

**DAIANA MARIA QUEIROZ AZEVEDO**

**PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp. A GRÃO-DE-BICO E  
CONTROLE BIOLÓGICO COM *Trichoderma* sp.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Cândido Alves da Costa

Montes Claros  
2015

**A994p  
2015**

**Azevedo, Daiana Maria Queiroz.**

**Patogenicidade de *Fusarium* spp. a grão-de-bico e controle biológico com *Trichoderma* sp. / Daiana Maria Queiroz Azevedo. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2015. 119 f.: il.**

**Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.**

**Orientador: Prof. Cândido Alves da Costa.**

**Banca examinadora: Demerson Arruda Sanglard, Fernando da Silva Rocha, Sérgio Avelino Mota Nobre, Costa, Cândido Alves da.**

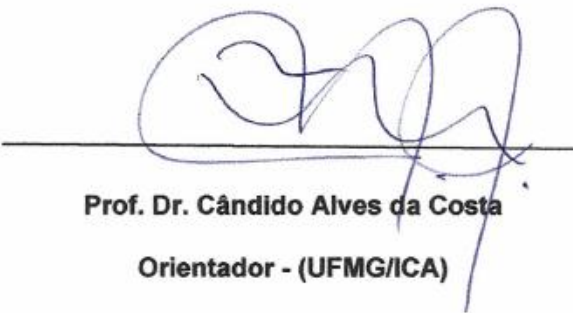
**Inclui bibliografia: f. 99-114.**

**1. Fitopatologia - *Cicer arietinum*. 2. *Fusarium oxysporum*. 3. *Fusarium solani*. I. Costa, Cândido Alves da. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.**

**CDU: 581.2**

DAIANA MARIA QUEIROZ AZEVEDO

**PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp. A GRÃO-DE-BICO E CONTROLE  
BIOLÓGICO COM *Trichoderma* sp.**



**Prof. Dr. Cândido Alves da Costa**  
**Orientador - (UFMG/ICA)**

Aprovada em 24 de fevereiro de 2015.

Montes Claros  
2015

**Dedico aos meus pais, Maria Sueli  
e Geraldo Afonso, por todo amor,  
apoio e incentivo.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a fé que me move, por encher minha vida de bênçãos, iluminar meu caminho e nunca deixar faltar força e coragem.

Aos meus pais, pelo exemplo de caráter, por serem o chão onde me apoio, pelo incentivo e o esforço na realização dos meus projetos.

Aos meus orientadores Cândido Alves da Costa e Fernando da Silva Rocha, a confiança e a paciência, por todos os ensinamentos e a amizade construída. Foi muito engrandecedor ser orientada por vocês!

Ao professor Ludwig e toda a equipe do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos da UFLA a disposição em ajudar e por contribuírem para a conclusão de importantes etapas desta pesquisa.

Aos professores Nilza de Lima Pereira Sales e Sérgio Avelino Mota Nobre, todas as oportunidades que me concederam e, por mais uma vez, contribuírem no meu crescimento pessoal e profissional.,

Ao professor Demerson a convivência, os conselhos e a colaboração.

À Dra Sarah e ao Dr. Maruzanete os conhecimentos compartilhados e a ajuda na caracterização morfológica e filogenética de *Fusarium* sp.

Ao querido Edinho a amizade, a paciência e a prestatividade.

Ao Sr. Osmar Artiaga , por nos atender gentilmente e nos permitir fazer as coletas das plantas do grão-de-bico em sua propriedade.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais a infraestrutura disponibilizada.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Fitopatologia e amigos, a ajuda impagável e por todos os bons momentos que partilhamos. Agradeço à Fernanda, à Ane, à Danadara, à Érica, à Josiane, ao Sergio, à Soliene, à Thaynara, ao Alan, à Nicolle, ao André, à Paty, à Fátima e ao Everson. Sem vocês eu não conseguiria concluir esta etapa.

Aos amigos Acleide, Gizeli, Lívia, Hugo e Fran a amizade, por me receberem com carinho em Lavras no momento que precisei.

A todos os funcionários do ICA-UFMG a prestatividade em especial Érica, Fátima, Everson, Sr. Zé e Sr. Darcy.

Aos amigos Diemesson, Ariadna, Anarely, Luciana e Matheus o companheirismo durante os anos do mestrado e por compartilhar tanto momentos felizes quanto de dificuldade.

Ao meu namorado Alesson, o carinho, o suporte, as palavras de incentivo nos momentos difíceis e por sempre torcer por mim.

À querida prima Viviane o incentivo e por sempre acreditar no meu potencial.

À tia Nem o carinho, por sempre me ajudar em tudo que eu preciso e ser minha segunda mãe.

A todos os amigos e familiares que tornaram meus dias mais felizes e contribuíram para o meu crescimento pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) a disponibilidade da bolsa CAPES demanda social.

**Muito obrigada!**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* ASSOCIADOS A GRÃO-DE-BICO

FIGURA 1-	Características morfológicas dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> obtidos de grão-de-bico.....	52
FIGURA 2-	Características morfológicas dos isolados de <i>Fusarium solani</i> obtidos de grão-de-bico.....	54
FIGURA 3-	Filograma de máxima parcimônia para o gene <i>EF-1<math>\alpha</math></i> de linhagens do complexo <i>Fusarium oxysporum</i> , incluindo isolados do grão-de-bico do Brasil.....	56
FIGURA 4-	Filograma de máxima parcimônia para o gene <i>EF-1<math>\alpha</math></i> de linhagens do complexo <i>Fusarium solani</i> , incluindo isolados do grão-de-bico do Brasil.....	58
FIGURA 5-	Sintomas causados por <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium solani</i> em plantas de grão-de-bico cv. Cícero....	60
FIGURA 6-	Sintoma de necrose radicular e vascular em plantas de grão-de-bico cv. Cícero após a sexta semana da inoculação com isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	64
FIGURA 7-	Sintoma de necrose radicular e vascular em plantas de grão-de-bico cv. Cícero após a sexta semana da inoculação com isolados de <i>Fusarium solani</i> .....	65

GRÁFICO 1- Curva de progresso de fusariose em plantas de grão-de-bico cv. Cícero em função dos isolados de isolados de *Fusarium oxysporum* (A) e *Fusarium solani* (B) avaliados..... 62

**CAPÍTULO 3 – POTENCIAL ANTAGONISTA DE *Trichoderma* sp. A *Fusarium solani* E *Fusarium oxysporum* CAUSADORES DE PODRIDÃO RADICULAR EM GRÃO-DE-BICO**

FIGURA 1- Atribuição de notas aos isolados de *Trichoderma* sp. quanto ao antagonismo exercido sobre *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*..... 86



## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* ASSOCIADOS A GRÃO-DE-BICO**

- 1- Isolados de *Fusarium* spp. obtidos de plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) de diferentes cultivares no estado de Minas Gerais e Goiás..... 43
- 2- Caracterização morfológica de isolados de *Fusarium oxysporum* e de *Fusarium solani*..... 49
- 3- Identificação molecular dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de grão-de-bico com base em sequências do gene *EF-1 $\alpha$* ..... 55
- 4- Incidência de fusariose em plantas de grão-de-bico transplantadas ou semeadas diretamente em solo infestado com diferentes isolados de *Fusarium* spp. e cultivadas após seis semanas em casa de vegetação..... 66
- 5- Médias de temperaturas (°C) máximas, mínimas e médias, umidade relativa do ar e precipitação no período dos experimentos de patogenicidade..... 68

### **CAPÍTULO 3 – POTENCIAL ANTAGONISTA DE *Trichoderma* sp. A *Fusarium solani* E *Fusarium oxysporum* CAUSADORES DE PODRIDÃO RADICULAR EM GRÃO-DE-BICO**

- 1- Isolados de *Trichoderma* sp. obtidos da rizosfera de plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) cultivadas em Cristalina-GO..... 76

