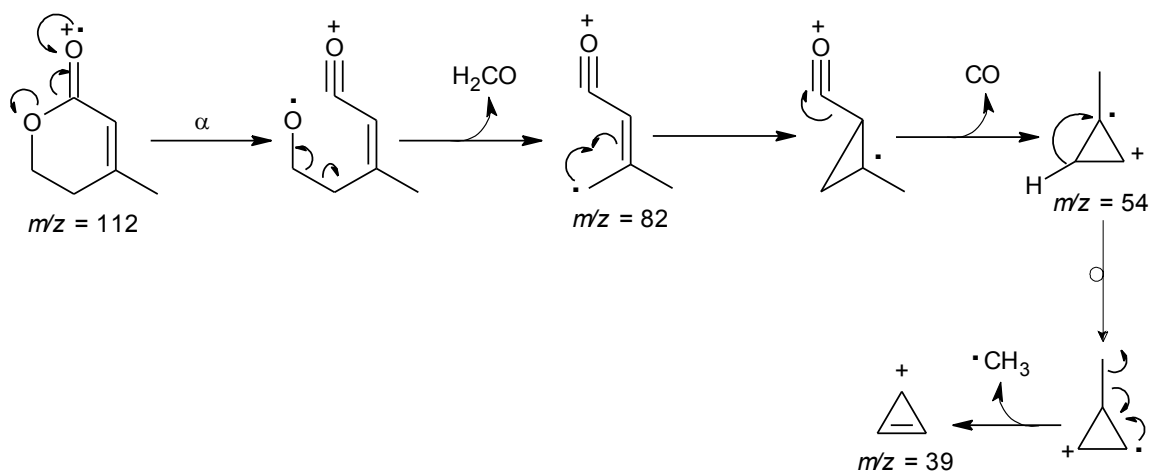
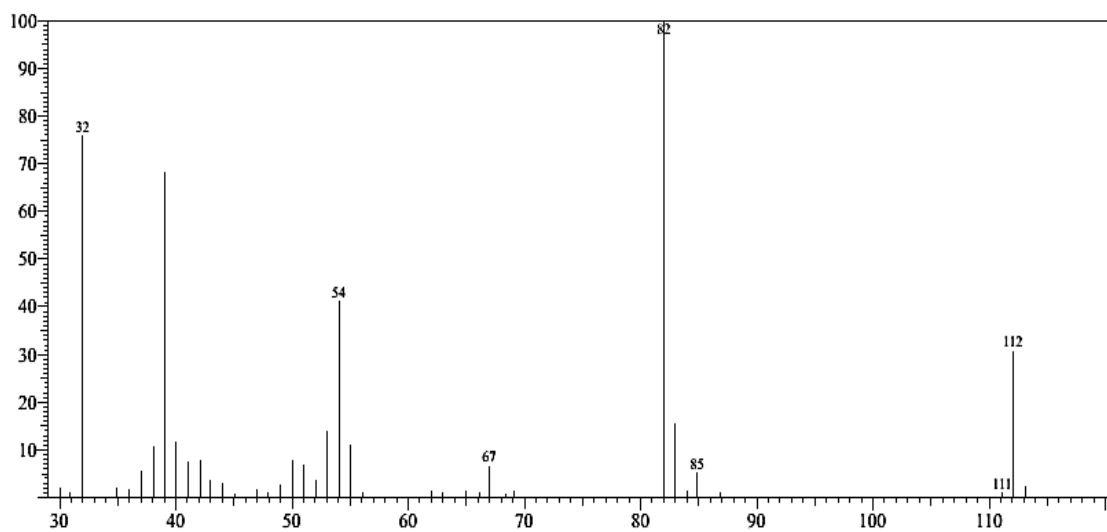
* É comparada cada variável entre fungos e meios, letras semelhantes significam que não há diferença significativa entre eles, segundo teste de Tukey (p < 0,05).

APÊNDICE 2: Espectros de massa dos compostos de maior importância e suas principais fragmentações.

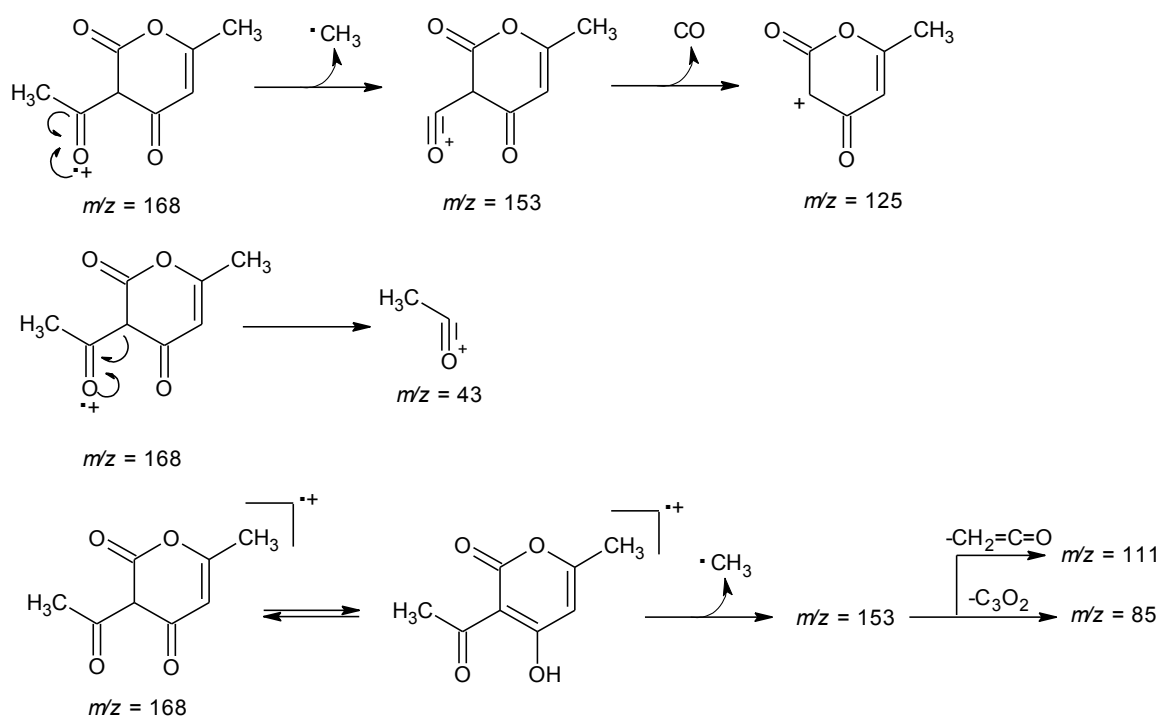
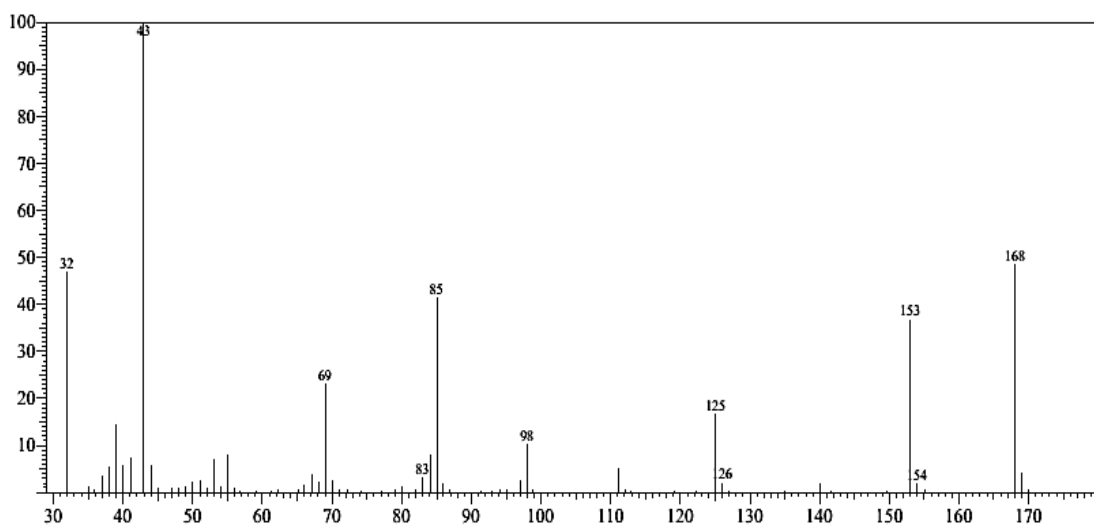
a) 2-Feniletanol, tr=10,80 min, 96 % de similaridade.



