

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**BIOCONTROLE DE FUSARIOSE E  
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE GRÃO-  
DE-BICO POR *TRICHODERMA***

**DÉBORAH CHRISTINA MORAES MESQUITA**

**MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**Brasília, DF**  
**Julho de 2014**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**BIOCONTROLE DE FUSARIOSE E  
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE GRÃO-  
DE-BICO POR *TRICHODERMA***

**DÉBORAH CHRISTINA MORAES MESQUITA**

**ORIENTADORES: Prof. Dr. ADALBERTO CORRÊA CAFÉ FILHO e Dr<sup>a</sup>  
SUELI CORREIA MARQUES DE MELLO**

**Brasília, DF**  
**Julho de 2014**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

# BIOCONTROLE DE FUSARIOSE E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE GRÃO- DE-BICO POR *TRICHODERMA*

DÉBORAH CHRISTINA MORAES MEQUITA

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília do curso de Graduação em Agronomia para a obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo.

APROVADO POR:

---

Adalberto Corrêa Café Filho  
Ph.D., Professor Titular, Departamento de  
Fitopatologia - UnB  
email:cafeilh@unb.br

---

Sueli Correia Marques de Mello  
Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia- Brasília-DF  
email: sueli.mello@embrapa.br

---

Carlos Roberto Spehar  
Ph.D., Professor Adjunto, Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária - UnB  
email: spehar@unb.br

Brasília, 07 de Julho de 2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

Mesquita, Déborah Christina Moraes.

**BIOCONTROLE DE FUSARIOSE E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE GRÃO-DE-BICO POR TRICHODERMA.** / Déborah Christina Moraes Mesquita - Brasília, 2014.

50 páginas.

Monografia de Graduação(G)- Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

Orientador: Adalberto Corrêa Café Filho.

1. Controle Biológico 2 Trichoderma ssp 3 Fusarium oxysporum

I CAFÉ FILHO, A.C.II Dr.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MESQUITA, D.C.M. (2014). **BIOCONTROLE DE FUSARIOSE E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE GRÃO-DE-BICO POR TRICHODERMA.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. 50 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação).

## CESSÃO DE DIREITOS

**Nome do Autor:** DÉBORAH CHRISTINA MORAES MESQUITA.

**Título da Monografia de Conclusão de Curso:** **BIOCONTROLE DE FUSARIOSE E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE GRÃO-DE-BICO POR TRICHODERMA.**

**Grau:** 3º **Ano:** 2014.

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

---

DÉBORAH CHRISTINA MORAES MESQUITA

E-mail: deborah.mesquita@gmail.com

*Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me ensinaram o valor dos estudos, e que sempre se sacrificaram para que eu e meus irmãos pudéssemos ter uma educação de qualidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus pela oportunidade de viver o sonho de estudar na UnB, e por todo o sustento durante todos os anos de graduação, onde nada me faltou, porque tudo ELE me proveu.*

*Aos meus pais Gastão Mesquita e Isabel da Silva, pela dedicação de uma vida, pelo amor incondicional, pelos exemplos de vida de humildade e amor ao próximo. Por me ensinarem a importância de uma boa educação. A minha Mãe por ser meu ponto forte, meu exemplo de mulher e de mãe. Ao meu pai, pelo amor irrestrito pelos filhos, pelo amor as plantas, pelo amor aos semelhantes.*

*Ao meu irmão Anderson Felipe, pelo companheirismo na vida, pela amizade, pelo carinho, pelo cuidado, pelo apoio e amor, por ser o meu pai/irmão. E a minha cunhada Meiriellen Mesquita pelo apoio e carinho.*

*A minha irmã Anna Paula, meu orgulho, por todo amor, companheirismo, pelas ajudas irrestritas e sempre tão imprescindíveis durante todos os anos de faculdade em trabalhos- e principalmente na monografia- por me acalmar, por rir, por ser minha irmã mais nova, mais velha, Por tudo.*

*Ao meu namorado Luiz Felipe Cassol, meu melhor amigo, meu colega de faculdade, meu amor, pelo empenho em todas as etapas desse trabalho, sem o qual não teria sido possível concluir. Pelo apoio irrestrito em todos os momentos da minha vida, me acalmando, dando força, me incentivando, pelo companheirismo, pelo carinho, pelas conversas, por rir das minhas piadas sem graça, por tudo. E a família Cassol por todo apoio.*

*A minha família: minha avó Raimunda, meus tios e tias que sempre me apoiaram e motivaram a buscar alcançar meus objetivos. Em especial a tia Júlia e Tio Riba pelo acolhimento durante os anos de faculdade, pelo apoio e pelo carinho. A minha prima Luciana pela ajuda no primeiro trabalho da faculdade, pelas conversas, pela amizade. E a todos os meus primos e primas pelo carinho e apoio. E ao meu padrasto Nilson por todo apoio e carinho.*

*Ao meu orientador Professor Adalberto Café Filho por me permitir realizar esse trabalho. Por todos os ensinamentos profissionais e como pessoa. Por me incentivar a dar o meu melhor. E me mostrar o amor pelo o que se faz. Obrigada pelas conversas, pela paciência e pela confiança.*

*A minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Sueli Mello, por acreditar em mim e por ter aberto a minha primeira oportunidade de estágio. Pela confiança, carinho, por me incentivar e acreditar em mim. Por me receber a segunda vez e abrir as portas do seu laboratório e toda a estrutura, pela ajuda, carinho, incentivo, ensino, por tudo.*

*Ao aluno de Doutorado William R. O. Soares pela ajuda imprescindível, pela paciência e pelo ensinamento.*

*Ao Sr. Osmar Artiaga proprietário da Fazenda Rio Preto, que muito gentilmente, nos permitiu fazer as coletas das plantas do grão-de-bico e forneceu sementes.*

*Aos colegas da Embrapa CENARGEN : Irene, Drº João, Eustáquio, Marcella Telles, Eder, Débora, Cléo pela ajuda na confecção desse trabalho, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração. Em especial a Irene que muito me ajudou nos momentos finais desse trabalho, e a minha amiga Marcella Telles pelos anos de amizade, pelo apoio, carinho, risadas. E por todo ensinamento e ajuda na confecção desse trabalho.*

*Ao laboratório de sementes, em especial ao professor Fagioli e ao Ricardo pela ajuda no teste de sementes.*

*Aos amigos da Agronomia que me acolheram e adotaram: Luiz Felipe Cassol, Carolina Ramalho, Pedro Luna, Flávia Zanchett, Victor Oliveira, Silas Dutra, por todo carinho, pela amizade, por todos os momentos divertidos, pelos amigos para vida toda.*

*Aos amigos da Agronomia do 2º semestre de 2008: Maria Thereza, Bruna Vieira, Patrícia, Gilma, Pedro Henrique, Renan, Vinicius, Pedro Paulo, Bruno, Tiago Britto, Raphael José, Rony Sousa, por compartilharem comigo um dos melhores anos da minha vida.*

*Aos meus amigos que mesmo distantes sempre me apoiaram: Tássia, Diogo, Emanuele , André, Mayra, Suellen, Saulo, Rafaela, Danielle, Lígia, Luisa, Paulo, Cristiane.*

*A todos os professores da graduação, pelos ensinamentos: Marilusa, Spehar, Cícero Célio, Marcelo Fagioli, Fagion, Carmona, Adalberto Café, Everaldo, Cristina.*

*Especialmente a professora Marilusa e o Manuel por todo o ensinamento, carinho, atenção, oportunidade.*

*E a todos aqueles que contribuíram para que eu pudesse concluir a graduação.*

*Obrigada!*

## RESUMO

### BIOCONTROLE DE FUSARIOSE E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE GRÃO-DE-BICO POR TRICHODERMA.

O grão-de-bico é uma das leguminosas mais importantes no mundo, tendo em vista a sua produção total de grãos situada atrás apenas da produção de soja, amendoim, feijão. Entretanto o consumo de grão-de-bico ainda é muito limitado no Brasil, quando comparado a outras leguminosas como o feijão, especialmente na região do Planalto Central. Atribuiu-se o limitado consumo ao alto custo praticado no mercado em consequência da limitada produção. E um dos principais entraves para produção de grão-de-bico é causada por doenças de solo, como o *Fusarium* sp, fitopatogeno amplamente difundido nos mais diversos ambientes agrícolas. O controle biológico, por sua vez, pode ser inserido no manejo da doença pelo seu potencial de redução do inóculo inicial do patógeno e conseqüentemente, redução da incidência da doença no campo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antagonista de *Trichoderma* spp contra o *Fusarium oxysporum* e a promoção de crescimento na cultura do grão-de-bico. Isolados do antagonista foram avaliados no teste de cultura pareada (cp), o crescimento do patógeno na presença de metabólitos voláteis (mv) e não voláteis (mnv) produzidos por *Trichoderma*. Em seguida, baseando-se nos ensaios in vitro, os isolado CEN423, CEN435, CEN440, CEN445 foram avaliado em casa de vegetação. Para tanto, inoculou-se com o patógeno o substrato e um dia após aplicou-se 10 mL de suspensão do isolado por vaso. Avaliaram-se aos 17 dias após a emergência (DAS), emergência (%), comprimento médio (cm) e peso seco (g), da parte aérea, de raiz de plantas de grão-de-bico. Os isolados CEN423, CEN435, CEN440 e CEN445, foram capazes de reduzir o crescimento micelial do patógeno em culturas pareadas e no teste de metabólitos não voláteis, promovendo emergência e incremento em altura de planta e em matéria seca no grão-de-bico. Demonstrando que o controle biológico pode ser uma alternativa viável ao controle de doenças de solo com o *Fusarium oxysporum*.