2-	Inibição do crescimento micelial (ICM) de <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium solani</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> sp. em cultivo pareado e atribuição de notas, conforme Bell <i>et al.</i> (1982).....	83
3-	Inibição do crescimento micelial (ICM) de <i>Fusarium solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> por compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Trichoderma</i> sp. aos 3, 7 e 10 dias de incubação.....	87
4-	Inibição do crescimento micelial (ICM) de <i>Fusarium solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> por compostos orgânicos não voláteis produzidos por isolados de <i>Trichoderma</i> sp. aos 3, 7 e 10 dias de incubação.....	90
5-	Efeito do tratamento do solo com <i>Trichoderma</i> sp. sobre o crescimento e a massa fresca e seca de plantas de grão-de-bico cultivadas em solo infestado com <i>Fusarium solani</i> .....	94
6-	Efeito do tratamento do solo com <i>Trichoderma</i> sp. sobre o crescimento e a massa fresca e seca de plantas grão-de-bico cultivadas em solo infestado com <i>Fusarium oxysporum</i> .....	95
7-	Comprimento da parte aérea e massa fresca de raízes de plantas grão-de-bico em função da interação entre o tratamento com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> sp. e <i>Fusarium</i> spp.....	97

## APÊNDICE

- 1- Quadro resumo da análise de variância da taxa de crescimento micelial dos isolados de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*..... 114
- 2- Quadro resumo da análise de variância da inibição do crescimento micelial (ICM) de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* por isolados de *Trichoderma* sp. em cultivo pareado e atribuição de notas conforme Bell *et al.*(1982)..... 114
- 3- Quadro resumo da análise de variância da inibição do crescimento micelial (ICM) de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* por compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* sp. aos 3, 7 e 10 dias de incubação..... 115
- 4- Quadro resumo da análise de variância da inibição do crescimento micelial (ICM) de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* por compostos orgânicos não voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* sp. aos 3, 7 e 10 dias de incubação..... 116
- 5- Quadro resumo da análise de variância do efeito do tratamento do solo com *Trichoderma* sp. sobre o crescimento e a massa fresca e seca de plantas de grão-de-bico cultivadas em solo infestado com *Fusarium solani*..... 117
- 6- Quadro resumo da análise de variância do efeito do tratamento do solo com *Trichoderma* sp. sobre o crescimento e a massa fresca e seca de plantas de grão-de-bico cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum*..... 118

7- Quadro resumo da análise de variância do comprimento da parte aérea e massa fresca de raízes de plantas de grão-de-bico em função da interação entre o tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> sp. e <i>Fusarium</i> spp.....	119
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ágar Água
ADE	Água Destilada Esterilizada
BDA	Batata Dextrose Agar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CG-EM	Cromatografia Gasosa - Epectofotometria de massas
CML	Coleção Micológica de Lavras
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	Fator de alongação 1- $\alpha$
FOCs	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>
FOSC	<i>Fusarium oxysporum</i> Species Complex
FSSC	<i>Fusarium solani</i> Species Complex
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
NRRL	<i>American Research Service (ARS) culture collection</i>
SNA	<i>Synthetic Nutrient Poor Agar</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	Aspectos gerais do grão-de-bico.....	19
2.2	Doenças da cultura do grão-de-bico.....	23
2.2.1	A murcha de fusarium.....	24
2.2.2	A podridão negra da raiz .....	26
2.3	Identificação de espécies de <i>Fusarium</i> .....	27
2.4	Estratégias de controle e biocontrole das fusariose.....	29
2.4.1	<i>Trichoderma</i> como antagonista e promotor de crescimento.....	30
2.5	Compostos orgânicos voláteis e não voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36

### CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FILOGENÉTICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* ASSOCIADOS A GRÃO-DE-BICO

	<b>RESUMO</b> .....	37
	<b>ABSTRACT</b> .....	38
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	39
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
2.1	Obtenção de isolados de <i>Fusarium</i> .....	41
2.2	Obtenção de culturas monospóricas e conservação dos isolados	41
2.3	Morfotipagem dos isolados.....	43
2.4	Extração de DNA e análise filogenética dos isolados.....	44

		15
2.5	Avaliação da patogenicidade dos isolados.....	45
2.6	Análise dos dados.....	47
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
3.1	Morfotipagem dos isolados.....	48
3.2	Filogenia dos isolados.....	55
3.3	Patogenicidade dos isolados de <i>Fusarium</i> .....	59
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>

**CAPÍTULO 3 – POTENCIAL ANTAGONISTA DE *Trichoderma* sp. A *Fusarium solani* E *Fusarium oxysporum* CAUSADORES DE PODRIDÃO RADICULAR EM GRÃO-DE-BICO**

	<b>RESUMO.....</b>	<b>71</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>72</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
2.1	Obtenção de isolados de <i>Trichoderma</i> .....	75
2.2	Isolados dos patógenos utilizados.....	76
2.3	Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> sp. a <i>Fusarium</i> spp.....	77
2.3.1	Ensaio de competição por nutrientes.....	77
2.3.2	Avaliação da inibição de <i>Fusarium</i> spp. por compostos orgânicos voláteis.....	78
2.3.3	Avaliação da inibição de <i>Fusarium</i> spp. por compostos orgânicos não voláteis .....	79
2.4	Experimento em casa de vegetação.....	79
2.5	Análise dos dados.....	81
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
3.1	Ensaio de competição por nutrientes.....	82

3.2	Inibição de <i>Fusarium</i> spp. por compostos orgânicos voláteis.....	86
3.3	Inibição de <i>Fusarium</i> spp. por compostos orgânicos não voláteis	89
3.4	Experimento em casa de vegetação .....	93
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>98</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>114</b>



## CAPÍTULO 1: REFERENCIAL TEÓRICO

### 1 INTRODUÇÃO

A população mundial deverá expandir até 2050 e, com isso o desafio de garantir um nível adequado de segurança alimentar envolve a expansão sustentável da produção global de alimentos (BARBOSA; SANTANA, 2012), principalmente alimentos com alto valor proteico. O grão-de-bico é uma das principais leguminosas ricas em proteínas, vitaminas, minerais e fibra, utilizada na alimentação no sul da Europa, norte da África, Índia e países do Oriente Médio (IQBAL *et al.*, 2006). Essa leguminosa pode tornar-se uma fonte alternativa de proteína para reduzir a desnutrição proteica nos países em desenvolvimento e melhorar o estado nutricional global de alimentos funcionais nos países desenvolvidos (SHARMA *et al.*, 2013), além de aumentar a renda do produtor.

Esforços no âmbito da pesquisa têm sido feitos na tentativa de expandir a cultura no Brasil. Estudos desenvolvidos no Rio Grande do Sul (MANARA; RIBEIRO, 1992), em São Paulo (BRAGA *et al.*, 1992), em Minas Gerais (BRAGA *et al.*, 1997; VIEIRA *et al.*, 1999), no centro-oeste (GIORDANO, 1998) e no Cerrado do Planalto central (ARTIAGA, 2012) mostraram que o grão-de-bico se adapta às condições edafoclimáticas de várias localidades, inclusive as do Norte de Minas Gerais (MOTA, 2013). Entretanto a produção dessa leguminosa pode ser limitada pela ocorrência de doenças causadas por fungos de solo, dentre eles espécies de *Fusarium* (HARVESON, 2011; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011; NENE *et al.*, 2012; TRAPERO-CASAS; JIMÉNEZ DÍAZ, 1985; WESTERLUND; CAMPBELL; KIMBLE, 1973). Estudos relatam a associação patogênica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* e *Fusarium solani* às plantas de grão-de-bico no Brasil (ARTIAGA *et al.*, 2012; CABRAL *et al.*, 2013; SHARMA; CERCAUSKAS, 1985), porém no país são escassos os estudos que comprovem a etiologia das doenças que ocorrem no grão-de-bico e o potencial patogênico das espécies envolvidas. Esses estudos são essenciais

para traçar estratégias de manejo e projetar programas de melhoramento, a fim de reduzir as elevadas perdas causadas pelas doenças.

Para produção sustentável do grão-de-bico, são necessárias medidas fitossanitárias que previnam o surgimento de doenças e garantam uma boa produtividade das culturas, contudo sem causar prejuízos ao homem e ao ambiente, e sem deixar resíduos nos alimentos. Para atender a essas premissas, o uso do controle biológico com fungos do gênero *Trichoderma* sp. pode ser uma alternativa promissora. Esses microrganismos são amplamente estudados como agentes de controle biológico e têm grande potencial para serem utilizados no controle de doenças que afetam a cultura do grão-de-bico (AKRAM *et al.*, 2013; MERKUZ; GETACHEW, 2012; MORADI *et al.*, 2012).

No Brasil, a escassez de bioformulados à base de *Trichoderma* sp. registrados no MAPA tem sido um entrave na utilização agrícola desse agente biológico (MACHADO *et al.*, 2012). Porém, segundo Bettiol *et al.* (2012), acredita-se que os produtos contendo agentes de biocontrole ganharão o mercado devido às políticas públicas de base ecológica para a agricultura adotadas por diversos países, à pressão da sociedade para consumir alimentos livres de agrotóxicos, e à conscientização dos problemas de contaminação ambiental e dos alimentos com produtos químicos.