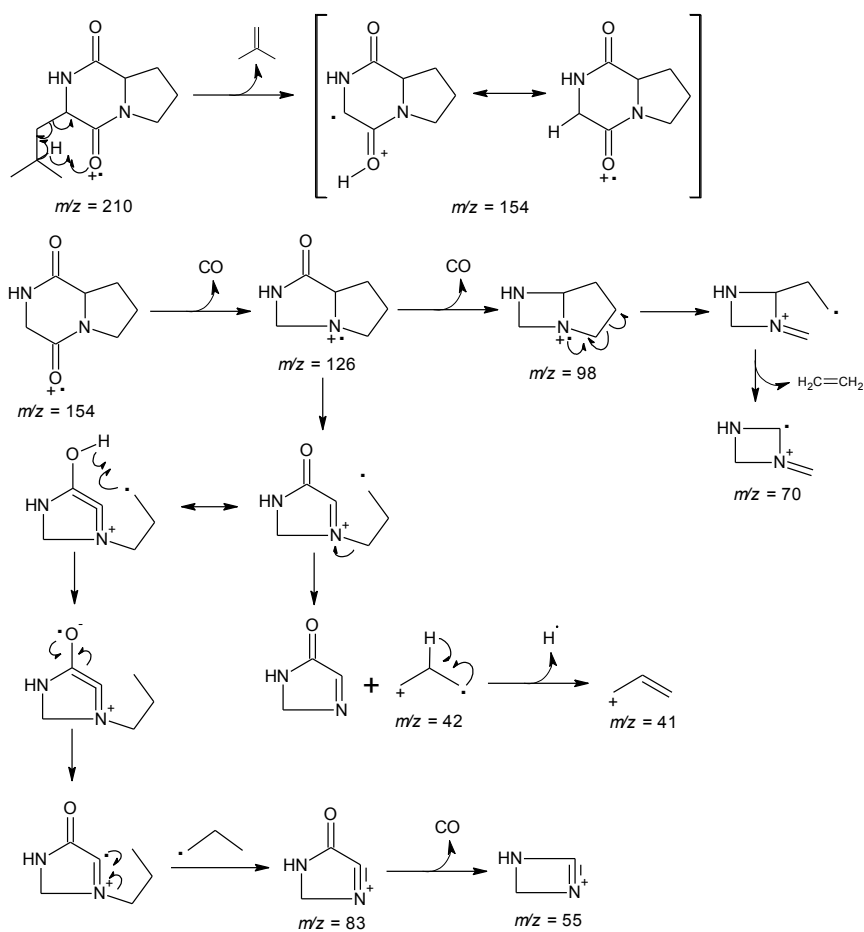
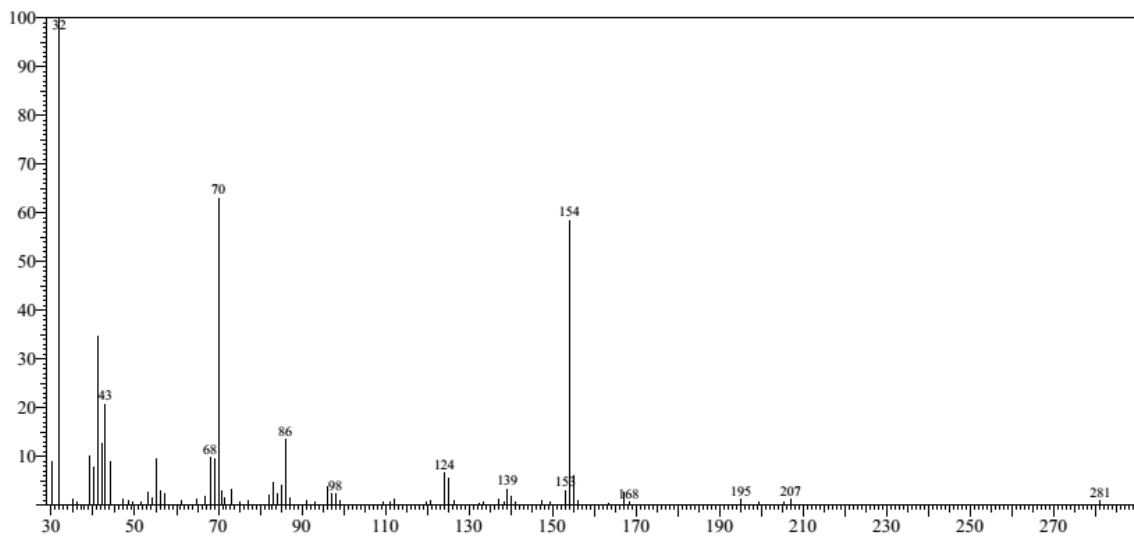
b) Anidromevalonolactona, tr = 11,67 min, 96 % de similaridade.



c) Ácido desidroacético, tr = 14,82 min, 92% de similaridade



d) 3-Isobutilhexaidropirrol[1,2- α]-piperazina-1,4-diona (Ciclopeucilproli), tr = 21,02 min 89% de similaridade.