**Palavras-chave:** *cicer arietinum* L., Controle biológico, *Trichoderma* spp., *Fusarium oxysporum*.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO .....	4
2.1. Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1. Cultura do grão-de-bico.....	5
3.1.1. Estádios fenológicos da cultura do grão-de-bico.....	7
3.2. <i>Fusarium oxysporum</i> - murcha de fusário.....	7
3.3. O antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. ....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1. Coleta de plantas de grão-de-bico ( <i>Cicer arietinum</i> ) e isolamento de culturas de <i>Fusarium</i> sp. ....	10
4.2. Isolados de <i>Trichoderma</i> spp .....	12
4.3. Avaliação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. ao <i>F. oxysporum</i> em cultura pareada.....	13
4.4. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Fusarium oxysporum</i> .....	15
4.5. Multiplicação de <i>Trichoderma</i> spp. para teste <i>in vivo</i> .....	16
4.6. Multiplicação do Patógeno.....	16
4.7. Efeito de <i>Trichoderma</i> spp. na supressão de doença e promoção de crescimento em casa de vegetação.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
5.1. Avaliação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium oxysporum</i> em cultivo pareado.....	19
5.2. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>F. oxysporum</i> .....	21
5.3. Supressão de doença e promoção de crescimento do grão-de-bico em casa de vegetação .....	24
6. CONCLUSÕES .....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Talhões da Fazenda Rio Preto com quatro genótipos de grão-de-bico (A), amostra de planta coletada com enegrecimento no colmo (B), remoção de tecido (C) e placa com meio Ágar-Água com partes do material coletado (D). .....	11
Figura 2: Representação da escala de notas proposta por BELL <i>et al.</i> (1982).....	14
Figura 3 - Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> quanto ao antagonismo exercido sobre o <i>Fusarium oxysporum</i> : (A) CEN440 –nota 1; (B) CEN597 – nota 2; (C) CEN436 - nota 3 e (D) CEN647 – nota 4.....	20
Figura 4 - Cultura do patógeno <i>F. oxysporum</i> sobre efeito dos metabólitos voláteis: (A) Testemunha; (B) Sobre efeito do CEN143; (C) sobre efeito do CEN435 e (D) sobre efeito do CEN595. ....	22
Figura 5 - Cultura do patógeno <i>F. oxysporum</i> sob efeito dos metabólitos não voláteis: (A) Testemunha; (B) CEN405, (C) CEN423; (D) CEN435; (E) CEN440; (F) CEN445; (G) CEN597 e (H) CEN595. ....	23
Figura 6 - Emergência (%) de plantas de grão-de-bico “Cícero” (aos 17 DAS).....	27
Figura 7- Plantas de grão-de-bico “Cícero” submetidos aos tratamentos em casa de vegetação: (A) testemunha absoluta com <i>Fusarium</i> spp e antagonistas [ <i>Fusarium</i> (-)], CEN423, CEN435, CEN 440 e CEN 445, respectivamente; (B) CEN423, <i>Fusarium</i> e <i>Trichoderma</i> ; (C) CEN423, com inoculação do antagonista [ <i>Fusarium</i> (-)]; (D) testemunha com aplicação de <i>Fusarium</i> e (E) testemunha absoluta sem aplicação de tratamentos. ....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Produção mundial em toneladas (t) das principais espécies leguminosas cultivadas no mundo (FAOSTAT, 2012). .....	6
Tabela 2- Escala fenológica do grão-de-bico .....	7
Tabela 3 – Lista de isolados de <i>Trichoderma</i> sp., utilizados neste trabalho. ....	12
Tabela 4 - Inibição do crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em cultivo pareado. ....	20
Tabela 5 - Efeito inibidor no crescimento de colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> exercido por metabólitos voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. ....	21
Tabela 6 – Ação inibidora no crescimento de colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> exercido, por metabólitos não voláteis produzidos por isolados de <i>Trichoderma</i> spp... ..	23
Tabela 7 - Comprimento médio (cm), da parte aérea, de raiz de plantas de grão-de-bico "Cícero" (aos 17 DAS) cultivado em casa de vegetação, ratados com <i>Trichoderma</i> e valores de desvio padrão (DP) correspondentes.....	24
Tabela 8 - Peso seco (g), da parte aérea e de raiz de plantas de grão-de-bico "Cícero" (aos 17 DAS) cultivado em casa de vegetação, tratadas com <i>Trichoderma</i> , e valores de desvio padrão (DP) correspondentes. ....	25
Tabela 9 – Número de plantas, valores médios e porcentagem de emergência e desvio padrão (DP) de plantas de grão-de-bico "Cícero", em casa de vegetação, aos 17 DAS. ....	26

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e o conseqüente aumento na demanda por alimentos têm provocado forte pressão sobre a agropecuária mundial. A solução deste problema depende do aumento da produtividade e da área cultivada bem como da introdução de novas espécies nos sistemas de cultivo. Esta demanda elevada causa impactos sobre o solo e os demais componentes ambientais (SPEHAR, 2011).

Nesse sentido as leguminosas de grãos representam uma fonte de proteínas baratas de grande potencial, e que ainda podem ter um aproveitamento integral, inclusive em nível de subprodutos. A composição das proteínas em aminoácidos essenciais, ricas em lisina e pobres nos tipos de enxofre (cisteína e metionina), faz com que as leguminosas de grão sejam muito úteis tanto para a alimentação animal como para a humana, porque suas proteínas complementam as dos cereais em dietas pobres ou em dietas sem proteína animal (GATEL; CHAMP, 1998; HUIJSMAN; VAN DER POEL, 1994, tradução nossa).

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L) é uma leguminosa que apresenta, em termos nutricionais, grande potencial a ser explorado, a fim de minimizar as deficiências proteicas e minerais da população, uma vez que o grão-de-bico é boa fonte, não só de proteínas, mas também de minerais (P, Mg, Fe, K, Co, Mn) (AVANCINI *et al*, 1992). Segundo dados da FAOSTAT (2012), o grão-de-bico é uma das leguminosas mais importantes no mundo, tendo em vista a sua produção total de grãos situada atrás apenas da produção de soja, amendoim, feijão, sendo, portanto a quarta maior produção de leguminosa do mundo.

Porém o consumo de grão-de-bico ainda é muito limitado no Brasil, quando comparado a outras leguminosas como o feijão, especialmente na região do Planalto Central, pois são poucas as pesquisas realizadas com essa leguminosa (MOLINA, 2010).

No Cerrado, o grão-de-bico foi cultivado pela primeira vez em 1977 para avaliar seu comportamento agroclimático sob condições do Distrito Federal,

obtendo-se a seguinte conclusão: “A cultura é altamente viável do ponto de vista econômico, mesmo tendo mercado interno limitado, pois se adapta facilmente às condições de clima e solos dos Cerrados” (SHARMA; CERKAUSKAS, 1985). O consumo limitado desta leguminosa atribui-se ao alto custo praticado no mercado em consequência da limitada de produção (ARTIAGA, 2012).

Porém, mesmo com alta adaptabilidade da cultura ao clima e solos do cerrado brasileiro, os principais limitantes à produção de grão-de-bico, são as doenças causadas por patógenos de solo, como o *Fusarium* sp, fitopatogêno amplamente difundido nos mais diversos ambientes agrícolas. Segundo SHARMA; CERKAUSKAS (1985), a murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*, é um dos principais entraves para produção de grão-de-bico.

O controle da murcha de fusário, em hospedeiros suscetíveis, é extremamente difícil e existem poucas estratégias de manejo recomendadas para esta doença (HALL; NASSER, 1996). Os fungicidas químicos não são geralmente utilizados para manejo de murchas vasculares (exceto no tratamento de sementes) por não conseguirem impedir a infecção das plantas, a partir das raízes e colonização do floema das plantas pelo patógeno. O controle biológico, por sua vez, pode ser inserido no manejo da murcha de fusário pelo seu potencial de redução do inóculo inicial do patógeno e consequentemente, redução da incidência da doença no campo (CARVALHO, 2011).

Espécies de *Trichoderma* são potenciais antagonistas de diversos fungos fitopatogênicos. São vários os mecanismos de ação utilizados por esses fungos, dentre os quais, destacando-se a produção de metabólitos e enzimas com propriedades antifúngicas (VAN NGUYEN et al., 2008), o hiperparasitismo (BARBOSA et al., 2001) e a competição por nutrientes (CELAR, 2003). Como vantagem adicional, esses microrganismos são atóxicos ao ser humano e animais (MERTZ et al., 2009) e como simbioses avirulentos associados às plantas (HARMAN et al., 2004). Portanto, eles representam uma possível alternativa para controle biológico de fitopatógenos.

Ademais, alguns isolados de *Trichoderma* têm estimulado o crescimento vegetal (VINALE et al., 2008), pela solubilização de fosfato e outros minerais, colocando-os disponíveis às plantas. Evidências na produção de ácido indolacético (AIA), por *Trichoderma* poderia atuar na regulação do crescimento por alongação de caules jovens.

Enquanto os fungicidas têm somente um efeito temporário, necessitando aplicações repetidas durante o ciclo da cultura, os agentes de controle biológico são capazes, em muitos casos, de se estabelecer, colonizar e de se reproduzir no ecossistema. (HARMAN *et al.*, 2004). Diante disso, o controle biológico apresenta-se como alternativa viável ao uso dos defensivos químicos, oferecendo respostas para muitos problemas enfrentados na agricultura (MELO, 1998).

## 2. OBJETIVO

Avaliar o potencial antagonista de *Trichoderma* spp contra o fitopatógeno *Fusarium* sp. e a promoção de crescimento na cultura do grão-de-bico.

### 2.1. Objetivos específicos

Testar *in vitro* isolados de *Trichoderma* quanto à capacidade antagônica à *Fusarium* sp. utilizando a metodologia de pareamento de culturas.

Testar isolados de *Trichoderma in vitro* quanto ao potencial de inibição do crescimento do *Fusarium*, pela produção de metabólitos voláteis.

Testar isolados de *Trichoderma in vitro* quanto ao potencial de inibição do crescimento do *Fusarium*, pela produção de metabólitos não voláteis.

Testar o efeito de *Trichoderma* spp. na emergência e na promoção de crescimento de plantas de grão-de-bico, em casa de vegetação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Cultura do grão-de-bico

O grão-de-bico é uma leguminosa, que pertence a família *Fabaceae*, subfamília *Papilionoideae* e a tribo *Cicereae* Alef. O gênero *Cicer* tem 43 espécies sendo 9 anuais incluindo o grão-de-bico, 33 são perenes e 1 não específico (SINGH; SAXENA, 1999). É uma planta diploide ( $2n=16$ ), autógama em que a polinização é completada antes da abertura das flores (REDDEN, 2007; BICER, 2008).

O germoplasma do grão-de-bico se compõe de genótipos do tipo "desi" e do tipo "kabuli". O germoplasma "desi" é de sementes pequenas, angulares e de cor escura, cultivado principalmente entre 20 °N e 30 °N e consumido fundamentalmente no subcontinente indiano. O germoplasma "kabuli" é de sementes grandes, redondas e de cor creme, é cultivado acima do 30 °N e consumido preferencialmente no Mediterrâneo (SINGH; SAXENA, 1996; SINGH; VIRMANI, 1996). A maioria dos países produtores do grão-de-bico cultiva o tipo "kabuli", ainda que 85% da produção mundial sejam do tipo "desi", por ser este o cultivado na Índia (GUERRERO, 1999).