Dessa forma, devem ser melhor valoradas as atividades de prospecção e pesquisa de isolados de *Trichoderma* sp., visando o controle biológico de fitopatógenos de forma especial para o grão-de-bico, que é uma cultura nova no Brasil, a qual foi muito pouco estudada.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais do grão-de-bico

O grão-de-bico, *Cicer arietinum* L., é uma das leguminosas mais produzidas no mundo, notadamente nos países em desenvolvimento, devido ao valor nutritivo de suas sementes, principalmente o alto valor proteico (GAUR *et al.*, 2010; HOSSAIN *et al.*, 2010). A Índia é o maior país produtor, compreendendo mais de 70 % de toda a produção asiática e mundial. Outros grandes produtores incluem Austrália, Paquistão, Turquia, Myanmar, Etiópia, Iran, Canadá, Estados Unidos e México (FAOSTAT, 2011). Embora presente em mais de 50 países (FAOSTAT, 2011), 89 % da área produtiva mundial está concentrada na Ásia, sendo 80 % somente no sul da Ásia. As demais áreas produtivas encontram-se na África (5 %), na Oceania (2 %), na América do Norte (2 %), na América Latina (1 %) e na Europa (1 %) (RAO *et al.*, 2010), sendo o Oriente médio, o norte da África e África sub-saariana importantes regiões que cultivam essa leguminosa (ACHARJEE; SARMAH, 2013).

*C. arietinum* pertence à tribo Cicereae, à família Fabaceae, e à subfamília Papilionaceae (SINGH; DIWAKAR, 1995), sendo originário da região sudeste da Turquia, nas adjacências com a Síria (VAN DER MAESEN, 1987). Evidências botânicas e arqueológicas mostram que o grão-de-bico foi domesticado pela primeira vez no Oriente Médio e foi amplamente cultivado na Índia, no Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Etiópia desde a antiguidade. Dessas regiões, foi levado para outras áreas de cultivo, como México, Argentina, Chile, Peru, Estados Unidos e Austrália (MUEHLBAUER, 2007). No Brasil, foi introduzido pelos portugueses, porém foram os imigrantes vindos da Espanha e do Oriente Médio que potencializaram o seu cultivo e consumo (NASCIMENTO; PESSOA; GIORDANO, 1998).

O grão-de-bico é uma cultura típica de regiões temperadas, que, com os progressos do melhoramento de plantas, tem se expandido para regiões sub-tropicais e tropicais. O grão é geralmente cultivado em solos arenosos, sob condições de baixa pluviosidade (RAO *et al.*, 2010), desenvolvendo-se

bem quando plantado em solos bem drenados e com pH próximo ao neutro. Suporta o estresse hídrico, devido ao seu sistema radicular profundo, porém é sensível a solos mal drenados ou salinos (MARGHEIM *et al.*, 2004).

A cultura é propagada por sementes, e as épocas variam de acordo com a região de cultivo (SINGH, 1995). Em muitos países tropicais, é cultivada com sucesso no período do inverno (MONICI, 2004). Em regiões de clima frio, o plantio pode ser feito na primavera ou no verão. Nos cerrados brasileiros, é feito entre o início de abril até o início de maio (RURAL NEWS, 2012). O ciclo da cultura pode variar de 95 a 110 dias (MARGHEIM *et al.*, 2004). Mundialmente, o grão-de-bico é cultivado em uma área total de 13 milhões de ha, com produção de 11,6 milhões de toneladas e produtividade aproximada de 880 kg.ha<sup>-1</sup> (FAOSTAT, 2011).

O grão-de-bico é uma planta herbácea, anual, diploide (2n=16), com altura de 30-70 cm geralmente e com hábito de crescimento indeterminado, em que o crescimento vegetativo continua mesmo depois do início do florescimento (GAUR *et al.*, 2010). Possui uma longa raiz principal que permite a captação de água nas partes mais profundas do solo, o que torna a espécie relativamente tolerante à seca (MARGHEIM *et al.*, 2004). As raízes laterais se associam a bactérias *Rhizobium* (fixadoras de nitrogênio) formando nódulos que podem ser vistos cerca de um mês após a emergência (GAUR *et al.*, 2010).

De acordo com o tamanho, a forma e a cor das sementes, as variedades do grão-de-bico podem ser classificadas em dois tipos: Kabuli e Desi. As variedades do tipo Desi (microsperma) possuem sementes pequenas com formato angular e coloração que varia desde o bege, preto, marron, amarelo, até o verde (SING; DIWAKAR, 1995). São protegidas por um tegumento espesso e apresentam a superfície enrugada (GAUR, 2010). Apresentam flores com coloração rósea ou púrpura com a presença de antocianina nas hastes (BRAGA *et al.*, 1992; SING; DIWAKAR, 1995). Mutações e seleções naturais do grão-de-bico tipo Desi originaram as variedades do tipo Kabuli (MARGHEIM *et al.*, 2004). Esse, também conhecido como macrosperma, caracteriza-se por apresentar sementes

grandes, redondas ou em forma de cabeça de carneiro. Possuem o tegumento fino com superfície lisa e coloração branca ou bege (GAUR *et al.*, 2010; SINGH; DIWAKAR, 1995). As plantas são altas em estatura, possuem flores brancas, folíolos grandes e não contêm antocianina. Geralmente, formam-se dois grãos por vagem (BRAGA *et al.*, 1992). Ambos os tipos Desi e Kabuli podem ser utilizados para a nutrição de ruminantes (MAHERI-SIS *et al.*, 2008). As plantas frescas e feno são utilizadas como alimento para o gado (KHAN *et al.*, 2009), bem como plantios; com aproximadamente 35 dias servem como forragem para cabras e ovelhas (YADAV *et al.*, 2007). As sementes após extrusão podem ser utilizadas em substituição ao farelo de soja em rações de suínos sem afetar o desempenho e a qualidade de carcarça dos animais (CHRISTODOULOU *et al.*, 2006). Na indústria têxtil, é fonte de amido usado para dar um acabamento leve à seda, à lã e aos tecidos de algodão. É também utilizado na fabricação de uma cola, não muito resistente à água, utilizada na indústria de compensados (MAITI, 2001).

A maioria das variedades possui folhas estruturadas como “folha de samambaia”, compostas por vários pares de pequenos folíolos arredondados ou oblongos (MARGHEIM *et al.*, 2004). São pecioladas, imparipinadas, alternas com folíolos também alternos (SINGH; DIWAKAR, 1995). Algumas variedades do tipo kabuli, ao invés de folíolos, possuem a estrutura foliar formada apenas por uma única folha maior (unifoliolada) (MARGHEIM *et al.*, 2004). Toda a superfície da planta, exceto a corola, é densamente coberta por tricomas que formam uma fina pilosidade. Muitos são glandulares e secretam substâncias altamente ácidas contendo ácido cítrico, málico e oxálico. Esses ácidos desempenham um importante papel na proteção da planta contra insetos-praga (GAUR *et al.*, 2010).

As flores são completas e bissexuais, de coloração branca, rosa, purpura ou azul. São sustentadas individualmente na ponta de racemos axilares. Cada flor possui um pedúnculo e um pedicelo. Em algumas plantas, podem ocorrer 2 ou 3 flores no mesmo nó. A autopolinização ocorre quando as flores ainda estão fechadas (SINGH; DIWAKAR, 1995).

As vagens são curtas, ovaladas e, na maioria das vezes, desenvolvem-se na parte superior da planta, sendo relativamente resistentes à quebra. (MARGHEIM *et al.*, 2004). O número de sementes por vagem pode variar de uma a duas, com no máximo três (SINGH; DIWAKAR, 1995). Tipos comerciais comumente têm uma semente por vagem (MARGHEIM *et al.*, 2004).