APÊNDICE 3a: Listado dos metabólitos secundários identificados nos cromatogramas dos extratos das cepas de *Trichoderma spp.*

#	Compostos	tr ^b (min)	% simil. ^c	IA* ^d	Th ^g		Tv ^h		Tl ⁱ		Ta ^j		Tr ^k	
					A ^e (X10 ⁶)	%A ^f	A (X10 ⁶)	%A	A (X10 ⁶)	%A	A (X10 ⁶)	%A	A (X10 ⁶)	%A
1	2-Feniletanol	10,80	97	1.124	2,17	3,88	2,44	5,40	3,79	10,51	3,46	12,74	3,57	8,03
2	Anidromevalonolactona	11,67	96	1.177			3,73	8,25	4,49	12,43			3,60	8,09
3	Diidro-5-(1-hidroxietyl)-2(3H)-Furanona	12,53	91	1.231	1,27	2,27								
4	N/i ^a	12,71	81	1.243			2,57	5,68	1,20	3,34			2,75	6,18
5	Ácido desidroacético	14,82	92	1.384	2,14	3,81	1,80	3,98	0,24	0,66			4,24	9,53
6	N/i	18,81	87	1.698			1,67	3,69					1,03	2,31
7	N/i	19,18	75	1.738			1,96	4,34						
8	N/i	19,23	78	1.743	3,62	6,46								
9	N/i	19,44	87	1.766	22,63	40,38	2,20	4,87					2,88	6,48
10	3-Isobutilhexaidropirrol[1,2-a]-piperazina-1,4-diona (Cicloleucilprolina)	21,02	89	1.969	1,21	2,16	1,91	4,23	0,56	1,55			1,29	2,90
11	N/i	21,11	67	1.981							1,85	6,83		
12	N/i	21,61	76	2.051					1,90	5,28				
13	N/i	24,01	77	2.336			1,20	2,65						
14	Tetracosano (Padrão interno)	24,66	96	2.399	20,82	37,14	21,26	47,03	21,79	60,40	21,34	78,51	21,37	48,04
15	N/i	25,21	71	2.442	0,31	0,56	0,10	2,24					0,49	1,11

^a N/i: Não identificado

^b tr: tempo de retenção em minutos.

^c % simil.: Porcentagem de similaridade segundo o programa GCMSolution[®].

^d IA*: Índice aritmético calculado

^e A (X10⁶): Área do pico expressada exponencialmente vezes 10⁶, ^f %A: Porcentagem de área.

^g Th: *Trichoderma harzianum*, ^h Tv: *Trichoderma viride*, ⁱ Tl: *Trichoderma longibrachiatum*, ^j Ta: *Trichoderma aureoviride*, ^k Tr: *Trichoderma reesei*.

APÊNDICE 3b: Listado das áreas padronizadas (A_p) dos picos dos metabólitos secundários identificados nos cromatogramas dos extratos das cepas de *Trichoderma spp.*

#	Compostos	tr ^b (min)	A _p ^c				
			Th ^d	Tv ^e	Tl ^f	Ta ^g	Tr ^h
1	2-Feniletanol	10,80	0,1042	0,1148	0,1739	0,1621	0,1671
2	Anidromevalonolactona	11,67		0,1754	0,2061		0,1685
3	N/i ^a	12,53	0,0610				
4	N/i	12,71		0,1209	0,0551		0,1287
5	Ácido desidroacético	14,82	0,1028	0,0847	0,0110		0,1984
6	N/i	18,81		0,0786			0,0482
7	N/i	19,18		0,0922			
8	N/i	19,23	0,1739				
9	N/i	19,44	1,0869	0,1035			0,1348
10	3-Isobutilhexaidropirrolol[1,2-a]-piperazina-1,4-diona (Cicloleucilprolina)	21,02	0,0581	0,0898	0,0257		0,0604
11	N/i	21,11				0,0867	
12	N/i	21,61			0,0872		
13	N/i	24,01		0,0564			
14	N/i	25,21	0,0149	0,0047			0,0229

^a N/i: Não identificado

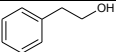

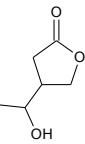
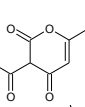
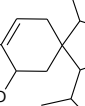
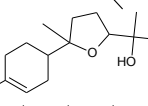
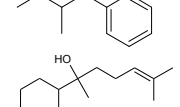
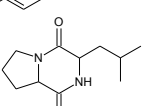

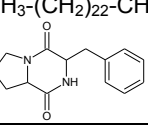
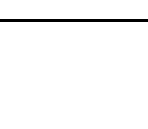
^btr: tempo de retenção em minutos.

^cA_p: Área padronizadas, $A_p = \frac{\text{Área do pico}}{\text{Área do padrão interno}}$

^d Th: *Trichoderma harzianum*, ^e Tv: *Trichoderma viride*, ^f Tl: *Trichoderma longibrachiatum*, ^g Ta: *Trichoderma aureoviride*, ^h Tr: *Trichoderma reesei*.

*As áreas correspondentes a todos os picos se apresentam no Apêndice 3a.

APÊNDICE4: Estruturas dos possíveis compostos nos extratos segundo o programa GCMSsolution®.