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) também conhecido como "Garbanzo" nos países de língua espanhola, "Chikpea" em países de língua inglesa é originário da região hoje compreendida entre o Sudeste da Turquia, e o norte da Síria, de onde foi levado para o subcontinente Indiano e a Europa. Foi introduzido no Brasil por imigrantes espanhóis e procedentes do Oriente Médio (NASCIMENTO et al., 1998). É uma leguminosa típica das regiões de clima temperado, demonstrando adaptação ao clima tropical de temperaturas moderadas. Em muitos países tropicais, a cultura do grão-de-bico é explorada com êxito no período do inverno (MONICI, 2004).

O grão-de-bico é uma das mais importantes leguminosas cultivadas no mundo e tem papel importante na alimentação de milhões de pessoas (WESCHE–EBELING *et al.* 2001). O grão contém: 16,4-31,2% de proteína crua, 38,1-73,3% de carboidrato, 1,5-6,8% de gordura e 1,6-9,0% de fibras de acordo com SEHIRALE (1988) segundo YÜCEL (2010).

Atualmente o grão-de-bico é cultivado em mais de 33 países do Sul e Oeste da Ásia, Norte e Leste da África, Sul da Europa, América e Austrália (SINGH; SAXENA, 1996; SINGH *et al.*, 2008).

Distinguem-se quatro áreas principais de produção: Sul e Oeste da Ásia, Austrália, África Oriental e México, representando 84,0; 4,5; 4,0 e 1,7% da produção mundial, respectivamente, enquanto a produção europeia representa apenas 0,7% da produção mundial (FERNÁNDEZ, 2011).

Segundo FAOSTAT 2014, o grão-de-bico se encontra entre as cinco leguminosas mais cultivadas do mundo, como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1- Produção mundial em toneladas (t) das principais espécies leguminosas cultivadas no mundo (FAOSTAT, 2012).**

<b>ESPÉCIE</b>	<b>PRODUÇÃO (t)</b>	<b>ÁREA (ha)</b>	<b>PRODUTIVIDADE (t/ha)</b>
<b>SOJA</b>	<b>241.841.416</b>	<b>104.997.253</b>	<b>2,303</b>
<b>AMENDOIM C/ CASCA</b>	<b>41.185.933</b>	<b>24.709.458</b>	<b>1,667</b>
<b>FEIJÃO SECO</b>	<b>23.598.102</b>	<b>29.290.861</b>	<b>0,806</b>
<b>GRÃO-DE-BICO</b>	<b>11.625.545</b>	<b>12.344.291</b>	<b>0,942</b>

As baixas produtividades da cultura do grão-de-bico estão associadas às deficiências tecnológicas, como reduzido uso de fertilizantes para atender à demanda nutricional e de água, em plantios de sequeiro (ARTIAGA, 2012).

Ainda segundo a FAOSTAT (2012), a área plantada e a produção no Brasil de grão-de-bico não são estimadas. Mesmo não existindo áreas comerciais significativas de produção de grão-de-bico no país, várias tentativas foram feitas no passado.

### 3.1.1. Estádios fenológicos da cultura do grão-de-bico

Segundo manual técnico sanidade do cultivo de grão-de-bico, VEGA e GUIADO (95), as fases de desenvolvimento do grão-de-bico indicadoras para sanidade da planta estão dispostas na Tabela 2.

**Tabela 2- Escala fenológica do grão-de-bico**

FASE	ESTÁDIO	DESCRIÇÃO
Vegetativa	A	Emergência
	B	Folhas 1 <sup>árias</sup> completamente expandidas
	C	Folhas inteiramente abertas e presença de haste principal e secundárias bem definidas
	D	Aparecimento dos 1 <sup>os</sup> botões florais
	E	Abertura da primeira flor
Reprodutiva	F	Vagens recém-formadas
	G	Vagens visíveis
	H	Semente recém-formada na vagem
	I	Aparecimento das primeiras vagens cheias
	J	Grãos maduros com mudança de cor
	K	Ponto de colheita

### 3.2. *Fusarium oxysporum*- murcha de fusário

O gênero *Fusarium* tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo nos mais diversos ambientes e hospedeiros. O gênero é representado por 1414 espécies, 348 variedades e 140 *formae speciales* descritas em literatura (Index Fungorum, 2010).

É pertencente ao reino *Eumycota*, divisão *Ascomycota*, classe *Euascmycetes*, ordem *Hipocreales*, família (GODOY; COLOMBO, 2004).

*Fusarium* é um gênero fúngico cujas espécies são tipicamente patógenos de solo ou veiculados por sementes, necrotrófico, sendo responsáveis por podridão radiculares, vagens e sementes, “damping-off” e murcha vascular.

Causam a redução do desenvolvimento da planta, amarelecimento, queda de folhas e morte de plantas. Também foram relatados causando podridão de frutos em pós-colheita levando a perdas consideráveis (ABRAHÃO , 1949).

Segundo SHARMA; CERKAUSKAS (1985), a murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*, é um dos principais entraves para produção de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L), podendo causar perda de 10% da colheita anual na Índia (SINGH; DAHIYA, 1973), de 10-15% na Espanha (TRAPERO-CASAS; JIMÉNEZ-DÍAZ, 1985) de até de 40% na Tunísia (BOUSLAMA, 1980). O cultivo pode ser inteiramente devastado em condições favoráveis para o desenvolvimento da doença (HALILA; STRANGE, 1996; LANDA et al., 2004; NAVAS-CORTÉS et al., 1998).

Os sintomas causados por *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*, em plantas de grão-de-bico, incluem o amarelecimento foliar e necrose em progressão acrópeta a partir da base do caule, podendo levar a senescência prematura da planta. Pode ainda apresentar lesões necróticas adicionais observáveis na raiz principal e secundárias e, ocasionalmente, necrose cortical do colo da planta infectada (FERNÁNDEZ, 2011)

### **3.3. O antagonismo de *Trichoderma* spp.**

O termo antagonista é empregado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos. Estes são organismos ecologicamente adaptados aos mesmos tecidos das plantas que os ocupados pelos patógenos, porém, não fitopatogênicos. O termo “formas de antagonismo” refere-se aos mecanismos pelos quais agem sobre o patógeno (BETTIOL, 1991).

Os fungos anamórficos do gênero *Trichoderma* estão entre os microrganismos mais estudados como agentes de controle biológico (BETTIOL & GHINI, 1995).

O gênero *Trichoderma*, corresponde à fase imperfeita de *Hypocrea*. Pertence ao reino Fungi, filo *Ascomycota*, classe *Ascomycetes*, ordem *Hypocreales*, família *Hypocreaceae* (KIRK, 2012). Fungos do grupo *Trichoderma* apresentam ação intraespecífica com relação a atividades de biocontrole, propriedades fisiológicas e bioquímicas, espectro de ação contra hospedeiros e adaptabilidade ecológica e ambiental (SILVA, 2000).

O sucesso no uso de espécies de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos reside em sua alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobreviver em condições desfavoráveis, eficiência na mobilização de nutrientes disponibilizando-os para as plantas, capacidade de modificar a rizosfera (acidificação pela produção de ácidos orgânicos), agressividade contra fungos fitopatogênicos, eficiência como promotores de crescimento em plantas e na estimulação de seus mecanismos de defesa (HARMAN, 2000; YEDIDIA *et al.*, 2001; BENÍTEZ *et al.*, 2004).

Antagonistas do gênero *Trichoderma* utilizam basicamente quatro mecanismos de ação no controle de fitopatógenos: micoparasitismo, antibiose, competição por nutrientes e indução de mecanismos de defesa, além de exercerem efeito positivo no crescimento de plantas (HARMAN, 2000).

A promoção de crescimento por *Trichoderma* decorre da colonização rizosférica (rizocompetência) e produção de substâncias estimuladoras do crescimento vegetal (MATHIVANAN *et al.*, 2005), bem como da solubilização de nutrientes presentes nas proximidades das raízes, tornando-os assimiláveis (HARMAN, 2000). Os benefícios às plantas, proporcionados por esses fungos pela colonização rizosférica fazem da rizocompetência uma das características buscadas durante a seleção de potenciais agentes no controle biológico de doenças (HARMAN *et al.*, 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

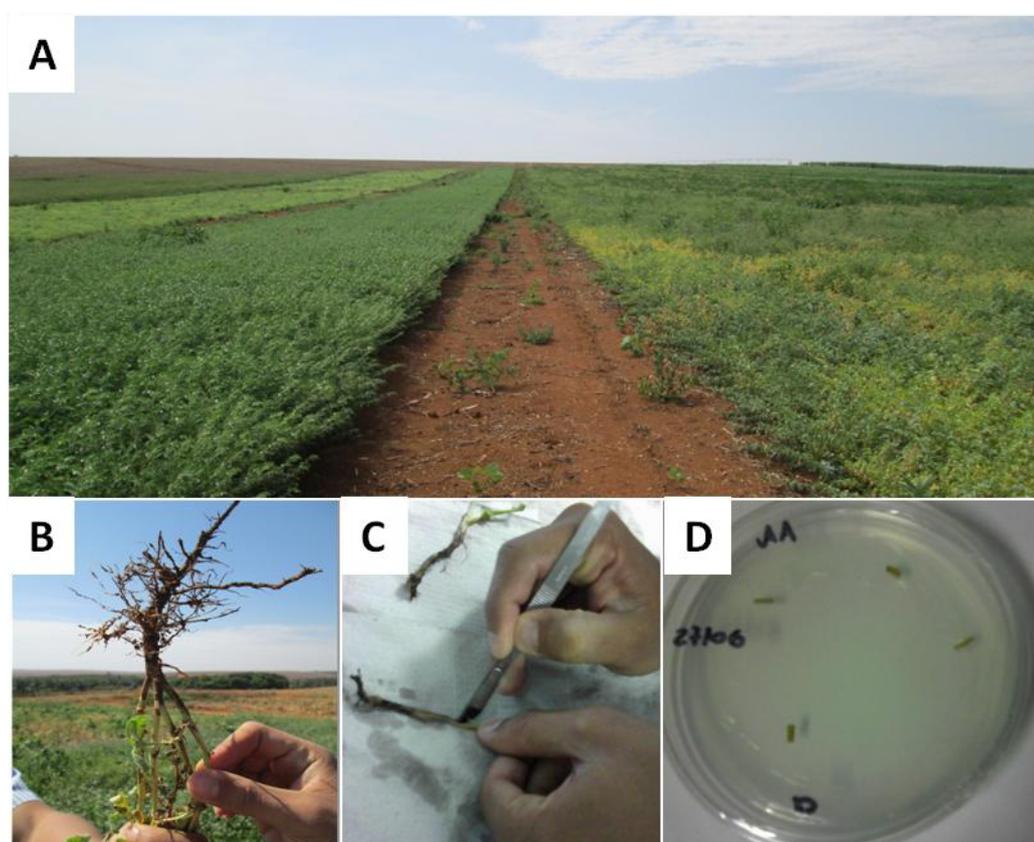
### 4.1. Coleta de plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e isolamento de culturas de *Fusarium* sp.