Devido às suas propriedades nutricionais, a demanda por grão-de-bico tem aumentado (JUKANTI *et al.*, 2012). As suas proteínas têm sido consideradas de melhor valor nutricional entre as leguminosas (TAVANO *et al.*, 2008) e são encontradas em quantidades elevadas nas sementes (18 a 31 %) (SHARMA *et al.*, 2013). Além de proteínas, as sementes apresentam carboidratos (51 a 71 %), lipídeos (2,9 a 8,8 %) e fibras (11 a 23 %). Em geral, o teor de fibras no grão-de-bico é considerado alto e, por isso, o consumo dessa leguminosa pode ajudar no tratamento de doenças como a hipertensão, diabetes, hipoglicemia, hipercolesterolemia e obesidade. A energia fornecida varia de 334-446 Kcal/100 g de sementes (WOOD; GRUSAK, 2007). É uma ótima fonte de fósforo, de potássio, de cálcio, de magnésio, de sódio, de ferro, de cobre, de manganês e de zinco (FERREIRA, 2006) e a melhor fonte de ferro biodisponível entre as leguminosas, fornecendo também vitaminas do complexo B, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis), vitamina K (filoquinona) e carotenoides (provitamina A (retinol)). As vitaminas do complexo B incluem vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantotênico), B6 (piridoxina) e B9 (ácido fólico) (WOOD; GRUSAK, 2007).

Embora o grão tenha uma boa aceitação no mercado nacional, que prefere os grãos médios e grandes do grupo kabuli, ainda é pouco consumido pela população. Esse baixo consumo deve-se principalmente aos altos preços dessa leguminosa, que, para atender à demanda do mercado interno, tem que ser importada do México, do Chile e da Turquia (NASCIMENTO; PESSOA; GIORDANO, 1998). O Brasil não apresentava nenhuma área comercial da cultura até 2011 (ARTIAGA, 2012).

## 2.2 Doenças da cultura do grão-de-bico

Alguns fatores bióticos e abióticos limitam a produtividade do grão-de-bico, que tem estado estagnada nas últimas duas décadas (RAO *et al.*, 2010). A cultura é afetada pelo ataque de doenças e pragas, pelo estresse ao frio, à seca, à salinidade e pela competição por plantas daninhas (ACHARJEE; SARMAH, 2013). Mais de 170 patógenos, incluindo fungos, bactéria, vírus e nematoides, já foram relatados afetando a cultura do grão-de-bico no mundo (NENE; SHEILA; SHARMA, 1996).

Dentre esses patógenos, destaca-se um complexo de fungos habitantes do solo, associado à murcha e à podridão radicular do grão-de-bico. Esses podem agir isolados, causando doenças específicas, ou em conjunto e são difíceis de serem diferenciados com base em sintomas, pois, por causarem infecções nas raízes e na região do colo das plantas, todos levam a quadros sintomatológicos de amarelecimento e murcha. Fazem parte desse complexo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K.Sato, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora megasperma*, *Fusarium solani*, *F. solani* f. sp. *pisii* (F.R. Jones) W.C. Snyder & H.N. Hansen, *F. eumartii* C.W.Carp., *Macrophomina phaseolina* (ANDRABI; VAID; RAZDAN, 2011; HARVESON, 2011; NENE *et al.*, 2012; TRAPERO-CASAS; JIMÉNEZ DÍAZ, 1985; WESTERLUND; CAMPBELL; KIMBLE, 1973) e *F. redolens* (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

No Brasil, embora a cultura do grão-de-bico seja pouco expressiva, já foi relatada a ocorrência de fungos de solo, incluindo *F. solani* em plantios de inverno na Região do Planalto Central (ARTIAGA *et al.*, 2012), de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* em áreas de cerrado do Distrito Federal (SHARMA; CERKAUSKAS, 1985; ARTIAGA *et al.*, 2012). Segundo Braga *et al.*, (1997), com a disseminação da cultura, algumas doenças podem vir a se tornar problemas.

### 2.2.1 A murcha de fusarium

Dentro do gênero *Fusarium*, *F. oxysporum* é a principal espécie de importância econômica (LESLIE; SUMMERELL, 2006), a qual encontra-se presente na microflora da rizosfera das plantas, conhecido por causar murcha ou podridão radicular em uma variedade de plantas de importância econômica, ainda que algumas estirpes sejam consideradas não patogênicas (FRAVEL *et al.*, 2003). Esse fungo é anamórfico, pertencente ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales e família Nectriaceae, sendo a sua fase teleomórfica desconhecida (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O elevado nível de especificidade de hospedeiro de isolados patogênicos de *F. oxysporum* levou ao desenvolvimento do conceito *formae speciales*, para permitir uma melhor diferenciação desses isolados morfológicamente semelhantes (JIMÉNEZ-GASCO *et al.*, 2002). *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOCs) tem o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) como hospedeiro específico, embora possa invadir várias outras culturas, incluindo lentilha, ervilha, feijão guandu, alfafa e feijão largo, porém sem causar sintomas evidentes de fusariose (TRAPERO-CASAS; JIMENEZ-DÍAZ, 1985). Essa espécie causa a murcha de fusarium, umas das principais doenças do grão-de-bico, que provoca graves perdas no rendimento da cultura nos países onde a sua ocorrência é conhecida (SINGH *et al.*, 2007). A doença tem sido relatada na maioria das regiões produtoras da Ásia, da África, e do sul da Europa. Estimam-se perdas anuais devido à murcha de fusarium em torno de 10 a 15 %, podendo chegar a 60-70 % em anos de severas epidemias ou atingir 100 %, dependendo da suscetibilidade varietal e das condições agroclimáticas (CHAND; KHIRBAT, 2009; NENE *et al.*, 2012).

No solo, FOCs infecta as raízes do hospedeiro por meio dos esporos ou micélio, podendo ocorrer a penetração de forma direta ou por meio de ferimentos no sistema radicular, ou oportunista, no ponto de formação de raízes laterais (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Após a infecção das raízes do hospedeiro, o fungo atravessa o córtex e entra nos tecidos do xilema. O micélio se ramifica e produz microconídios, que são transportados pelo



sistema vascular, o que torna a infecção sistêmica, podendo até mesmo atingir as sementes. O fungo produz enzimas que degradam a parede celular dos vasos, bloqueando o transporte de água, o que resulta no fechamento dos estômatos, murcha e morte de folhas, seguida de morte de toda a planta (LESLIE; SAMMERELL, 2006; SINGH *et al.*, 2007). A doença aparece 20 dias após a semeadura, mas pode ocorrer antes em cultivares suscetíveis a *F. oxysporum*, quando o plantio é feito em solos leves e arenosos, alcalinos, úmidos e com temperatura médias de 25 °C, por favorecer o desenvolvimento da doença (SINGH *et al.*, 2007). Os sintomas se caracterizam pela queda de pecíolos, raques e folíolos. As folhas inferiores apresentam clorose, vão gradualmente se tornando amareladas, em seguida, de coloração palha e por fim ,secam (SINGH *et al.*, 2007). Plântulas afetadas apresentam, primeiramente, inclinação das folhas e, em seguida, entram em colapso. As raízes externamente se aparentam saudáveis, porém, quando divididas verticalmente os tecidos vasculares mostram descoloração marrom à preta (GAUR, 2010). Essa descoloração interna se estende em direção aos caules e ramos. A coinfeção com outros patógenos de solo pode causar a descoloração da raiz externa (SINGH *et al.*, 2007). Após a morte da planta, o fungo alcança a superfície do tecido vegetal, onde ocorre uma grande esporulação fúngica. Os esporos podem ser dispersos pelo vento, pela água ou pelo o movimento do solo e pelos restos de plantas. FOCs pode sobreviver no solo por meio do micélio e clamidósporos e também em resíduos de culturas infectadas por até 6 anos (SINGH *et al.*, 2007). Segundo Pande *et al.* (2007), sementes provenientes de plantas infectadas, mesmo aparentemente saudáveis, podem transportar o patógeno para novas áreas onde a doença pode se estabelecer.

Dois patótipos e 8 raças são conhecidos em FOCs. O patótipo do amarelecimento induz um amarelecimento foliar progressivo, com descoloração vascular e, posteriormente, morte tardia da planta. O patótipo da murcha causa uma clorose rápida e grave, flacidez, descoloração vascular, e morte precoce da planta. Em ambos os patótipos, o tecido radicular da planta afetada não apresenta sintoma externo (JIMÉNEZ-

FERNÁNDEZ *et al.*, 2013). Baseado na reação de diferentes cultivares de grão-de-bico à FOCs, são identificadas as raças 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 e 6, as quais possuem distribuição geográfica diversa. As raças 0 e 1B/C pertencem ao patótipo do amarelecimento, enquanto as raças 1A, 2, 3, 4, 5 e 6 pertencem ao patótipo da murcha (JIMÉNEZ-GASCO; JIMÉNEZ-DÍAZ, 2003).