#	Composto	tr (min)	% simil.	Estrutura	Th	Tv	Tl	Ta	Tr
1	2-Feniletanol	10,80	97		x	x	x	x	x
2	Anidromevalonolactona	11,67	96			x	x		x
3	Diidro-5-(1-hidroxietil)-2(3H)-Furanona	12,53	91		x				
4	2,5-Dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona	12,71	81			x	x		x
5	Ácido desidroacético	14,82	92		x	x	x		x
6	1-Isopropil-4,8-dimetilspiro[4,5]dec-8-en-ol	18,81	87			x			x
7	óxido de α-Bisabolol	19,18	75			x			
8	2-Metilbutilbenzeno	19,23	78		x				
9	α-Bisabolol	19,44	87		x	x			x
10	3-Isobutilhexaidropirrol[1,2-a]-piperazina-1,4-diona (Ciclo(Leu-Pro))	21,02	89		x	x	x		x
11	α-Gurjuneno	21,11	67					x	
12	Oct-4-ino-3,6-diol	21,61	76				x		
13	Cembreno	24,01	77			x			
14	Tetracosano (Padrão interno)	24,66	96	CH ₃ -(CH ₂) ₂₂ -CH ₃	x	x	x	x	x
15	3-Benzilhexaidropirrol[1,2-a]-piperazina-1,4-diona (Ciclo(Phe-Pro))	25,21	71		x	x			x

x: Significa que o composto está nesse extrato de fungo

APÊNDICE5: Resultados da medição do comprimento da raiz das sementes de pepino no teste de germinação.

Concentração (mg L ⁻¹)	<i>T. harzianum</i>		<i>T. ressei</i>		<i>T. aureoviride</i>		<i>T. longibrachiatum</i>		<i>T. viride</i>	
	C ₀ ^a Raiz (mm)*	CV ^b	C ₀ Raiz (mm)	CV	C ₀ Raiz (mm)	CV	C ₀ Raiz (mm)	CV	C ₀ Raiz (mm)	CV
1000	44,09 ± 2,34 (lm)	5,31	3,11 ± 0,59 (q)	18,99	51,13 ± 0,32 (ijl)	0,63	15,71 ± 1,39 (op)	8,84	7,54 ± 0,74 (pq)	9,79
500	44,52 ± 2,89 (lm)	6,49	7,98 ± 1,62 (opq)	20,26	61,18 ± 0,93 (fghi)	1,52	46,55 ± 1,68 (jl)	3,61	13,37 ± 0,08 (op)	0,60
250	56,97 ± 0,60 (ghi)	1,06	16,95 ± 3,46 (o)	20,41	60,78 ± 0,90 (efgh)	1,48	54,19 ± 0,16 (hij)	0,30	52,76 ± 0,38 (hijl)	0,72
125	59,82 ± 0,78 (ghi)	1,30	34,38 ± 4,80 (n)	13,96	36,47 ± 4,21 (mn)	11,54	82,75 ± 3,91 (ab)	4,73	61,09 ± 1,64 (efgh)	2,68
62,5	64,90 ± 2,48 (defg)	3,82	78,54 ± 5,34 (bc)	6,80	86,09 ± 6,82 (ab)	7,92	71,72 ± 2,35 (cd)	3,28	80,70 ± 6,18 (bc)	7,65
31,25	53,01 ± 0,53 (hijl)	1,00	72,60 ± 2,80 (cd)	3,86	69,38 ± 0,75 (de)	1,08	89,85 ± 4,47 (a)	4,98	68,96 ± 1,09 (def)	1,58
DMSO 0,5%	55,86 ± 1,03 (ghi)	1,85								
H₂O	54,65 ± 1,25 (hij)	2,28								

^aC₀: Comprimento

^bCV: É o coeficiente de variação

APÊNDICE6: Resultados da medição do comprimento do caule das sementes de pepino no teste de germinação.

Concentração (mg L ⁻¹)	<i>T. harzianum</i>		<i>T. ressei</i>		<i>T. aureoviride</i>		<i>T. longibrachiatum</i>		<i>T. viride</i>	
	C ₀ Caule (mm)	CV	C ₀ Caule (mm)	CV	C ₀ Caule (mm)	CV	C ₀ Caule (mm)	CV	C ₀ Caule (mm)	CV
1000	51,53 ± 1,02 (cdefg)	1,98	3,23 ± 0,52 (o)	16,05	48,29 ± 0,59 (fgh)	1,22	31,58 ± 2,15 (m)	6,81	13,91 ± 3,10 (n)	22,32
500	48,66 ± 0,55 (fgh)	1,13	17,23 ± 1,67 (n)	9,68	46,35 ± 0,16 (ghi)	0,35	50,25 ± 0,66 (efgh)	1,31	37,96 ± 1,64 (jlm)	4,32
250	61,26 ± 3,59 (a)	5,86	35,57 ± 2,47 (lm)	6,94	50,48 ± 0,24 (efgh)	0,48	51,05 ± 1,23 (defgh)	2,41	62,66 ± 3,04 (a)	4,85
125	52,71 ± 1,43 (bcdefg)	2,71	39,05 ± 1,52 (ijlm)	3,90	43,10 ± 0,48 (hijl)	1,11	58,61 ± 2,59 (abcd)	4,42	59,04 ± 3,18 (abc)	5,39
62,5	55,19 ± 0,92 (abcdef)	1,66	62,02 ± 0,75 (a)	1,21	55,84 ± 2,36 (abcdef)	4,23	61,73 ± 2,82 (a)	4,57	61,34 ± 2,87 (a)	4,69
31,25	59,58 ± 7,73 (ab)	12,97	57,78 ± 2,35 (abcde)	4,07	58,17 ± 2,51 (abcde)	4,31	58,22 ± 2,66 (abcde)	4,57	60,84 ± 3,52 (a)	5,78
DMSO 0,5%	50,80 ± 1,88 (defgh)	3,71								
H₂O	45,54 ± 2,00 (ghij)	4,38								

APÊNDICE7: Porcentagem de inibição do crescimento da raiz de pepino no teste de germinação.