Foram realizadas coletas de amostras vegetais em duas safras consecutivas (28/08/2012 e 15/08/2013), sobre área de pivô, na fazenda Rio Preto, localizada na Rodovia BR. 251 Km 13 Cristalina-GO, em dois estádios de desenvolvimento da cultura de grão-de-bico (estádio J e estádio I). As amostras constituíram-se de plantas inteiras, incluindo as raízes, de vários talhões e de quatro genótipos de grão-de-bico (JAMU, Cícero, Flip 03, Flip 02), (Figura 1A). As coletas foram aleatorias, porém, preferindo-se as que apresentavam sintomas de amarelecimento foliar e necrose no colmo e caule das plantas, (Figura 1B). As amostras foram embaladas em sacos plásticos, identificadas e mantidas em câmara fria durante três dias à temperatura 8°C em ausência de luz no laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da UnB.

Para o isolamento dos patógenos procedeu-se o método indireto, isto é, isolamento de fungos dos tecidos de órgãos lenhosos ou carnosos, segundo descrito no livro Métodos em Fitopatologia (ALFENAS; MAFIA, 2007). Descartou-se a parte superior da planta. Caule e raízes foram lavados em água corrente por aproximadamente oito horas, para retirar as sujidades e possíveis patógenos da superfície dos tecidos. Procedendo-se posteriormente para evitar a incidência de contaminantes superficiais e atingir a as camadas de células mais profundas, a remoção dos tecidos expostos. Os fragmentos tissulares mais internos (Figura 1C), retirados das margens da lesão, fora transferidos para placas de Petri contendo Ágar-Água (AA), (Figura 1D). As placas foram incubadas em câmara de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por quatro dias. Depois, em uma câmara de fluxo laminar, com o auxílio de uma

lupa, foram identificadas hifas de fungos, repicadas para placas contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

A identificação morfológica do patógeno foi realizada pelo Laboratório de Epidemiologia Botânica da UnB, por características culturais e morfológicas. O isolado utilizado neste trabalho foi identificado com *Fusarium oxysporum*.



**Figura 1-** Talhões da Fazenda Rio Preto com quatro genótipos de grão-de-bico (A), amostra de planta coletada com enegrecimento no colmo (B), remoção de tecido (C) e placa com meio Ágar-Água com partes do material coletado (D).

#### 4.2. Isolados de *Trichoderma* spp

Os 26 isolados de *Trichoderma* utilizados neste trabalho (Tabela 3), pertencem à Coleção de Microrganismos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

Utilizou-se como critério de seleção dos isolados, a procedência, preferindo-se aqueles obtidos de áreas cultivadas com leguminosas e/ou área de Cerrado. As culturas foram reativadas em meio BDA.

**Tabela 3 – Lista de isolados de *Trichoderma* sp., utilizados este trabalho.**

<b>Nº</b>	<b>ISOLADO</b>	<b>ORIGEM</b>
1	CEN 139	Cultivo de soja (GO)
2	CEN 140	Cultivo de soja (GO)
3	CEN 142	Solo do Cerrado (GO)
4	CEN 143	Solo do Cerrado (GO)
5	CEN 162	Cultivo de arroz (DF)
6	CEN 400	Produto comercial (RS)
7	CEN 405	Produto comercial (RS)
8	CEN 423	Solo do Cerrado (DF)
9	CEN 435	Solo do Cerrado (GO)
10	CEN 436	Solo do Cerrado (GO)
11	CEN 437	Solo do Cerrado (GO)
12	CEN 439	Solo do Cerrado (GO)
13	CEN 440	Solo do Cerrado (GO)
14	CEN 441	Solo do Cerrado (GO)
15	CEN 445	Solo do Cerrado (GO)
16	CEN 446	Solo do Cerrado (GO)
17	CEN 492	Produto comercial (DF)
18	CEN 514	Solo de Pomar de Goiabeira (PE)
19	CEN 515	Solo de Cerrado (GO)
20	CEN 550	Solo não informado (BA))
21	CEN 566	Cultivo de Batata (BA)
22	CEN 595	Solo não informado (BA)
23	CEN 597	Cultivo de feijão (BA)

24	CEN 647	Solo de cobertura verde (GO)
25	CEN 677	Solo de morangueiro (DF)
26	CEN 928	Solo não informado (SP)

Os testes descritos a seguir foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do prédio do Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

#### **4.3. Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. ao *F. oxysporum* em cultura pareada**

O potencial de antagonismo dos isolados de *Trichoderma* (Tabela 3), contra *F. oxysporum* foi avaliado através da técnica de pareamento de cultura (DENNIS; WEBSTER, 1971a). Realizou-se o pré-estabelecimento do patógeno *F. oxysporum*, repicado 72 h antes dos antagonistas. Discos (5mm de diâmetro) retirados de culturas do patógeno e dos antagonistas foram posicionados diametralmente opostos, a uma distância de aproximadamente 1,0 cm da borda, em placas contendo BDA solidificado. Como testemunha, foram preparadas placas com BDA, contendo apenas disco do patógeno e diametralmente oposto foi colocado um disco só contendo BDA. A incubação ocorreu em câmaras B.O.D. a 25 °C com fotoperíodo de 12h.

A avaliação da inibição do crescimento de *F. oxysporum* foi realizada quando o crescimento do micélio do patógeno contido na testemunha atingiu toda a placa. Os isolados foram classificados quanto ao antagonismo segundo a escala notas de BELL *et al.*(1982), Figura 2:

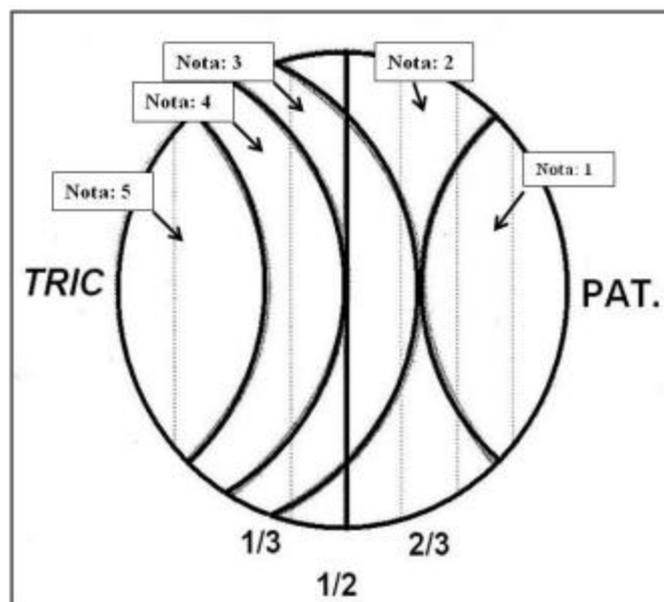
1: Sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou toda a superfície do meio e reduziu a colônia do patógeno.

2: Sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou pelo menos 2/3 da superfície do meio.

3: *Trichoderma* e Patógeno colonizaram mais que 1/3 e menos que 2/3 da superfície do meio.

4: Patógeno colonizou pelo menos 2/3 da superfície do meio e resistiu a invasão por *Trichoderma*.

5: Sobreposição do patógeno que colonizou toda a superfície do meio.



**Figura 2: Representação da escala de notas proposta por BELL *et al.* (1982).**

Para cada isolado do antagonista foram realizadas três repetições, e o experimento foi realizado duas vezes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

#### **4.4. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium oxysporum***

O efeito inibidor de metabólitos voláteis dos isolados de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum* foi verificado conforme descrito por DENNIS; WEBSTER (1971b). Neste experimento utilizaram-se 14 isolados (CEN140, CEN143, CEN405, CEN423, CEN435, CEN437, CEN439, CEN440, CEN441, CEN445, CEN446, CEN515, CEN595 e CEN597), selecionados previamente com base no desempenho observado no pareamento de culturas.

Depois de três dias de crescimento de *F. oxysporum* em BDA a 25°C e fotoperíodo de 12 h, bases de outras placas de Petri de tamanho correspondente, contendo meio BDA, receberam centralmente um disco de ágar contendo micélio do antagonista. As bases das placas contendo o antagonista recém colocado e o patógeno (com três dias de crescimento) foram sobrepostas e unidas com filme plástico transparente. As placas foram mantidas nas mesmas condições mencionadas, de forma que as bases superiores fossem aquelas que continham o patógeno. Após 14 dias quando a colônia testemunha (base correspondente ao antagonista contendo apenas BDA), encontrava-se totalmente colonizada, mediu-se o diâmetro das colônias de *F. oxysporum*. Os valores relativos ao crescimento das colônias foram comparados ao da testemunha. Considerou-se como 100% de crescimento a área final ocupada pela testemunha menos a área inicial (patógeno com três dias de crescimento), conforme Carvalho (2011).

No teste de metabólitos não voláteis também foram utilizados os 14 isolados de *Trichoderma*. Filtrados das culturas do antagonista foram incorporados ao meio, conforme descrito por Mello *et al.* (2007).

Três Discos (5 mm), de ágar contendo micélio de *Trichoderma*, foram transferidos para frascos Erlenmeyer (500mL), com 250 mL de meio batata-dextrose (BD). Após cinco dias de cultivo em agitador orbital (Lab. line Instruments, Inc., modelo 60160) a 250 rpm e temperatura 25°C, em ausência de luz, as culturas foram filtradas, com auxílio de bomba a vácuo. Cada isolado foi filtrado em papel filtro duas vezes e centrifugadas por 12 minutos a 8000 rpm. A

fase líquida foi esterilizada em membrana estéril (filtro Millipore 0,45µm). Para cada isolado do antagonista utilizaram-se 5 mililitros do filtrado, acrescido a 15 mL de meio BDA fundente, preparado com ágar a 25% , em placa de Petri. A testemunha consistiu de placas acrescidas de 5 mL de água estéril ao BDA fundente. Depois da solidificação do meio, as placas receberam em seu centro um disco (5mm) de BDA com micélio do patógeno. As placas foram incubadas em câmara B.O.D. a 25 °C com fotoperíodo de 12h, até a completa colonização do meio pelo patógeno nas placas testemunhas. Tomaram-se, então as medidas de diâmetro das colônias, comparando-se o crescimento com o da testemunha.