### 2.2.2 A podridão negra da raiz

*Fusarium solani*, (Teleomorfo *Haemanectria haematococca*, filo Ascomycota, ordem Hypocreales) é uma espécie cosmopolita, que possui uma ampla gama de hospedeiros (LESLIE; SUMMURELL, 2006). No grão-de-bico, causa a doença conhecida como podridão negra das raízes, que, embora menos importante que a murcha de fusarium causada por FOCs, leva a perdas significativas nos locais onde o fungo está presente no solo. A doença já foi relatada na Argentina, no Chile, na Índia, no México, na Espanha, na Síria e nos Estados Unidos (NENE *et al.*, 2012). Alguns autores atribuem a etiologia da doença à *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (HASANZADE *et al.*, 2008; WESTERLUND; CAMPBELL; KIMBLE; 1974).

*F. solani* produz clamidósporos que podem ficar viáveis por vários anos no solo (HAVERSON, 2011). Estes quando germinam, entram em contato com a planta hospedeira e crescem sobre o sistema radicular. Após encontrar um ponto de entrada, a hifa penetra e se ramifica no tecido cortical onde desenvolve a doença (SMITH, 2007). As plantas afetadas amarelecem, murcham e senescem precocemente, e o sistema radicular fica apodrecido com a maioria das raízes finas destruídas devido à ação do fungo. As raízes restantes se tornam enegrecidas e necróticas (HARVESON, 2011). No entanto, plantas afetadas podem emitir novas raízes caso haja umidade suficiente (NENE *et al.*, 2012). A doença causada por *F. solani* é favorecida pela umidade excessiva e temperaturas em torno de 25 a 30 °C, e pode ocorrer em qualquer estágio da cultura (NENE *et al.*, 2012). O patógeno sobrevive em restos culturais, parasitando outras culturas plantadas em

rotação com o grão-de-bico, e até mesmo em plantas espontâneas (MOHAMMADI; BANIHASHEMI, 2006). Novos clamidósporos são formados e retornam para o solo junto com os restos cuturais, reiniciando o ciclo da doença (SMITH, 2007).

### **2.3 Identificação de espécies de *Fusarium***

As espécies de *Fusarium* são abundantes em regiões temperadas e tropicais, sobrevivendo como saprófitas no solo e restos vegetais e estão entre os mais importantes patógenos de plantas em todo o mundo. Algumas espécies são produtoras de toxinas e podem causar doenças em humanos e animais (BOOTH, 1971; LESLIE; SUMMEREL, 2006;).

Para a identificação de espécies do gênero *Fusarium*, são empregados três diferentes conceitos básicos de espécies: morfológico, biológico e filogenético (LESLIE *et al.*, 2001). O conceito morfológico é o mais utilizado e é baseado em características físicas e fisiológicas, como formato e tamanho de macro e microconídios, tipo de conodióforos e fiálides, ausência e presença de clamidósporos, aparência da colônia, pigmentação e taxa de crescimento em meio de cultura, odor, esporulação e produção de toxinas (GERLACH; NIRENBERG, 1982; NELSON *et al.*, 1981; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Pequenas diferenças nos caracteres observados podem delinear uma espécie. Embora tradicional, a definição de espécies com base no conceito morfológico pode apresentar limitações, pois o número restrito de caracteres morfológico e a variabilidade existente em função do ambiente subestimam a real diversidade de espécies de *Fusarium* (LESLIE *et al.*, 2001). Além disso, as relações evolutivas, distribuição geográfica e a variedade de hospedeiro podem ser omitidas (O'DONNELL *et al.*, 2008).

A subdivisão intraespecífica *forma specialis* foi adotada para identificar linhagens morfológicamente iguais com a capacidade de parasitar e causar doença em um hospedeiro específico ou em um conjunto de plantas hospedeiras. Várias dessas linhagens representam espécies biológicas e filogenéticas distintas (O'DONNELL, 2000). Muitas são difíceis de serem

separadas de cepas não patogênicas ou saprofiticas, o que requer testes de patogenicidade em hospedeiros diferenciadores específicos para a *forma specialis* em questão (SUMMEREL; SALLEH; LESLIE, 2003).

O conceito biológico define que são da mesma espécie indivíduos ou populações intercruzantes que conseguem se reproduzir sexualmente e deixar descendentes viáveis e férteis. Espécies biológicas em *Fusarium* são denominadas em inglês como *Mating populations* (LESLIE, 1995). A aplicação do conceito de espécie biológica permitiu uma definição mais acurada de espécies que causam doenças em plantas cultivadas (LESLIE; SUMMEREL, 2006). Porém, há algumas limitações práticas para a sua aplicação, como, por exemplo, os altos níveis de reprodução assexuada em *Fusarium* e, muitas vezes, o número limitado de linhagens que são férteis (TAYLOR *et al.*, 2000). Outro entrave é que nem todas as espécies de *Fusarium* possuem a forma sexual conhecida, como é o caso de *Fusarium oxysporum*.

São consideradas espécies filogenéticas aquelas que, dentro de uma filogenia, compartilham até um determinado nível, a mesma origem genética (monofiléticas) (SUMMEREL; SALLEH; LESLIE, 2003). Nas últimas décadas, tem-se intensificado o uso de técnicas moleculares, com o intuito de resolver as relações dentro do gênero *Fusarium* (DEMERS; GARZÓN; JIMENÉZ-GASCO, 2014; LAURENCE *et al.*, 2014). A amplificação e a análise de sequências gênicas permitem gerar dados que são utilizados na construção de filogramas que distinguem espécies e fornecem informações sobre sua diversidade e as suas relações evolutivas (SUMMEREL; SALLEH; LESLIE, 2003). Para essa finalidade, são comumente utilizados genes que codificam para fator de alongação 1- $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ),  $\beta$ -tubulina, maior subunidade da RNA polimerase (*RPB1*), segunda maior subunidade da RNA polimerase (*RPB2*), regiões *ITS* (*Internal Transcribed Spacer Regions*), *IGS* (*Intergenic Spacer Region*) e *mtSSU* (*mitochondrial small-subunit*) do DNA ribossomal (rDNA), e fragmentos amplificados de polimorfismo (*AFLPs*) (LAURENCE *et al.*, 2014; O'DONNELL *et al.*, 2004, 2008, 2010; SCHROERS *et al.*, 2004; SOUTHWOOD *et al.*, 2012;). Estudos de filogenia molecular comprovaram

que *Fusarium solani* é um complexo de espécies (*Fusarium solani* Species Complex - FSSC), com mais de 50 espécies filogeneticamente distintas, antes desconhecidas devido à semelhança morfológica (NALIM *et al.*, 2011; O'DONNELL, 2000; O'DONNELL *et al.*, 2008). *Fusarium oxysporum* também é um complexo de espécies (*Fusarium oxysporum* Species Complex - FOSC) que compartilham características morfológicas e que compreende mais de 80 *formae specialis*, além de patógenos humanos e estirpes não patogênicas (KISTLER, 1997; O'DONNELL *et al.*, 2009). As *formae specialis* em FOSC podem ser monofiléticas ou polifiléticas (BAAYEN *et al.*, 2000; O'DONNELL *et al.*, 1998).

## 2.4 Estratégias de controle e biocontrole das fusarioses

A murcha e a podridão negra da raiz incitadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* e *F. solani* em grão-de-bico são difíceis de serem manejadas por métodos convencionais devido à capacidade dos patógenos em sobreviver no solo e em restos culturais por muitos anos (MOHAMMADI; BANIHASHEMI, 2006; SINGH *et al.*, 2007). Por causa dessa persistência do patógeno no solo, o método de controle mais utilizado e mais economicamente eficiente tem sido o uso de cultivares resistentes (BAKHSH *et al.*, 2007). Entretanto a efetividade da resistência das cultivares pode ser reduzida pela variabilidade patogênica desses fungos (JIMENEZ-GASCO *et al.*, 2005; SUGA *et al.*, 2000). Medidas de controle, como rotação de culturas, solarização do solo, uso de semente livre de patógenos e remoção de restos de plantas infestadas, podem ser adotadas nas lavouras (SINGH *et al.*, 2007), porém sem muito sucesso (DUBEY *et al.*, 2007). No tratamento de sementes, são utilizados os fungicidas carbendazim, thiram + benomyl e thiram + captan (NENE *et al.*, 2012). O uso de fungicidas químicos sistêmicos em plantas é considerado dispendioso, pode causar problemas ambientais (ANIMISHA *et al.*, 2012), além de não conseguir impedir a infecção e colonização a das raízes pelo patógeno.