Concentração (mg L ⁻¹)	<i>T. harzianum</i>		<i>T. ressei</i>		<i>T. aureoviride</i>		<i>T. longibrachiatum</i>		<i>T. viride</i>	
	%C ^a Raiz	CV	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV
1000	-19,32 ± 4,28	22,15	-94,31 ± 1,08	1,15	-6,44 ± 0,59	9,10	-71,25 ± 2,54	3,57	-86,21 ± 1,35	1,57
500	-18,53 ± 5,29	28,53	-85,39 ± 2,96	3,47	10,11 ± 1,70	16,81	-14,82 ± 3,07	20,73	-75,53 ± 0,15	0,19
250	4,24 ± 1,10	25,95	-68,99 ± 6,34	9,18	11,22 ± 1,64	14,64	-0,84 ± 0,29	35,35	-3,45 ± 0,69	20,10
125	9,46 ± 1,43	15,10	-37,10 ± 8,78	23,67	-33,26 ± 7,71	23,19	51,41 ± 7,15	13,91	11,78 ± 2,99	25,41
62,5	18,75 ± 4,54	24,20	43,72 ± 9,77	22,35	57,54 ± 12,47	21,68	31,24 ± 4,30	13,78	47,66 ± 11,30	23,71
31,25	-3,01 ± 0,97	32,17	32,85 ± 5,12	15,57	26,95 ± 1,38	5,11	64,41 ± 8,19	12,71	26,18 ± 1,99	7,61

^a%C: Porcentagem de inibição.

APÊNDICE8: Porcentagem de inibição do crescimento do caule de pepino no teste de germinação.

Concentração (mg L ⁻¹)	<i>T. harzianum</i>		<i>T. ressei</i>		<i>T. aureoviride</i>		<i>T. longibrachiatum</i>		<i>T. viride</i>	
	%CCaule	CV	%CCaule	CV	%CCaule	CV	%CCaule	CV	%CCaule	CV
1000	13,14 ± 2,24	17,03	-92,92 ± 1,14	1,22	6,04 ± 1,29	21,48	-30,67 ± 4,72	15,40	-69,45 ± 6,82	9,82
500	6,84 ± 1,21	17,64	-62,17 ± 3,66	5,89	1,77 ± 0,36	20,48	10,34 ± 1,44	13,93	-16,66 ± 3,60	21,62
250	34,52 ± 7,89	22,86	-21,89 ± 5,42	24,75	10,84 ± 0,53	4,91	12,08 ± 2,71	22,43	37,59 ± 6,67	17,73
125	15,73 ± 3,14	19,94	-14,25 ± 3,35	23,47	-5,36 ± 1,05	19,67	28,69 ± 5,69	19,83	29,64 ± 6,98	23,56
62,5	21,18 ± 2,01	9,51	36,19 ± 1,64	4,54	22,60 ± 5,19	22,94	35,53 ± 6,20	17,44	34,68 ± 6,31	18,20
31,25	30,83 ± 16,97	55,04	26,88 ± 5,15	19,17	27,72 ± 5,50	19,84	27,84 ± 5,84	21,00	33,58 ± 7,73	23,01

APÊNDICE9: Resultados da medição do comprimento da raiz das sementes de sorgo no teste de germinação.

Concentração (mg L ⁻¹)	<i>T. harzianum</i>		<i>T. ressei</i>		<i>T. aureoviride</i>		<i>T. longibrachiatum</i>		<i>T. viride</i>	
	C ₀ Raiz (mm)	CV	C ₀ Raiz (mm)	CV	C ₀ Raiz (mm)	CV	C ₀ Raiz (mm)	CV	C ₀ Raiz (mm)	CV
1000	10,72 ± 1,18 (mn)	10,96	4,01 ± 0,92 (o)	23,02	5,43 ± 1,84 (o)	33,93	3,95 ± 0,32 (o)	8,18	4,95 ± 0,93 (o)	18,73
500	18,42 ± 1,13 (hi)	6,12	5,19 ± 0,74 (o)	14,22	11,84 ± 2,51 (lm)	21,25	12,13 ± 3,49 (jl)	28,80	6,64 ± 0,69 (o)	10,33
250	13,13 ± 1,12 (jl)	8,51	7,65 ± 1,49 (no)	19,48	15,70 ± 1,93 (ij)	12,29	20,34 ± 1,99 (gh)	9,79	19,96 ± 4,05 (gh)	20,27
125	28,66 ± 1,16 (ef)	4,03	15,55 ± 4,16 (ij)	26,72	23,25 ± 2,96 (g)	12,73	18,01 ± 5,09 (hi)	28,26	22,66 ± 2,23 (g)	14,25
62,5	35,12 ± 1,49 (d)	4,25	29,15 ± 2,46 (ef)	8,44	27,42 ± 2,83 (f)	10,32	32,01 ± 1,58 (de)	4,94	34,40 ± 1,49 (d)	4,33
31,25	40,67 ± 0,20 (bc)	0,49	52,28 ± 1,06 (a)	2,03	43,97 ± 0,62 (b)	1,41	39,67 ± 0,32 (c)	3,68	54,31 ± 0,70 (a)	1,29
DMSO 0,5%	41,73 ± 0,89 (bc)	2,12								
H₂O	33,73 ± 0,37 (cd)	1,08								

APÊNDICE 10: Resultados da medição do comprimento do caule das sementes de sorgo no teste de germinação.

Concentração (mg L ⁻¹)	<i>T. harzianum</i>		<i>T. ressei</i>		<i>T. aureoviride</i>		<i>T. longibrachiatum</i>		<i>T. viride</i>	
	C ₀ Caule (mm)	CV	C ₀ Caule (mm)	CV	C ₀ Caule (mm)	CV	C ₀ Caule (mm)	CV	C ₀ Caule (mm)	CV
1000	30,19 ± 1,95 (hijl)	6,46	13,39 ± 2,68 (l)	19,99	29,88 ± 5,97 (hij)	19,97	30,54 ± 1,56 (hij)	5,10	32,08 ± 3,37 (hij)	10,50
500	31,24 ± 1,24 (hijl)	3,98	34,53 ± 3,76 (ghi)	10,89	49,15 ± 0,88 (cdef)	1,79	40,68 ± 2,66 (fg)	6,54	34,61 ± 2,71 (ghi)	7,82
250	25,79 ± 1,48 (j)	5,74	28,55 ± 2,24 (ij)	7,85	51,80 ± 0,57 (cde)	1,10	36,90 ± 2,88 (ghi)	7,81	46,54 ± 2,16 (ef)	4,64
125	37,60 ± 1,84(gh)	4,89	31,52 ± 3,16 (hij)	10,02	37,53 ± 2,11 (gh)	5,62	30,88 ± 6,27 (hij)	20,32	35,53 ± 1,00 (ghi)	2,83
62,5	41,13 ± 1,12 (fg)	2,73	49,07 ± 0,76 (def)	1,55	57,64 ± 0,27 (bc)	0,47	51,66 ± 0,34 (cde)	0,66	46,16 ± 1,19 (ef)	2,58
31,25	76,15 ± 0,29 (a)	0,38	78,03 ± 3,39 (a)	4,34	66,11 ± 2,13 (b)	3,22	78,34 ± 0,91(a)	1,17	83,09 ± 4,73 (a)	5,69
DMSO 0,5%	56,10 ± 0,79 (cd)	1,42								
H₂O	47,75 ± 3,17 (def)	6,64								

APÊNDICE 11: Porcentagem de inibição do crescimento da raiz de sorgo no teste de germinação.