Os experimentos com metabólitos voláteis e não voláteis foram realizados duas vezes, com distribuição espacial inteiramente aleatória, com quarto repetições para cada isolado de *Trichoderma*.

#### **4.5. Multiplicação de *Trichoderma* spp. para teste *in vivo***

Foram preparadas suspensões de conídios, para aplicação de suspensão no teste de promoção de crescimento. Discos de meio BDA contendo micélio dos antagonistas, pré-selecionados, foram transferidos para Erlenmeyer (250mL), contendo arroz parboilizado (15 g/frasco) previamente umedecido (60% p v<sup>-1</sup>) e autoclavado. Os frascos foram mantidos em câmara de germinação a 25°C e fotoperíodo de 12h durante quatro dias. Em seguida, adicionou-se água destilada aos frascos, para recolher os esporos, por meio de filtração em gaze esterilizada. A concentração de conídios foi ajustada 10<sup>8</sup> conídios/mL.

#### **4.6. Multiplicação do Patógeno**

No preparo de inóculos para aplicação no teste de promoção de crescimento, o patógeno foi cultivado em arroz.

Dez discos (5mm) de meio BDA contendo micélio do patógeno foram transferidos para sacos plásticos autoclaváveis contendo arroz parboilizado (100 g/saco) previamente umedecidos ( $60\% \text{ p v}^{-1}$ ) e autoclavado. Os sacos plásticos contendo as culturas foram mantidos em câmara de germinação a 25°C e fotoperíodo de 12h durante 15 dias. Nesse período foram realizados revolvimentos suaves do substrato de forma que propiciasse um desenvolvimento homogêneo do micélio do patógeno.

#### **4.7. Efeito de *Trichoderma* spp. na supressão de doença e promoção de crescimento em casa de vegetação**

Os ensaios conduzidos para verificar a ação de *Trichoderma* spp. contra *F. oxysporum*, *in vivo*, foram realizados com as sementes de grão-de-bico do grupo Kabuli, cultivar ‘BRS Cícero’ (CNPH 91-008), em casa de vegetação monitorada quanto às condições de temperatura e umidade. Utilizaram-se quatro isolados do agente de biocontrole (CEN423, CEN435, CEN440 e CEN445).

Os testes foram realizados em vasos plásticos de 500 mL de capacidade. Um dia antes do estabelecimento do experimento procedeu-se a inoculação do patógeno nos vasos preenchidos com solo autoclavado, até 2/3 da capacidade (aproximadamente 300 mL). A quantidade de inóculo foi estabelecida de acordo com Carvalho Filho (2013), em 5g de massa de arroz colonizado pelo patógeno/vaso. Espalhou-se o inóculo sobre o solo uniformemente, acrescentando-se, então, o restante do solo até completar a capacidade do vaso.

No dia seguinte, semeou-se grão-de-bico, (5 sementes/vaso) e verteram-se, 10 mL de suspensão de inóculo ( $10^8$  conídios/mL) do antagonista.

O experimento foi conduzido com delineamento em blocos ao acaso com cinco repetições. O percentual de emergência foi verificado aos dezessete dias após a semeadura (DAS), estimando-se o número de plântulas emergidas por vaso. Também foram avaliados o comprimento e o peso seco das raízes e da parte aérea, de todas as plantas emergidas. Para obtenção do peso seco das raízes,

colocaram-se as amostras na estufa em uma temperatura de 60°C por 48 horas. Após a secagem as amostras foram pesadas em balança de precisão e seus valores anotados. Como controle, empregaram-se sementes não tratadas, sem aplicação de *Trichoderma* spp em vasos contendo somente o patógeno e em vasos sem patógeno.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* em cultivo pareado

No teste de antagonismo de *Trichoderma* spp contra o *Fusarium oxysporum*, observou-se redução no crescimento micelial do patógeno (Tabela 3).

Dentre os 26 isolados testados, 14 apresentaram notas 1 e 2 de antagonismo (Tabela 4). Destes, 9 isolados (CEN140, CEN143, CEN423, CEN435, CEN437, CEN439, CEN440, CEN445 e CEN515) apresentaram nota máxima (nota 1) de antagonismo e 5 isolados (CEN405, CEN441, CEN 446, CEN595 e CEN597) receberam nota 2 da escala de Bell *et al.*(1982), Figura 3. Nestes casos, observou-se sobreposição do *Trichoderma* que colonizou a superfície do meio, reduzindo o crescimento do patógeno inteiramente ou em pelo menos 2/3 da superfície. Esses 14 isolados devido ao seu desempenho no teste de cultura pareada foram pré-selecionados para realizar os testes de metabólitos voláteis e não voláteis.

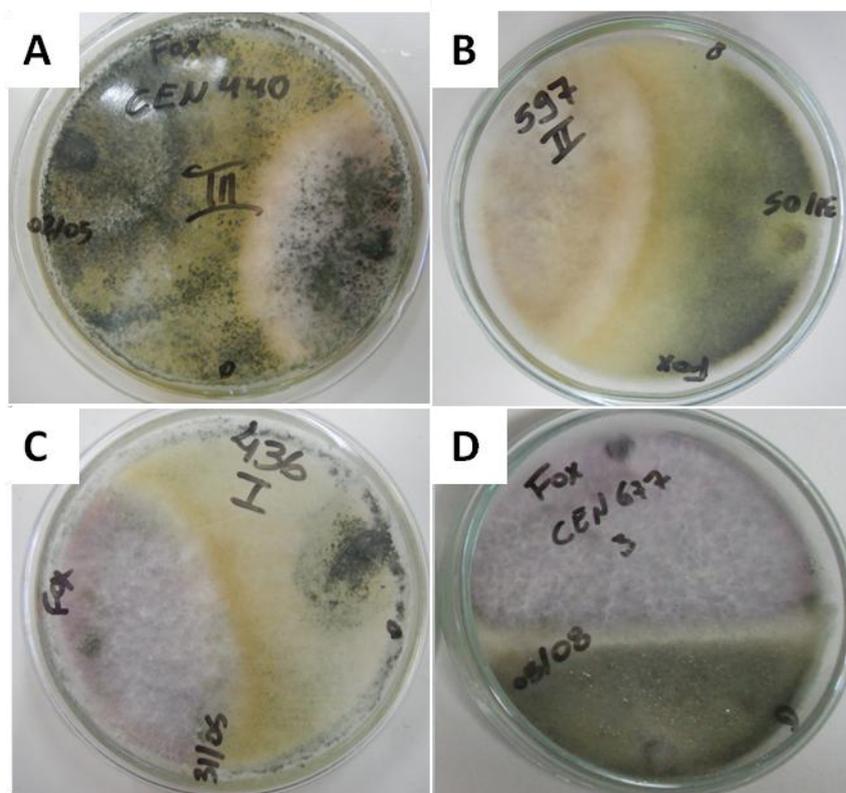
Mais de metade (54%) dos isolados de *Trichoderma* da coleção de microrganismos para controle biológico da Embrapa apresentaram alto antagonismo ao *F. oxysporum* patogênico no teste de pareamento de cultura.

Provavelmente o elevado grau de antagonismo de *Trichoderma*, deve-se a seleção de isolados originados em ambientes semelhantes (Cerrado ou de área de plantio de leguminosas), ao da cultura do grão-de-bico. Segundo Isaias *et al.*, 2014, isolados de fitopatógenos e de *Trichoderma* de ambientes com o mesmo tipo ou com culturas semelhantes, mostram uma maior interação antagônica entre microrganismos.

**Tabela 4 - Inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* por isolados de *Trichoderma* spp. em cultivo pareado.**

Escala (notas) de Bell et al. ( 1982)	n	% de isolados	Isolado
1	9	34,6	140, 143, 423, 435, 437, 439, 440, 445, 515.
2	5	19,2	405, 441, 446, 595, 597.
3	8	30,8	142, 162, 400, 436, 492, 514, 550, 566.
4	4	15,4	139, 647, 677, 928.
5	-	-	-

\*n: Número de isolados para cada nota.



**Figura 3 - Classificação dos isolados de *Trichoderma* quanto ao antagonismo exercido sobre o *Fusarium oxysporum*: (A) CEN440 –nota 1; (B) CEN597 – nota 2; (C) CEN436 - nota 3 e (D) CEN647 – nota 4.**

A redução de crescimento de *F. oxysporum* em cultivo pareado pode ser atribuída à competição por espaço e por nutrientes presentes no meio de cultura (VINALE *et al.*, 2008). Porém os principais mecanismos de biocontrole relacionados aos fungos do gênero *Trichoderma* quanto ao confronto direto com fungos fitopatogênicos, são o micoparasitismo (HOWELL, 2003) e a antibiose (MOHAMED & HAGGAG, 2006).

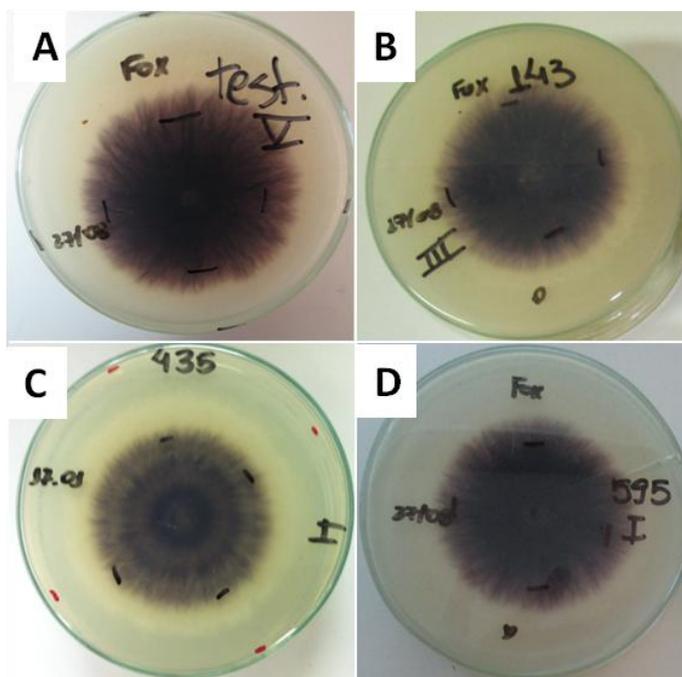
### 5.2. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum*

Quanto à produção de metabólitos voláteis (Figura 4), não houve diferença estatística significativa entre os 14 isolados de *Trichoderma* sp. (Tabela 5).