Segundo Landa *et al.*(2004) é difícil uma única medida de controle que seja eficaz de forma isolada. Em conformidade com esses autores, o uso de agentes de biocontrole, quando combinado com outras práticas, tais como mudanças na época de semeadura e uso de cultivares resistentes, pode melhorar eficiência na supressão da murcha de fusarium.

O controle biológico com uso de microrganismo está se tornando um componente extremamente necessário no manejo de doenças de plantas, particularmente na redução de doenças radiculares (MEKI *et al.*, 2009). Comparado aos fungicidas, que têm efeito temporário e necessitam de aplicações sucessivas durante o período de crescimento da cultura, os agentes de controle biológico são capazes de se estabelecer e de se reproduzirem no ecossistema (ÁVILA *et al.*, 2005). A utilização do fungo *Trichoderma* sp. no controle de doenças causadas por *Fusarium* sp. em grão-de-bico tem tido bons resultados tanto de forma isolada (AKRAMI *et al.*, 2012; MORADI *et al.*, 2012), como quando utilizado de forma integrada (DUBEY *et al.*, 2007; ANIMISHA *et al.*, 2012).

#### **2.4.1 *Trichoderma* como antagonista e promotor de crescimento**

Os fungos do gênero *Trichoderma* são saprófitos, ubíquos e altamente interativos na raiz e no solo, bem como no interior de plantas (POMELLA; RIBEIRO, 2009). Reproduzem-se assexuadamente, tendo a sua fase teleomófica pertencente ao gênero *Hypocrea*. Embora sejam considerados fungos de vida livre, já há evidências de que espécies de *Trichoderma* podem ser oportunistas, simbioses avirulentos de plantas, bem como parasitas de outros fungos (SAMUELS, 2006). São encontrados com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (HARMAN *et al.*, 2004), sendo algumas espécies cosmopolitas, enquanto outras são limitadas à sua distribuição geográfica (SAMUELS, 2006).

*Trichoderma* sp. caracteriza-se pelo crescimento rápido em meio de cultura, com a produção de um micélio aéreo e esparso, com a formação de pústulas conidiogênicas brancas ou verdes (BISSET, 1991). Em geral, as

fiálides são hialinas e são formadas sobre os conidióforos. O tipo de ramificação dos conidióforos e o modo de disposição das fialídes são bastante característicos (BISSET, 1991). Os conídios são geralmente lisos, dificilmente ornamentados, com formato elipsoidal a quase oblongo, sendo raramente globosos. Possuem coloração verde ou hialina, sendo, às vezes, amarelos. Quando presentes, os clamidósporos são tipicamente globosos para subglobosos e são formados dentro ou nas pontas das hifas (CHEVERRI; SAMUELS, 2004).

A grande importância econômica desses fungos para a agricultura se deve à capacidade de atuarem como antagonistas a uma gama de fitopatógenos de várias plantas cultivadas, como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças (AGUIAR *et al.*, 2013; AKRAMI *et al.*, 2013; FORTES *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2011; STEFANELLO; BONETT, 2013). O antagonismo é baseado em diferentes mecanismos como a competição por espaço e nutrientes o micoparasitismo, a produção de metabolitos antifúngicos (MOTLAGH; SAMIMI, 2013).

*Trichoderma* sp. compete com outros microrganismos de solo por exsudatos de sementes que estimulam a germinação de propágulos de fungos fitopatogênicos no solo, e mais comumente, competem por nutrientes e/ou espaço, mas podem ainda degradar pectinases e outras enzimas que são essenciais para fungos fitopatogênicos (HARMAN *et al.*, 2004). A competição por nutrientes é um mecanismo importante, pois muitos fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Ainda segundo esse autor, *Trichoderma* sp. tem uma capacidade superior em mobilizar e absorver os nutrientes do solo comparativamente a outros organismos. Um outro importante mecanismo de biocontrole é o micoparasitismo. Fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de reconhecer as hifas de outros fungos e crescer em sua direção, presumivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira. Ao encontrá-las, enrolam em torno delas, desenvolvem haustórios e penetram por meio de enzimas degradadoras de parede celular, como glucanases, quitinases e proteases. Assim, utilizam o conteúdo das hifas do hospedeiro como fonte de

nutrientes (HARMAN *et al.*, 2004). Silva *et al.* (2011) demonstraram que isolados de *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. strigosum*, *T. longibrachiatum* e *T. koningiopsis* atuaram como promotores do crescimento de plantas e como indutores de resistência à antracnose em pepineiro. Em outro trabalho, Aguiar *et al.* (2013) demonstraram que isolados de *T. viride* promoveram o crescimento de plântulas de feijão e reduziram o processo de doença causado por *Sclerotinia sclerotiorum*.

A promoção de crescimento de plantas pela aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. foi inicialmente relacionada ao controle de microrganismos prejudiciais as plantas. Entretanto pesquisas mostraram que tal efeito está relacionado à produção de hormônios ou fatores de crescimento; à maior eficiência no uso de alguns nutrientes e ao aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta (AGUIAR *et al.*, 2013; CONTRERAS-CORNEJO, 2009; SILVA *et al.*, 2011). *Trichoderma* pode solubilizar vários nutrientes, tais como fosfato de rocha,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{4+}$  e Zn, que podem estar indisponíveis para determinadas plantas (HARMAN *et al.*, 2000).

A associação de *Trichoderma* com as raízes pode ainda induzir mecanismos de defesa na planta, protegendo-a de vários patógenos (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Os isolados de *Trichoderma* sp. colonizam a epiderme e as células do córtex das raízes e, dessa forma, ativam vias de sinalização, desencadeando respostas de defesa nas plantas (BROTMAN *et al.*, 2010). Essas produzem depósitos de parede celular e fatores bioquímicos que limitam tanto o crescimento do próprio *Trichoderma*, quanto a entrada de agentes patogênicos (HARMAN *et al.*, 2004; MOTLAGH; SAMIMI, 2013). De acordo com Romeiro (2007), plantas levadas ao estado de indução de resistência apresentam aumento nas atividades de enzimas, tais como quitinases, glucanases e peroxidases, envolvidas nas rotas de percepção da presença de patógenos em potencial e nas rotas de sinalização bioquímica a pontos distantes do sítio onde o sinal foi originado.

A eficácia do uso de *Trichoderma* sp. no controle da murcha de fusarium causada por FOCs em grão-de-bico já tem sido relatada. Em campo com ocorrência da doença, o tratamento de sementes, com a combinação do



*T. harzianum* e carboxin, mostrou o melhor desempenho em reduzir a incidência da murcha e melhorar a germinação de sementes e a produção de grãos durante três anos de experimentações (DUBEY *et al.*, 2007). Merkuiz e Getachew (2012) mostraram uma redução significativa na incidência da murcha e atraso de início da doença por meio do tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma*. Em outro trabalho, Akrami *et al.* (2013) demonstraram que a combinação dos antagonistas *T. harzianum*, *T. asperellum* and *T. virens* apresentou um efeito protetor para biocontrole em grão-de-bico exposto a *F. solani* e *F. oxysporum* em casa de vegetação, além de diminuir a severidade da doença entre 83 a 84 %.

## **2.5 Compostos orgânicos voláteis e não voláteis produzidos por *Trichoderma***

A antibiose ocorre quando compostos difusíveis de baixo peso molecular ou antibióticos produzidos por *Trichoderma* sp. inibem o crescimento de outros fungos. A maioria das cepas de *Trichoderma* pode produzir metabólitos tóxicos, os quais podem ser voláteis e não voláteis (BENÍTEZ *et al.*, 2004; STOPPACHER *et al.*, 2010; SIDDIQUEE *et al.*, 2012, VINALE *et al.*, 2008a). Zhang *et al.* (2014) observaram que compostos orgânicos voláteis produzidos pelo isolado T-E5 de *T. harzianum* mostraram significativa atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Em outro estudo, foi observada a inibição do crescimento micelial de *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, por meio de compostos não voláteis presentes em filtrados de *Trichoderma* spp. (ZAFARI; KOUSHKI; BAZGIR, 2008).

Ghisalberti e Sivasithamparam (1991) classificaram as substâncias antifúngicas produzidas por *Trichoderma* spp. em três categorias: antibióticos voláteis, compostos hidrossolúveis e peptaboils.