Concentração (mg L ⁻¹)	<i>T. harzianum</i>		<i>T. ressei</i>		<i>T. aureoviride</i>		<i>T. longibrachiatum</i>		<i>T. viride</i>	
	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV
1000	-74,30 ± 2,82	3,79	-90,39 ± 2,21	2,45	-87,00 ± 4,41	5,07	-90,52 ± 0,78	0,86	-88,13 ± 2,22	2,52
500	-55,87 ± 2,70	4,83	-87,56 ± 1,77	2,02	-71,63 ± 6,03	8,41	-70,94 ± 8,37	11,80	-84,09 ± 1,64	1,95
250	-68,54 ± 2,68	3,91	-81,68 ± 3,57	4,37	-62,39 ± 4,62	7,41	-51,26 ± 4,77	9,31	-52,18 ± 9,69	18,57
125	-31,31 ± 2,77	8,85	-62,73 ± 9,96	15,88	-44,29 ± 7,08	16,00	-56,84 ± 12,22	21,49	-45,69 ± 7,73	16,93
62,5	-15,85 ± 3,58	22,56	-30,15 ± 5,89	19,55	-34,29 ± 6,79	19,81	-23,30 ± 3,78	16,24	-17,56 ± 3,57	20,34
31,25	-2,55 ± 0,48	18,81	25,27 ± 2,55	10,07	5,36 ± 1,50	27,91	-4,94 ± 0,78	15,77	30,14 ± 1,67	5,55

APÊNDICE 12: Porcentagem de inibição do crescimento do caule de sorgo no teste de germinação.

Concentração (mg L ⁻¹)	<i>T. harzianum</i>		<i>T. ressei</i>		<i>T. aureoviride</i>		<i>T. longibrachiatum</i>		<i>T. viride</i>	
	%CCaule	CV	%CCaule	CV	%CCaule	CV	%CCaule	CV	%CCaule	CV
1000	-46,13 ± 3,48	7,55	-76,11 ± 4,78	6,28	-46,69 ± 10,65	22,80	-45,51 ± 2,78	6,11	-42,77 ± 6,01	14,05
500	-44,27 ± 2,22	5,01	-38,40 ± 6,71	17,47	-12,31 ± 1,57	12,75	-27,23 ± 4,76	17,47	-38,25 ± 4,83	12,63
250	-54,00 ± 2,64	4,89	-49,06 ± 4,00	8,15	-7,58 ± 1,01	13,31	-34,17 ± 5,14	15,05	-17,05 ± 3,84	22,54
125	-32,92 ± 3,28	9,97	-43,76 ± 5,63	12,88	-33,05 ± 3,77	11,40	-44,91 ± 11,20	24,93	-36,61 ± 1,79	4,89
62,5	-26,61 ± 2,00	7,52	-12,45 ± 1,35	10,87	2,84 ± 0,48	17,01	-7,59 ± 0,61	8,02	-17,72 ± 2,12	11,94
31,25	35,87 ± 0,52	1,44	39,21 ± 6,04	15,41	17,95 ± 3,79	21,14	39,76 ± 1,63	4,11	48,09 ± 8,43	17,53

APÊNDICE 13: Resultados das massas secas das raízes de pepino no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	m _{seca} ^a raiz (g)	CV	m _{seca} raiz (g)	CV	m _{seca} raiz (g)	CV
<i>T. harzianum</i>	0,2217 ± 0,0025 (cd)	1,13	0,2126 ± 0,0048 (cd)	2,27	0,2590 ± 0,0019 (bcd)	0,72
<i>T. aureoviride</i>	0,5208 ± 0,0273 (a)	5,23	0,4597 ± 0,0492 (a)	10,71	0,5512 ± 0,0816 (a)	14,80
<i>T. ressei</i>	0,2416 ± 0,0009(bcd)	0,36	0,3389 ± 0,0278 (b)	8,20	0,2956 ± 0,0132 (bc)	4,47
<i>T. longibrachiatum</i>	0,2236 ± 0,0016 (cd)	0,73	0,2804 ± 0,0105 (bcd)	3,76	0,3416 ± 0,0186 (b)	5,45
<i>T. viride</i>	0,2107 ± 0,0047 (cd)	2,22	0,2441 ± 0,0013 (bcd)	0,55	0,1704 ± 0,0136 (d)	8,00
Dual®	0,0000 ± 0,0000 (e)	0,00	0,0067 ± 0,0060 (e)	90,28	0,0145 ± 0,0014 (e)	9,44
H ₂ O	0,2328 ± 0,0810 (bcd)	34,79				
DMSO 0,5%	0,4657 ± 0,0905 (a)	19,44				

^a m_{seca}: Massa seca

APÊNDICE 14: Resultados das massas secas da parte aérea de pepino no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	m _{seca} PA ^a (g)	CV	m _{seca} PA (g)	CV	m _{seca} PA (g)	CV
<i>T. harzianum</i>	0,2280 ± 0,0527 (bcde)	23,09	0,3031 ± 0,0186 (ab)	6,15	0,2832 ± 0,0353 (abc)	12,45
<i>T. aureoviride</i>	0,2676 ± 0,0257 (abcd)	9,61	0,3193 ± 0,0051 (ab)	1,59	0,2976 ± 0,0206 (ab)	6,93
<i>T. ressei</i>	0,3080 ± 0,0277 (ab)	9,00	0,3361 ± 0,0130 (ab)	3,86	0,3260 ± 0,0238 (ab)	7,31
<i>T. longibrachiatum</i>	0,3447 ± 0,0181 (ab)	5,26	0,3993 ± 0,0065 (ab)	1,62	0,3522 ± 0,0133 (ab)	3,77
<i>T. viride</i>	0,1041 ± 0,0507 (cdef)	48,68	0,0667 ± 0,0229 (ef)	34,41	0,0984 ± 0,0487 (def)	49,48
Dual®	0,0000 ± 0,0000 (f)	0,00	0,0130 ± 0,0113 (f)	86,67	0,0353 ± 0,0180 (f)	51,14
H ₂ O	0,4468 ± 0,2226 (a)	49,83				
DMSO 0,5%	0,2422 ± 0,0642 (bcde)	26,51				