**Tabela 5 - Efeito inibidor no crescimento de colônias de *Fusarium oxysporum* exercido por metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp.**

Isolado de <i>Trichoderma</i> spp.	Crescimento de colônias de <i>F. oxysporum</i> . (%) <sup>(1)</sup>
CEN140	82,88 a
CEN423	90,16 a
CEN405	93,55 a
CEN439	96,00 a
CEN515	96,81 a
CEN435	97,53 a
CEN441	98,31 a
CEN143	100,00 a
CEN437	100,00 a
CEN440	100,00 a
CEN445	100,00 a
CEN446	100,00 a
CEN595	100,00 a
CEN597	100,00 a
TESTEMUNHA <sup>(2)</sup>	100,00 a

<sup>(1)</sup> Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferiram estatisticamente, segundo o teste de Kruskal-Wallis (P=0,09). <sup>(2)</sup>Valores relativos a Testemunha, obtidos de colônias com 14 dias de crescimento.

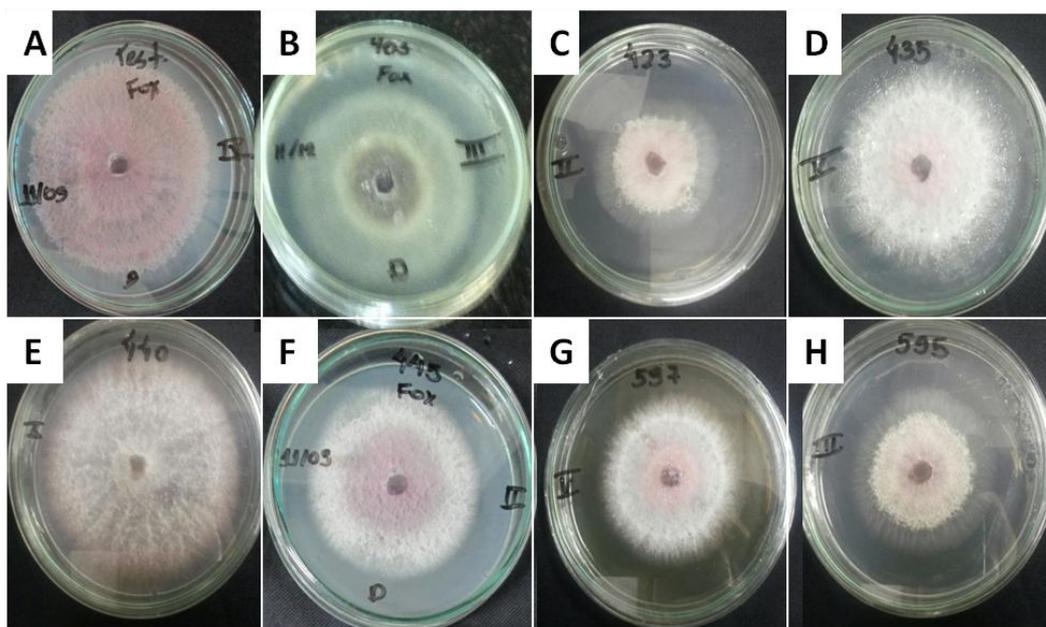


**Figura 4 - Cultura do patógeno *F. oxysporum* sobre efeito dos metabólitos voláteis: (A) Testemunha; (B) Sobre efeito do CEN143; (C) sobre efeito do CEN435 e (D) sobre efeito do CEN595.**

Em relação à produção de metabólitos não voláteis, os isolados CEN435, CEN440, CEN 445, CEN 423, CEN 405, CEN 597 e CEN 595, (Figura 5), foram capazes de causar inibição de crescimento significativa em relação à testemunha de *F. oxysporum* 33,36; 35,02; 36,87; 38,04; 44,62; 52,93 e 53,08%, respectivamente, (Tabela 6).

Provavelmente houve ação por metabólitos tóxicos biologicamente difusíveis no meio de cultivo que recebeu filtrado de colônia deste isolado. De fato, a capacidade para produzir metabólitos tóxicos com efeito fungicida ou fungistático pode variar entre isolados da mesma espécie (MARTINS-CORDER e MELO, 1998).

Segundo Dennis; Webster (1971a), a alta produção de antibióticos não voláteis não está correlacionada à alta produção de inibidores voláteis.



**Figura 5 - Cultura do patógeno *F. oxysporum* sob efeito dos metabólitos não voláteis: (A) Testemunha; (B) CEN405, (C) CEN423; (D) CEN435; (E) CEN440; (F) CEN445; (G) CEN597 e (H) CEN595.**

**Tabela 6 – Ação inibidora no crescimento de colônias de *Fusarium oxysporum* exercido, por metabólitos não voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.**

Isolado.	Crescimento de colônias de <i>F. oxysporum</i> (%) <sup>(1)</sup>
CEN595	46,92 a
CEN597	47,07 a
CEN405	55,38 a
CEN423	61,96 a
CEN445	63,13 a
CEN440	64,98 a
CEN435	66,64 a
CEN437	85,63 b
CEN441	88,27 b
CEN143	88,52 b
CEN140	92,36 b

CEN446	93,84 b
CEN439	94,63 b
CEN515	99,18 b
TESTEMUNHA	100 b

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Kruskal-Wallis ( $P \leq 0,001$ ), para os ensaios com metabólitos não voláteis.

<sup>(2)</sup>Valores relativos a Testemunha, obtidos de colônias com 9 dias de crescimento, para os ensaios com metabólitos não voláteis .

### 5.3. Supressão de doença e promoção de crescimento do grão-de-bico em casa de vegetação

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados apresentaram efeito potencial antagônico positivo na emergência e promoção de crescimento.

Segundo a Tabela 7, o isolado CEN423 (-) apresentou o melhor valor médio de comprimento da parte aérea (12,63 cm). Todos os outros isolados dos antagonistas foram similares para todos os tratamentos e apresentaram valores entre 10,88 e 9,72 cm, entretanto diferindo da testemunha *Fusarium* (8,13 cm).

Os isolados CEN423, CEN435 e CEN440, submetidos ao tratamento com apenas a inoculação dos antagonistas [*Fusarium* (-)], apresentaram os melhores resultados no que se refere aos comprimentos médios das raízes (17,47; 17,44 e 18,11 cm, respectivamente). Esses três tratamentos foram superiores às testemunhas absoluta e *Fusarium* (15,43 e 15,73 cm, respectivamente) e demais isolados de *Trichoderma* (Tabela 7).

**Tabela 7 - Comprimento médio (cm), da parte aérea, de raiz de plantas de grão-de-bico "Cícero" (aos 17 DAS) cultivado em casa de vegetação, ratados com *Trichoderma* e valores de desvio padrão (DP) correspondentes.**

Tratamentos	<i>Fusarium</i>	Parte aérea		Raiz	
		Média	DP.	Média	DP
CEN 423	+	10,47	1,57	15,17	5,26
CEN 423	-	12,63	0,91	17,47	1,81

<b>CEN 435</b>	<b>+</b>	<b>11,87</b>	<b>1,25</b>	<b>16,97</b>	<b>2,37</b>
<b>CEN 435</b>	<b>-</b>	<b>10,68</b>	<b>0,67</b>	<b>17,44</b>	<b>4,75</b>
<b>CEN 440</b>	<b>+</b>	<b>10,88</b>	<b>2,55</b>	<b>15,00</b>	<b>5,67</b>
<b>CEN 440</b>	<b>-</b>	<b>10,21</b>	<b>1,34</b>	<b>18,11</b>	<b>6,59</b>
<b>CEN 445</b>	<b>+</b>	<b>9,72</b>	<b>2,28</b>	<b>15,07</b>	<b>3,96</b>
<b>CEN 445</b>	<b>-</b>	<b>10,38</b>	<b>1,96</b>	<b>13,82</b>	<b>5,37</b>
<b>TEST. Absoluta</b>	<b>-</b>	<b>10,73</b>	<b>2,37</b>	<b>15,43</b>	<b>3,24</b>
<b>TEST. <i>Fusarium</i></b>	<b>+</b>	<b>8,13</b>	<b>5,02</b>	<b>15,73</b>	<b>9,78</b>

\*Onde **Fusarium (+)** significa a presença do inóculo do patógeno *F. oxysporum* neste tratamento e **Fusarium (-)** a ausência.

Isolados de *Trichoderma* spp. vem sendo amplamente testados quanto ao potencial de promoção de crescimento de várias culturas. São diversos os mecanismos de estímulo ao crescimento das plantas por *Trichoderma* spp. (HARMAN, 2011), entre os quais, cita-se a produção de metabólitos com atividades análogas a fitohormônios, como o ácido indolacético (AIA), CUTLER *et al.*, (1989).

Quanto ao peso seco  $g^{-1}$  (Tabela 8), ocorreu um padrão semelhante ao teste de comprimento de planta, onde o isolado CEN423 (-) apresentou o melhor valor médio de peso da parte aérea (0,21 g), e todos os outros isolados dos antagonistas foram similares para todos os tratamentos e apresentaram valores entre 0,17 e 0,13 g, entretanto, diferindo da testemunha *Fusarium* (0,10 g).

Quanto ao peso seco  $g^{-1}$  das raízes (Tabela 8) os tratamentos com exceção do CEN 445 (+), apresentaram valores médios semelhantes variando de 0,9 a 0,11 g, diferindo da testemunha *Fusarium* (0,6 g).

**Tabela 8 - Peso seco (g), da parte aérea e de raiz de plantas de grão-de-bico “Cícero” (aos 17 DAS) cultivado em casa de vegetação, tratadas com *Trichoderma*, e valores de desvio padrão (DP) correspondentes.**

Tratamentos	<i>Fusarium</i>	Parte aérea		Raiz	
		Média	DP.	Média	DP
CEN 423	+	0,13	0,03	0,09	0,03
CEN 423	-	0,21	0,06	0,10	0,01
CEN 435	+	0,17	0,05	0,11	0,01
CEN 435	-	0,17	0,05	0,08	0,02

CEN 440	+	0,14	0,06	0,10	0,06
CEN 440	-	0,17	0,05	0,09	0,02
CEN 445	+	0,13	0,06	0,07	0,03
CEN 445	-	0,14	0,03	0,09	0,03
TEST. Absoluta	-	0,13	0,05	0,07	0,03
TEST. <i>Fusarium</i>	+	0,10	0,08	0,06	0,04

Onde *Fusarium* (+) mais significa a presença do inoculo do patógeno *F. oxysporum* neste tratamento e *Fusarium* (-) a ausência.