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são líquidos lipofílicos sob alta pressão de vapor, que têm ponto de ebulição baixo (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010; INSAM; SEEWALD, 2010). A maioria tem baixa solubilidade

em água (MORATH; HUNG; BENNETT, 2012). Dentre os COVs produzidos por *T. atroviride*, foram identificados álcoois, cetonas, alcanos, furanos, pironas, mono e sesquiterpenos, sendo que o composto bioativo 6-pentil- $\alpha$ -pirona foi encontrado em maior quantidade (STOPPACHER *et al.*, 2010). Siddiquee *et al.* (2012), utilizando o método de cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas (CG-EM), identificaram mais de 278 compostos COVs produzidos por *T. harzianum*, envolvendo hidrocarbonetos saturados (C7-C30), ciclo-hexano, ciclopentano, ácidos graxos, álcoois, ésteres, compostos contendo enxofre, pirano simples e derivados de benzeno. Em trabalho de Arjona-Girona *et al.*, (2014), foi observado que o composto 6-pentil- $\alpha$ -pirona produzido por isolados de *Trichoderma* spp. foi eficiente na inibição do crescimento micelial de *Rosellinia necatrix*, mesmo nas concentrações mais baixas.

A produção de compostos voláteis resulta em altas concentrações de antibióticos cujo efeito pode ter longo alcance no solo. Já efeitos a curta distância podem ser devido a antibióticos polares e peptaibols, que agem nas proximidades das hifas onde são produzidos (VINALE *et al.*, 2008 b).

Compostos não voláteis envolvem os peptaibols, que são uma grande família de peptídeos antibióticos produzidos por fungos de solo, incluindo *Trichoderma* (DANIEL; RODRIGUES FILHO, 2007). São oligopeptídeos lineares de sete a 20 aminoácidos, ricos em ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, com uma extremidade N-acilo, geralmente acetil e contendo um amino-álcool no C-terminal, tal como fenilalaninol ou leucinol (WIEST *et al.*, 2002).

Shi *et al.* (2012) demonstraram que a *Trichokonin* VI, um tipo de peptaibol produzido por *Trichoderma pseudokoningi*, induz apoptose em células de *Fusarium oxysporum*, o que revelou o mecanismo antibiótico desse peptídeo contra fungos fitopatogênicos. Antibióticos não voláteis, como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de outros fungos (DENNIS; WEBSTER, 1971a).

Além da capacidade de paralisar o crescimento de fitopatógenos, os metabolitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp. podem desempenhar um papel na regulação do crescimento de plantas e atuar como elicitores na indução de respostas de defesa da planta (VINALE *et al.*, 2008a). O tipo de composto orgânico e as quantidades produzidas podem variar de acordo com a espécie ou isolado (ARJONA-GIRONA *et al.*, 2014; VINALE *et al.*, 2008a).

Embora inúmeros microrganismos tenham sido considerados como antagonistas a patógenos oriundos do solo, poucos evoluíram para uso em escala comercial (HARMAN *et al.*, 2010). Em relação aos fungicidas, o mercado mundial de produtos contendo agentes biológicos representa apenas 1% (BETTIOL *et al.*, 2012). No Brasil, a baixa disponibilidade de produtos à base de *Trichoderma* devidamente registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a falta de divulgação sobre os seus princípios e vantagens restringem a sua utilização (MACHADO *et al.*, 2012).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Isolar, identificar e avaliar a patogenicidade de isolados de *Fusarium* associados a plantas de grão-de-bico;
- Selecionar isolados de *Trichoderma* sp. e avaliá-los quanto ao controle de *Fusarium* spp. e promoção de crescimento de plantas de grão-de-bico *in vivo*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Obter isolados de *Fusarium* associados ao grão-de-bico em plantas cultivadas em campo.
- Identificar os isolados de *Fusarium* por características morfológicas e realizar análises de filogenia molecular para o fator de alongação 1-alfa (*EF-1 $\alpha$* ).
- Avaliar a patogenicidade dos isolados de *Fusarium* em plantas de grão-de-bico.
- Verificar o antagonismo *in vitro* e *in vivo* de isolados de *Trichoderma* sp. aos isolados mais agressivos de *Fusarium* spp. por meio da competição por nutrientes e produção de compostos orgânicos voláteis e não voláteis.

## CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FILOGENÉTICA E PATOGENICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* ASSOCIADOS A GRÃO-DE-BICO

### RESUMO

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) é uma leguminosa de grande importância mundial devido ao seu alto teor de proteína, de ferro, de vitaminas e de fibra. No Brasil, a demanda por essa leguminosa é crescente, e a sua produção é limitada pela ocorrência de doenças, como a fusariose. Dessa forma, os objetivos deste estudo foram obter e identificar isolados de *Fusarium* associados à fusariose do grão-de-bico, com base em características morfológicas e filogenéticas e avaliar a patogenicidade dos mesmos. Isolados de *Fusarium* foram obtidos de raízes de plantas de grão-de-bico, com aparentes sintomas de murcha e amarelecimento, pelo método indireto. Os isolados foram cultivados em meio BDA e SNA para a caracterização morfológica. A análise filogenética foi realizada com base em comparação de sequências parciais do gene que codifica o fator de alongação EF-1 $\alpha$ , com sequências do Complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC) e do Complexo de espécies *Fusarium solani* (FSSC) disponíveis no GenBank-NCBI. A patogenicidade foi avaliada por meio de dois experimentos separados no tempo e no espaço. No primeiro, mudas de grão-de-bico foram imersas em suspensão de conídios de *Fusarium* na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>. No segundo, mudas e sementes de grão-de-bico foram cultivadas em solo infestado com *Fusarium*. Dos 14 isolados de *Fusarium* obtidos e caracterizados, 11 apresentaram marcadores morfológicos típicos de *F. oxysporum* e três de *F. solani*. De acordo com a análise filogenética, três isolados agruparam junto à linhagem 3+4 do FSSC, enquanto outros 11 isolados agruparam no complexo FOSC, em clado distinto de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Todos os isolados foram patogênicos, independente da metodologia utilizada, causando sintomas de amarelecimento, murcha e podridão radicular. O isolado FCA 27 e FCA 12 foram os mais agressivos dentre os isolados de *F. oxysporum* de *F. solani* avaliados, respectivamente. Os marcadores morfológicos permitem diferenciar isolados de complexos distintos, mas não a diferenciação entre linhagens

**Palavras-chave:** *Fusarium solani*. *Fusarium oxysporum*. Patogenicidade. Podridão radicular. Fusariose

## CHAPTER 2: MORPHOLOGICAL, PHYLOGENETIC AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *Fusarium* ISOALATES ASSOCIATED WITH CHICKPEA

### ABSTRACT

The chickpea (*Cicer arietinum* L.) is a leguminous of great importance worldwide due to its high content of protein, iron, vitamins and fiber. In Brazil, the demand for this leguminous is growing and its production is limited by the occurrence of diseases such as the fusarium. Thus, the objectives of this study were to obtain and identify isolates of *Fusarium* associated with chickpea disease based on morphological and phylogenetic characteristics and evaluate the pathogenicity of them. *Fusarium* isolates were obtained from roots of chickpea plants, with apparent symptoms of wilting and yellowing, by the indirect method. The isolates were cultured on PDA and SNA for the morphological characterization. The phylogenetic analysis was performed based on comparison of partial sequences of the gene encoding the elongation factor EF-1 $\alpha$  with sequences of *Fusarium oxysporum* Species Complex (FOSC) and *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) available in GenBank-NCBI. The pathogenicity was evaluated by two separate experiments in the time and space. In the first, chickpea seedlings were immersed in *Fusarium* conidial suspension at a concentration of  $1 \times 10^6$  conidia.mL<sup>-1</sup>. In the second, seedlings and chickpea seeds were grown in soil infested with *Fusarium*. Of the 14 isolates of *Fusarium* obtained and characterized, 11 showed typical morphological markers of *F. oxysporum* and three of *F. solani*. According to phylogenetic analysis, three isolates were clustered along the strain 3 + 4 of FSSC, while the other 11 isolates were grouped in FOSC complex, in a distinct clade of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. All isolates were pathogenic independent of the methodology used, causing symptoms of yellowing, wilting and root rot. The isolated FCA 12 and FCA 27 were the most aggressive among isolates of *F. oxysporum* and *F. solani* evaluated, respectively. The morphological markers allow to differ isolates of distinct complexes, but not the differentiation between strains.