^a PA: Parte aérea

APÊNDICE 15: Porcentagens de inibição do crescimento das raízes de pepino no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	%Raiz	CV	%Raiz	CV	%Raiz	CV
<i>T. harzianum</i>	-4,78 ± 1,08	62,62	-8,70 ± 2,07	23,82	11,24 ± 0,80	7,08
<i>T. aureoviride</i>	123,69 ± 11,71	9,46	97,44 ± 21,14	21,70	136,74 ± 35,03	25,62
<i>T. ressei</i>	3,75 ± 0,37	9,87	45,55 ± 11,93	26,19	26,97 ± 5,68	21,06
<i>T. longibrachiatum</i>	-3,95 ± 0,70	17,71	20,42 ± 4,53	22,17	46,71 ± 8,00	17,12
<i>T. viride</i>	-9,51 ± 2,01	21,13	4,84 ± 0,58	11,94	-26,83 ± 5,85	21,82
Dual®	-100,00 ± 0,00	0,00	-97,14 ± 2,58	2,66	-93,79 ± 0,59	0,63

APÊNDICE 16: Porcentagens de inibição do crescimento da parte aérea (CPA) de pepinono teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	%CPA	CV	%CPA	CV	%CPA	CV
<i>T. harzianum</i>	-48,97 ± 11,78	24,06	-32,17 ± 4,17	12,97	-36,61 ± 7,89	21,55
<i>T. aureoviride</i>	-40,11 ± 5,75	14,35	-28,53 ± 1,13	3,97	-33,40 ± 4,61	13,81
<i>T. ressei</i>	-31,08 ± 6,21	19,97	-24,78 ± 2,90	11,71	-27,04 ± 5,33	19,71
<i>T. longibrachiatum</i>	-22,85 ± 4,06	17,77	-10,63 ± 1,45	13,63	-21,18 ± 2,97	14,04
<i>T. viride</i>	-76,70 ± 11,34	14,79	-85,07 ± 5,14	6,04	-77,97 ± 10,90	13,98
Dual®	-100,00 ± 0,00	0,00	-97,08 ± 2,53	2,60	-92,11 ± 4,04	4,38

APÊNDICE 17: Resultados das massas secas das raízes de sorgo no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	m _{seca} raiz (g)	CV	m _{seca} raiz (g)	CV	m _{seca} raiz (g)	CV
<i>T. harzianum</i>	0,1637 ± 0,0166 (defg)	10,11	0,1565 ± 0,0089 (efg)	5,66	0,1635 ± 0,0086(defg)	5,23
<i>T. aureoviride</i>	0,1711 ± 0,0064 (cdef)	3,74	0,1143 ± 0,0286(g)	25,00	0,1710 ± 0,0067(cdef)	3,91
<i>T. ressei</i>	0,1527 ± 0,0095 (fg)	6,19	0,1818 ± 0,0063 (cdef)	3,48	0,2750 ± 0,0040 (a)	1,46
<i>T. longibrachiatum</i>	0,2067 ± 0,0014 (cde)	0,70	0,1932 ± 0,0009 (cdef)	0,44	0,2221 ± 0,0020 (bc)	0,88
<i>T. viride</i>	0,1920 ± 0,0029 (cdef)	1,50	0,2040 ± 0,0022 (cdef)	1,10	0,1982 ± 0,0016 (cdef)	0,80
Dual®	0,0210 ± 0,0364(h)	173,21	0,0245 ± 0,0248(h)	101,25	0,0182 ± 0,0185(h)	101,46
H ₂ O	0,2112 ± 0,0172(cd)	8,14				
DMSO 0,5%	0,2705 ± 0,0410(ab)	15,14				

APÊNDICE 18: Resultados das massas secas da parte aérea de sorgo no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	m _{seca} PA (g)	CV	m _{seca} PA (g)	CV	m _{seca} PA (g)	CV
<i>T. harzianum</i>	0,1237 ± 0,0056 (cde)	4,50	0,1548 ± 0,0005 (ab)	0,32	0,1311 ± 0,0060(abcde)	4,55
<i>T. aureoviride</i>	0,1196 ± 0,0097(de)	8,13	0,1260 ± 0,0113(bcde)	8,95	0,1403 ± 0,0014(abcde)	0,97
<i>T. ressei</i>	0,1183 ± 0,0067 (de)	5,69	0,1478 ± 0,0027(abcd)	1,84	0,1303 ± 0,0005 (abcde)	0,36
<i>T. longibrachiatum</i>	0,1439 ± 0,0024(abcde)	1,67	0,1234 ± 0,0041(cde)	3,32	0,1142 ± 0,0093 (e)	8,11
<i>T. viride</i>	0,1345 ± 0,0050(abcde)	3,69	0,1435 ± 0,0014(abcde)	1,00	0,1537 ± 0,0013 (abc)	0,83
Dual®	0,0104 ± 0,0180(f)	173,21	0,0282 ± 0,0281(f)	99,68	0,0360 ± 0,0151(f)	42,08
H ₂ O	0,1592 ± 0,0099(a)	6,21				
DMSO 0,5%	0,1398 ± 0,0067(abcde)	4,76				

APÊNDICE 19: Porcentagens de inibição do crescimento das raízes de sorgo no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV
<i>T. harzianum</i>	-22,47 ± 7,84	34,87	-25,92 ± 4,19	16,17	-22,60 ± 4,05	17,91
<i>T. aureoviride</i>	-18,97 ± 3,03	15,98	-45,88 ± 13,53	29,49	-19,03 ± 3,16	16,63
<i>T. ressei</i>	-27,71 ± 4,48	16,16	-13,94 ± 3,00	21,51	30,19 ± 1,90	6,29
<i>T. longibrachiatum</i>	-2,13 ± 0,68	32,05	-8,54 ± 0,40	4,72	5,15 ± 0,93	18,04
<i>T. viride</i>	-9,08 ± 1,36	15,00	-4,02 ± 1,05	26,20	-6,17 ± 0,76	12,24
Dual®	-90,06 ± 17,22	19,12	-88,40 ± 11,75	13,29	-91,37 ± 8,76	9,59