O incremento proporcionado por isolados de *Trichoderma* pode ser avaliados em termos de aumento de biomassa, resistência ao estresse, produtividade e aumento da absorção e solubilização de nutrientes (SHOREST *et al.*, 2010)

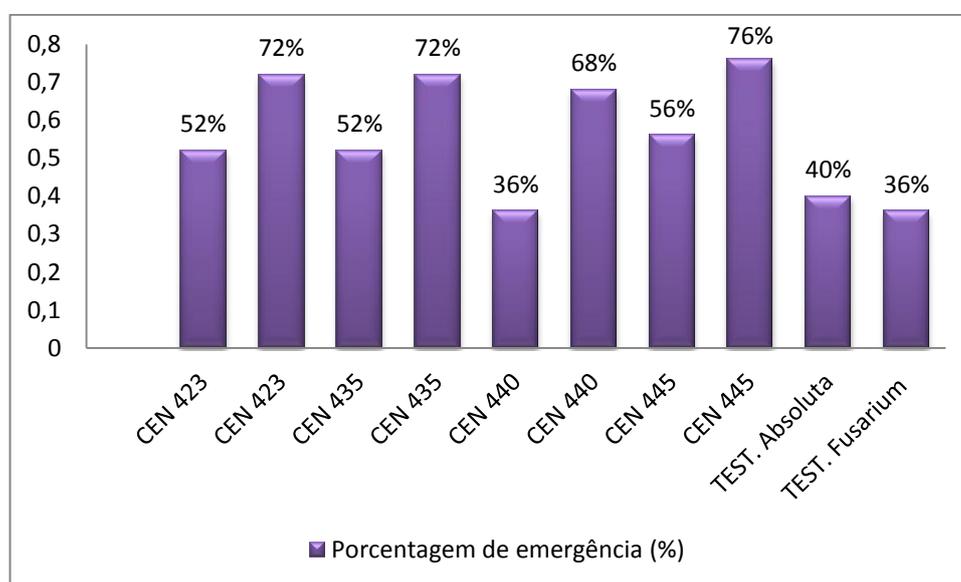
Segundo Montalvão (2012), alguns resultados obtidos por (RESENDE *et al.*, 2004) para milho revelaram maior acúmulo de matéria seca nas raízes. CARVALHO FILHO *et al.*, (2008) trabalhando com eucalipto, observaram incremento na promoção de crescimento. Os dados de pesquisa sugerem que promoção de crescimento de plantas provavelmente depende de forte interação do isolado do antagonista com a espécie vegetal.

Quanto à germinação de sementes, os tratamentos foram similares em termos de valores médios de emergência de plantas de grão-de-bico “Cícero” (Tabela 9), à exceção do isolado CEN440 (+). Este apresentou 1,8 plantas emergidas, enquanto os demais apresentaram médias de emergência variando de 2,6 à 3,8 de plantas emergidas e quando comparados às testemunhas absoluta e *Fusarium*, cujos valores médios foram 2,0 e 1,8 de plantas emergidas, respectivamente.

**Tabela 9 – Número de plantas, valores médios e porcentagem de emergência e desvio padrão (DP) de plantas de grão-de-bico “Cícero”, em casa de vegetação, aos 17 DAS.**

Tratamento	<i>Fusarium</i>	Plts Emergidas (n)					Média	DP	Emergência (%)
CEN 423	+	4	2	3	2	2	2,6	0,89	52%

<b>CEN 423</b>	-	2	3	3	5	5	3,6	1,34	72%
<b>CEN 435</b>	+	2	3	3	3	2	2,6	0,55	52%
<b>CEN 435</b>	-	3	3	4	4	4	3,6	0,55	72%
<b>CEN 440</b>	+	1	1	4	1	2	1,8	1,30	36%
<b>CEN 440</b>	-	3	2	4	3	5	3,4	1,14	68%
<b>CEN 445</b>	+	3	3	3	2	3	2,8	0,45	56%
<b>CEN 445</b>	-	4	3	3	5	4	3,8	0,84	76%
<b>TEST. Absoluta</b>	-	1	3	2	1	3	2,0	1,00	40%
<b>TEST. <i>Fusarium</i></b>	+	0	1	2	2	4	1,8	1,48	36%

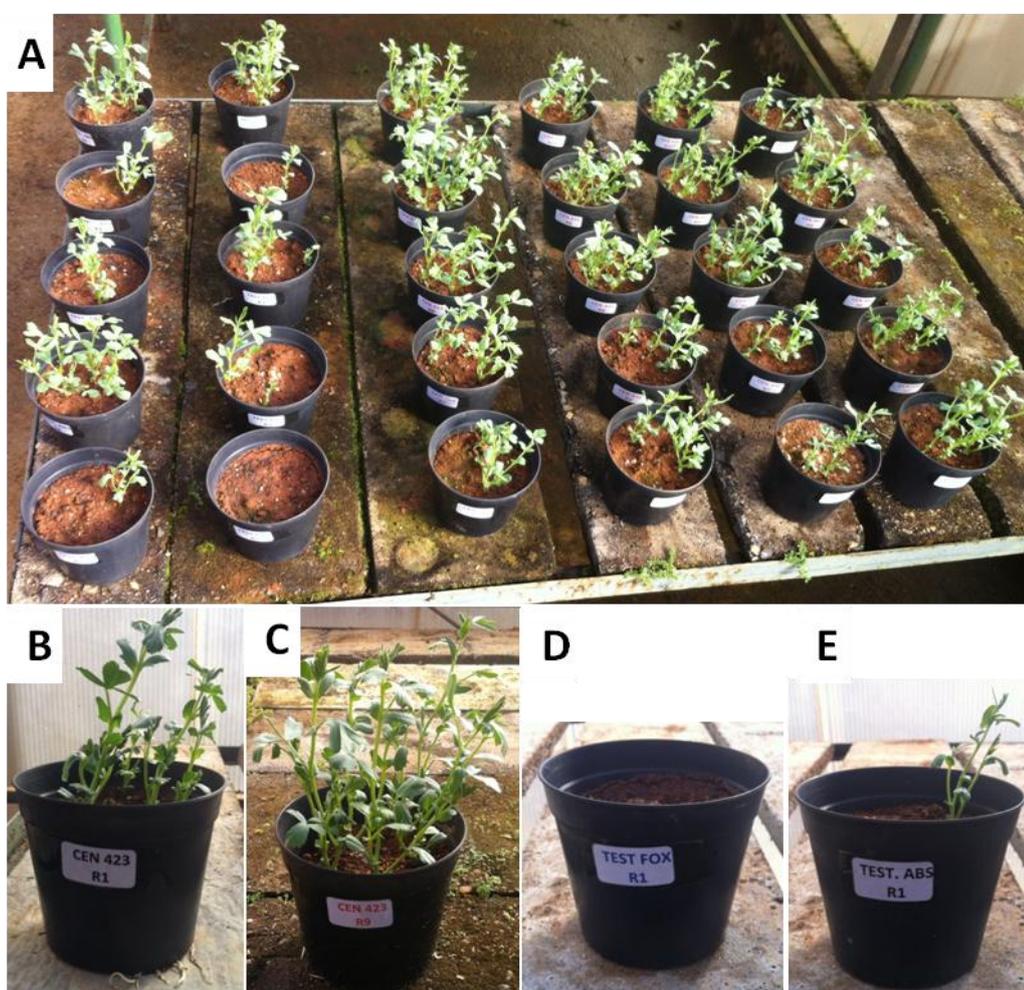


**Figura 6 - Emergência (%) de plantas de grão-de-bico "Cícero" (aos 17 DAS).**

Os tratamentos que resultaram em maior crescimento e peso seco de parte aérea apresentaram maior porcentagem de emergência (Figura 6). Efeito positivo foi verificado nos tratamentos que receberam apenas os isolados dos antagonistas (Figura 7A), em concordância com os resultados apresentados por, MERTZ *et al.* (2009). De forma semelhante maiores porcentagens de emergência de sementes após tratamentos com *Trichoderma* spp. foram garantidas quando fornecida a umidade adequada, o que possibilita a ação dos agentes biológicos que, ao

conferirem proteção às sementes contra fungos habitantes do solo, asseguraram bom estado.

Tratamento com o isolado CEN423 (-), como ilustrado na Figura 7C, foi considerado o melhor, por apresentar maior constância de valores (comprimento 12,63 e 17,47 cm; peso seco 0,21 e 0,10g de parte aérea e raiz, respectivamente e porcentagem de emergência de 72%), em comparação às testemunhas *Fusarium* (Figura 7D) e absoluta (Figura 7E).



**Figura 7- Plantas de grão-de-bico “Cícero” submetidos aos tratamentos em casa de vegetação: (A) testemunha absoluta com *Fusarium* spp e antagonistas [*Fusarium* (-)], CEN423, CEN435, CEN 440 e CEN 445, respectivamente; (B) CEN423, *Fusarium* e *Trichoderma*; (C) CEN423, com inoculação do**

**antagonista [*Fusarium* (-)]; (D) testemunha com aplicação de *Fusarium* e (E) testemunha absoluta sem aplicação de tratamentos.**

Não foram encontrados sintomas de murcha de fusário visíveis à época da avaliação da supressão de doença nas plantas de grão-de-bico, em casa de vegetação. Provavelmente, isso se deva ao estágio de desenvolvimento da cultura, no início da fase vegetativa, (Tabela 2). Segundo manual técnico de sanidade do cultivo de grão-de-bico, VEGA; GUIADO (1995), os sintomas de murcha de fusário em plantas de grão-de-bico são mais comumente encontrados em altas temperaturas e no estágio fenológico posterior à floração.

## 6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Isolados de *Trichoderma* spp. exercem atividade antagônica ao *Fusarium oxysporum in vitro* em cultivo pareado, sendo 54% deles com boa atividade antagônica.
- Os isolados testados exercem efeito antagônico quanto à ação antagônica de metabólitos voláteis, entretanto não diferiram estatisticamente da testemunha.

Os isolados CEN423, CEN435, CEN440 e CEN445, foram capazes de reduzir o crescimento micelial do patógeno em culturas pareadas e no teste de metabólitos não voláteis, em casa de vegetação promove emergência e incremento em altura de planta e em matéria seca no grão-de-bico.