APÊNDICE 20: Porcentagens de inibição do crescimento da parte aérea de sorgo no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	%CPA	CV	%CPA	CV	%CPA	CV
<i>T. harzianum</i>	-22,28 ± 3,50	15,69	-2,78 ± 0,31	11,13	-17,63 ± 3,75	21,27
<i>T. aureoviride</i>	-24,85 ± 6,11	24,57	-20,88 ± 7,08	33,92	-11,89 ± 0,85	7,17
<i>T. ressei</i>	-25,69 ± 4,23	16,47	-7,16 ± 1,71	23,85	-18,13 ± 0,30	1,64
<i>T. longibrachiatum</i>	-9,63 ± 1,51	15,63	-22,51 ± 2,58	11,45	-28,25 ± 5,82	20,61
<i>T. viride</i>	-15,54 ± 3,11	20,04	-9,84 ± 0,90	9,17	-3,43 ± 0,80	23,31
Dual®	-93,49 ± 11,28	12,06	-82,27 ± 17,68	21,49	-77,39 ± 9,52	12,30

APÊNDICE 21: Resultados das massas secas das raízes de corda de viola no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	m _{seca} raiz (g)	CV	m _{seca} raiz (g)	CV	m _{seca} raiz (g)	CV
<i>T. harzianum</i>	0,0646 ± 0,0011 (cde)	1,63	0,1310 ± 0,0062 (ab)	4,74	0,0782 ± 0,0046 (c)	5,91
<i>T. aureoviride</i>	0,0364 ± 0,0031 (fg)	8,38	0,1168 ± 0,0110 (b)	9,39	0,0090 ± 0,0022 (hi)	24,39
<i>T. ressei</i>	0,0292 ± 0,0030 (gh)	10,29	0,0386 ± 0,0031 (efg)	8,05	0,0800 ± 0,0040 (c)	5,00
<i>T. longibrachiatum</i>	0,0211 ± 0,0051 (ghi)	24,40	0,0710 ± 0,0012 (cd)	1,67	0,1468 ± 0,0187 (a)	12,74
<i>T. viride</i>	0,0297 ± 0,0044 (gh)	14,75	0,0727 ± 0,0023 (cd)	3,14	0,0277 ± 0,0033 (gh)	11,84
Dual®	0,0000 ± 0,0000(i)	0,00	0,0000 ± 0,0000(i)	0,00	0,0000 ± 0,0000 (i)	0,00
H ₂ O	0,0608 ± 0,0282 (cdef)	46,32				
DMSO 0,5%	0,0670 ± 0,0147 (defg)	21,94				

APÊNDICE 22: Resultados das massas secas da parte aérea de corda de viola no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	m _{seca} PA (g)	CV	m _{seca} PA (g)	CV	m _{seca} PA (g)	CV
<i>T. harzianum</i>	0,0748 ± 0,0020 (b)	2,71	0,0671 ± 0,0015 (bc)	2,24	0,0550 ± 0,0008 (bcd)	1,48
<i>T. aureoviride</i>	0,0559 ± 0,0006 (bcd)	1,08	0,0093 ± 0,0037 (fg)	39,95	0,0289 ± 0,0088 (ef)	30,43
<i>T. ressei</i>	0,0470 ± 0,0034 (cde)	7,20	0,0416 ± 0,0049 (de)	11,71	0,0497 ± 0,0025 (cde)	5,08
<i>T. longibrachiatum</i>	0,0523 ± 0,0014 (cd)	2,64	0,0516 ± 0,0017 (cd)	3,22	0,0996 ± 0,0041(a)	4,16
<i>T. viride</i>	0,0507 ± 0,0032 (cd)	6,36	0,0631 ± 0,0002 (bc)	0,27	0,0414 ± 0,0023 (de)	5,59
Dual®	0,0000 ± 0,0000 (g)	0,00	0,0000 ± 0,0000 (g)	0,00	0,0000 ± 0,0000 (g)	0,00
H ₂ O	0,0611 ± 0,0277 (bcd)	45,26				
DMSO 0,5%	0,0569 ± 0,0024 (bcd)	4,22				

APÊNDICE 23: Porcentagens de inibição do crescimento das raízes de corda de viola no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV	%CRaiz	CV
<i>T. harzianum</i>	6,14 ± 1,73	28,14	115,40 ± 10,20	8,84	28,60 ± 7,60	26,57
<i>T. aureoviride</i>	-40,11 ± 5,02	12,51	92,00 ± 18,04	19,60	-85,15 ± 3,62	4,25
<i>T. ressei</i>	-51,95 ± 4,95	9,52	-36,49 ± 5,11	14,00	31,51 ± 6,58	20,89
<i>T. longibrachiatum</i>	-65,37 ± 8,45	12,92	16,77 ± 1,95	11,61	141,32 ± 30,76	21,76
<i>T. viride</i>	-51,12 ± 7,21	14,10	19,56 ± 3,76	19,21	-54,47 ± 5,39	9,90
Dual®	-100,00 ± 0,00	0,00	-100,00 ± 0,00	0,00	-100,00 ± 0,00	0,00

APÊNDICE 24: Porcentagens de inibição do crescimento da parte aérea de corda de viola no teste em pote.

	500 mg L ⁻¹		100 mg L ⁻¹		50 mg L ⁻¹	
	%CPA	CV	%CPA	CV	%CPA	CV
<i>T. harzianum</i>	22,36 ± 3,32	14,85	9,81 ± 2,46	25,07	-10,09 ± 1,33	13,21
<i>T. aureoviride</i>	-8,62 ± 0,99	11,45	-84,73 ± 6,10	7,20	-52,78 ± 14,37	27,23
<i>T. ressei</i>	-23,06 ± 5,54	24,01	-31,90 ± 7,98	25,00	-18,70 ± 4,13	22,07
<i>T. longibrachiatum</i>	-14,50 ± 2,26	15,56	-15,65 ± 2,72	17,38	62,87 ± 6,77	10,77
<i>T. viride</i>	-17,07 ± 5,27	30,89	3,22 ± 0,28	8,81	-32,22 ± 3,79	11,76
Dual®	-100,00 ± 0,00	0,00	-100,00 ± 0,00	0,00	-100,00 ± 0,00	0,00