- O isolado CEN423, mostra-se como o mais estável, podendo ser selecionado, para continuidade da pesquisa.
- A coleção de agentes de biocontrole da Embrapa abriga significativa representatividade de isolados de antagonista *Trichoderma* potencialmente úteis para o controle biológico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, J. Mancha escura e verrugose do amendoim. **O Biológico, São Paulo**, v.15, n.11, p.222, 1949.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. In: Ed. UFV. p.53-61, 2007.

ARTIAGA, O. P. **Avaliação de genótipos de grão de bico no cerrado do planalto central brasileiro**. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. P. 11-26, 2012.

AVANCINI, S.R.; SALES, A.M.; AGUIRRE, J.M.; MANTOVANI, D.M.B. Composição química e valor nutricional de cultivares de grão-de-bico produzidos no Estado de São Paulo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 145-53, 1992.

ÁVILA, Z. R.; CARVALHO, S. S.; BRAÚNA, L. M.; GOMES, D. M. P. A; SILVA, M. C.F.; MELLO, S. C. M. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos. 2005. (**Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa**, 177), 30 p.

BARBOSA, M.A.G.; REHN, K.G.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 98-104, 2001.

BALMAS V, SCHERM B, CARIAL R, Fiori S, ZELAZOWSKA MK., DRUZHININA I, et al. (2006) Species pattern, genetic diversity and biocontrol

potential of *Trichoderma* in Sardinia, Italy. **Proceedings of the 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium***, Vienna, Austria, 5-9

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, 7(4): 249-260, 2004.

BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. 1ª Ed., Jaguariúna: Ed. EMBRAPA/CNPDA, p.388, 1991.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed.) **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, cap.36,p.717-728, 1995.

BOUSLAMA, M. Chickpea improvement in Tunisia. Em: **Proceedings of the International Workshop on Chickpea Improvement**. ICRISAT, Hyderabad, India. pp. 277-280, 1980.

CARVALHO, D. D. C. **Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e promoção de crescimento do feijoeiro com *Trichoderma***. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia. P. 42-67, 2011.

CARVALHO FILHO, M. R.; MENÊZES, J. E., MELLO, S. C. M.; SANTOS, R. P. Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do Eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. **Boletim de**

**pesquisa e Desenvolvimento.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

CARVALHO FILHO, M. R. **Identificação e relações filogenéticas, potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro.** Tese de doutorado, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia. P. 81-97, 2013.

CELAR, F. Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. **Biological Control**, v. 28, p. 19-24, 2003.

CUTLER, H. G.; HIMMELSBACH, D. S.; ARRENDALE, R. E.; COLE, P. D.; COX, R. D.; KONINGININ, A.: A novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*. **Agricultural Biological Chemistry**, v.53, n.10, p. 2604-2611, 1989.

DENNIS, C.; WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**. V. 57, p 363-369, 1971a.

DENNIS, C.; WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. **Transactions British Mycological Society**. V. 57, p 41-48, 1971b.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L.; ITO, M. A. Tecnologia para a produção de feijão. In: DIA DE CAMPO DE FEIJÃO, 17/18, 2001/2002, Capão Bonito. **Anais Campinas** : Instituto Agrônômico, p.7-22, 2002.

FAOSTAT. (2012). **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database**. Acesso em 21 de junho de 2014, disponível em FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=en#ancor>.

FERNÁNDEZ, D. J. **Estudio de la interacción de *Fusarium* spp. con cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) asociados a la Fusariosis Vascular mediante técnicas biotecnológicas**. Tesis Doctoral en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba. P 19-20, 2011.

GATEL, F.; CHAMP, M. 1998. Grain legumes in human and animal nutrition - up to date results and question marks. En: **3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Opportunities for High Quality, Healthy and Added-Value Crops to Meet European Demands (European Association for Grain Legumes, ed.)**. 14-19 November, 1998, Valladolid. pp. 7-11.

GODOY, P.; COLOMBO, A. L. Biologia e relevância clínica das espécies do gênero *Fusarium* spp. **Prática Hospitalar**, v.11, n.34, p.136-140, 2004.

GUERRERO, A. Garbanzos. En: **Cultivos Herbáceos Extensivos. 6<sup>a</sup> edición. Mundi-Prensa**, Madrid. pp.623-638, 1999.

HALILA, M.H.; STRANGE, R.N. Identification of the casual agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* race 0. **phytopathology mediterranea**. 35:67-74, 1996.

HALL, R.; NASSER, L. C. B. Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Canadian Journal of Plant Disease** v.18, p.176-185, 1996.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions of research on *Trichoderma harzianum* t-22. **Plant Disease**, v. 84, n.4, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plants symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, p. 647-649, 2011.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, p.4-10, 2003.

HUISMAN, J. & VAN DER POEL, A. F. B. 1994. Aspects of nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed. En: **Proceedings of the Second International Food Legume Research Conference on pea, lentil, faba bean, chickpea and grasspea**. F. J. Muehlbauer y W. J. Kaiser, eds. Cairo, Egipto, 12-16 April 1992. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. pp. 53-76.

INDEX FUNGORUM disponível em: [HTTP://www.indexfungorum.org/names/names.asp](http://www.indexfungorum.org/names/names.asp). Acesso em: 20/06/2014.

ISAIAS, C.O.; MARTINS, I.; SILVA, J.B.T.; SILVA, J.P.; MELLO, S.C.M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n.1, p.34-41, 2014.

KIRK, P. **Index Fungorum**. CABI Bioscience, CBS and Landcare Research, available online, ed. 2012. Disponível em [www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org), acesso em: 24/06/2014.

LANDA, B. B., NAVAS-CORTÉS, J. A. e JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. **Phytopathology**, v. 94, p.946-960, 2004.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, p. 01-07, 1998.

MATHIVANAN, M. N.; PRABAVATHY, V. R.; VIJAYANANDRAJ, V. R. Application of talc formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. Ex S.F. Gray decrease the sheath blight disease and enhance the plant growth and yield in rice. **Journal of Phytopathology**, v. 153, p.697-701, 2005.

MELO; I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, v. 1, p. 17-67, 1998.

MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; BRAÚNA, L. M.; PÁDUA, R. R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v. 11, n.1, p.3-9, 2007.

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 13-18, 2009.

MOHAMED, H. A. L. A.; HAGGAG, W. M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 181-191, 2006.

MOLINA, J. P. **Fracionamento da proteína e estudo termoanalítico das leguminosas: grão de bico (*Cicer arietinum*), variedade Cícero e tremçoço**

**branco ( *Lupinus albus* L.).** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, p. 19-23, 2010.

MONICI, K. S. Q. **Efeito bifidogênico de dietas com ervilha (*Pisum sativum*, L.), feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), grão-de-bico (*Cicer arietinum*, L.) e lentilha (*Lens culinaris*, Med.) sobre o perfil lipídico e sobre a microbiota intestinal de ratos machos.** Campinas, SP, 2004. 120 p. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

MONTALVÃO, S. C. L. **Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do tomateiro.** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia. p. 73-88, 2012.

NASCIMENTO, W.M.; PESSOA, H.B.S.V.; GIORDANO, L.B. **Cultivo do grão-de-bico (*Cicer arietinum*, L.).** Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1998. 14p.

NAVAS-CORTÉS, J. A., HAU, B. e JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Effect of sowing date, host cultivar, and race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of *Fusarium* wilt of chickpea. **Phytopathology**, v. 88, p.1338-1346, 1998

REDDEN, R. J.; CHEN, W.; SHARMA, B. (Ed.). **Chickpea Breeding and Management.** Pondicherry, Índia: CABI, 2007. p.1-13.

RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M., VON PINHO, R. G.; VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agroecologia**, v. 28, p. 793-798, 2004.

SAMUELS, G.J.; CHAVERRI, P.; FARR, D.F.; MCCRAY, E.B. **Trichoderma Online**, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory. ARS, USDA. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em 13 jun. 2014.

SAXENA, M.C.. Problems and potential of chickpea production in the nineties. En: Chickpea in the Nineties: **Proceedings of the Second International Workshop on Chickpea Improvement**. ICRISAT ed., ICRISAT, Patancheru, India. pp. 13-27, 1990.

SHARMA, H.C.; CERKAUSKAS, R.F. Interação entre *Meloidogyne javanica* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* sobre grão de bico. **Nematologia Brasileira**. Brasília, v. 9, p. 113-121, 1985.

SILVA, P. R. Q. **Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes *egpf* e *tubulina***. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia. 2000.

SINGH, D.B.; DAHIYA, B.S. Breeding for wilt resistance in chickpea. En: **Symposium on Wilt Problem and Breeding for Wilt Resistance in Bengal Gram**. Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India. pp. 13-14, 1973.

SINGH, K. B.; SAXENA, M. C. **Winter Chickpea in Mediterranean-type environments**. A Technical Bull. ICARDA, Aleppo, Siria. p. 39, 1996.

SINGH, K. B.; SAXENA, M. C. **Chickpeas. The Tropical Agriculturalist Series**. CTA/Macmillan/ICARDA. London: Macmillan Education Ltd. UK, p.134, 1999.

SINGH, K. B.; VIRMANI, S. M. Modeling growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Field Crops Res.** v.46, p.41-49, 1996.

SPEHAR, C. R.; PEREIRA, E. A.; SOUSA, L. A. C. Legume improvement in acidic and less fertile soils. In: PRATAP, A. and KUMAR, J. **Biology and Breeding of Food Legumes**. Kanpur, India: CABI, 2011. p. 262-275.

TRAPERO CASAS, A.; JIMÉNEZ DÍAZ, R.M. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. **Phytopathology**, v. 75, p.1146-1151, 1985.

VAN NGUYEN, N.; KIM, Y.; Oh, K.; JUNG, W.; PARK, R. Antifungal activity of chitinases from *Trichoderma aureoviride* DY-59 and *Rhizopus microsporus* VS-9. **Current Microbiology**, v. 56, p. 28–32, 2008.

VEGA, J. M.; GUISADO, A. M. **Sanidad del cultivo del garbanzo**. Madrid: Hojas Divulgadoras del Ministerio da Agricultura, Pesca y Alimentación. v.12, p.30-34, 1995.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

WESCHE-EBELING, P.; MAITI, R. K.; CUEVAS-HERNANDEZ, and VERDE-STAR, J. Food Science and Feed Quality. In: MAITI R. and WESCHE-EBELING. (Ed.). **Advances in Chickpea Science**. Enfield: Science Publishers, Inc., 2001. p. 189-214.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v. 235, n. 2, p.235-242, 2001.

YÜCEL, D. O.; ANLARSAL, A. E. Determination of selection criteria with path coefficient analysis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**. v. 16, n.1, p.42-48, 2010.