**Keywords:** *Fusarium solani*. *Fusarium oxysporum*. Pathogenicity. Root rot.

## 1 INTRODUÇÃO

O grão-de-bico, *Cicer arietinum* L., é uma leguminosa de grande importância mundial, notadamente nos países da África e da Ásia, devido ao valor nutritivo de suas sementes, principalmente os altos teores de proteína (GAUR *et al.*, 2010; HOSSAIN *et al.*, 2010). Essa leguminosa tem sido cada vez mais utilizada como uma alternativa à proteína animal, sobretudo nos países em desenvolvimento (WOOD; GRUSAK, 2007), tornando-se componente importante da dieta de pessoas que são vegetarianas por opção ou por motivos econômicos (JUKANTI *et al.*, 2012).

Alguns fatores bióticos e abióticos limitam a produção do grão-de-bico, como o ataque de doenças e pragas, o estresse ao frio, à seca, à salinidade e a competição por plantas daninhas (ACHARJEE; SARMAH, 2013). Mais de 170 patógenos já foram relatados afetando a cultura em todo o mundo (NENE; SHEILA; SHARMA, 1996), sendo o fungo *Fusarium oxysporum* (Padwick) f. sp. *ciceris* Matuo & K. Sato um dos mais importantes na redução da produção. Esse é um fungo de solo, causador de uma doença vascular, a murcha de fusarium, conhecida mundialmente por limitar a produção de grão-de-bico, causando perdas de até 100% em condições favoráveis (CHAND; KHIRBAT, 2009; NENE *et al.*, 2012). *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* penetra nas raízes do hospedeiro, alcança o córtex e, posteriormente, os vasos do xilema onde se reproduz e libera enzimas que degradam as células, interferindo no transporte de água da planta. Em consequência, ocorre o amarelecimento das folhas com posterior necrose, murcha e morte da planta (SINGH *et al.*, 2007). Contudo os sintomas reflexos causados por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* em grão-de-bico também podem ser observados em plantas infectadas com outros patógenos, o que pode confundir o diagnóstico da doença (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Um complexo de fungos de solo associados à murcha e podridão radicular do grão-de-bico são conhecidos por agir isolados, causando doenças específicas, ou em conjunto, sendo difíceis de serem diferenciados com base em sintomas (HARVERSON, 2011). Além de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*,

fazem parte desse complexo: *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora megasperma*, *F. solani*, *F. solani* f. sp. *pisi* (F.R. Jones) W.C. Snyder & H.N. Hansen, *F. eumartii* C.W.Carp., *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium redolens* (ANDRABI *et al.*, 2011; HARVESON, 2011; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011; NENE *et al.*, 2012; TRAPERO-CASAS; JIMÉNEZ DÍAZ, 1985; WESTERLUND *et al.*, 1973)

No Brasil, a produção de grão-de-bico é insuficiente para atender à demanda nacional, que é abastecida com grãos importados vindos do México, do Chile e da Turquia (NASCIMENTO; PESSOA; GIORDANO, 1998). O país não apresentava nenhuma área comercial da cultura até 2011 (ARTIAGA, 2012). No entanto, há áreas experimentais de instalação de cultivo comercial no município de Cristalina-GO e em Montes Claros-MG desde 2012. Embora a cultura seja pouco expressiva no país, já foi relatada a associação patogênica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* a plantas de grão-de-bico em áreas de cerrado do Distrito Federal (SHARMA; CERKAUSKAS, 1985; ARTIAGA *et al.*, 2012), e de fungos de solo incluindo *F. solani* em plantios de inverno na Região do Planalto Central (ARTIAGA, 2012). Com o cultivo sucessivo pode ocorrer o aumento da densidade do inóculo do patógeno no solo, o que leva ao avanço da gravidade da doença ao longo dos anos na área de plantio (ZOTE *et al.*, 1996).

A identificação correta do patógeno e o conhecimento sobre o comportamento da sua população são essenciais para projetar um programa de melhoramento genético efetivo e reduzir as elevadas perdas causadas por doenças (SIVARAMAKRISHNAN; KANNAN; SINGH, 2002). Estudos a respeito do patossistema *Fusarium* e grão-de-bico no Brasil são escassos, os quais são necessários para embasar pesquisas futuras nas áreas de fitopatologia e de melhoramento genético.

Nesse sentido, os objetivos desta pesquisa foram obter e identificar isolados de *Fusarium* associados a plantas de grão-de-bico, com base em características morfológicas e filogenéticas e avaliar a patogenicidade dos mesmos.



## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção de isolados de *Fusarium***

As amostragens foram realizadas no mês de julho de 2013, em área de cultivo comercial de grão-de-bico no município de Cristalina-GO, e em área experimental no campus da Universidade Federal de Minas Gerais, no município de Montes Claros-MG. Plantas de grão-de-bico de diferentes genótipos com sintomas aparentes da doença murcha de fusarium (amarelecimento, murcha e descoloração nos tecidos vasculares) foram coletadas, acondicionadas em sacos de papel e refrigeradas a 4 °C até serem utilizadas no processo de isolamento.

Os isolamentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Minas Gerais, campus Montes Claros-MG. Foram retirados fragmentos de tecido lesionado das raízes e do colo das plantas com sintoma da doença. Esses fragmentos foram submetidos a uma desinfestação superficial em álcool 70 % por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1 % por um minuto e três lavagens consecutivas em água destilada esterilizada. Posteriormente, foram transferidos para placas de petri contendo meio de cultura Ágar Água (AA) 1,5 % e para placas contendo uma camada de papel mata borrão esterilizado, umedecido com Ágar Água (AA) 1,5 %. Após 4 dias de incubação em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, fragmentos da periferia de colônias características de *Fusarium* foram transferidos para meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) para a obtenção de culturas puras.

### **2.2 Obtenção de culturas monospóricas e conservação dos isolados**

Para cada isolado obtido, um disco de micélio de 4 mm de diâmetro, contendo conídios, foi retirado de colônia pura e transferido para um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril (ADE). O disco foi agitado

dentro do tubo para colocar os conídios em suspensão. Alíquotas de 100  $\mu$ L da suspensão de conídios foram coletadas com uma micropipeta, plaqueadas em placas de 9 cm de diâmetro contendo meio AA 2 % e espalhadas em sua superfície. As placas foram incubadas durante 12 horas em BOD a 25°C. Sob microscópio estereoscópico, os conídios germinados foram coletados com uma agulha flambada e transferidos para placas contendo meio BDA. Essas foram mantidas em câmara BOD, para o desenvolvimento das colônias monoconidiais.

Os isolados obtidos foram conservados em água destilada esterilizada (CASTELLANI 1939) e em tubos de ensaio contendo meio BDA, os quais foram armazenados a 4 °C para estudos de identificação e patogenicidade. Dos 25 isolados obtidos, 14 foram selecionados (TAB. 1) para a caracterização morfológica e molecular e esses foram criopreservados em suspensão de esporos, 15 % glicerol, mantidas a -80 °C (SMITH; ONIONS, 1994) na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

TABELA 1

Isolados de *Fusarium* spp. obtidos de plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) de diferentes cultivares no estado de Minas Gerais e Goiás

Espécie	Código	Código <sup>2</sup> CML	Amostra/cultivar	Origem
<i>F. oxysporum</i>	<sup>1</sup> FCA 01	2865	Cícero	Cristalina-GO
<i>F. oxysporum</i>	FCA 02	2866	Amostra 14/Cícero	Montes Claros-MG
<i>F. oxysporum</i>	FCA 07	2867	Amostra 12/ CNPH 0233	Cristalina-GO
<i>F. oxysporum</i>	FCA 11	2869	Amostra 6/ Cícero	Cristalina-GO
<i>F. oxysporum</i>	FCA 13	2871	Amostra 9/Jamu 96	Cristalina-GO
<i>F. oxysporum</i>	FCA 15	2872	Amostra 9/ Jamu 96	Cristalina-GO
<i>F. oxysporum</i>	FCA 21	2874	Amostra 1/ CNPH 0334	Cristalina-GO
<i>F. oxysporum</i>	FCA 22	2875	Amostra 3/ CNPH 0334	Cristalina-GO
<i>F. oxysporum</i>	FCA 24	2876	Amostra 5/ Cícero	Cristalina-GO
<i>F. oxysporum</i>	FCA 26	2877	Amostra 2/ CNPH 0334	Cristalina-GO
<i>F. oxysporum</i>	FCA 27	2878	Amostra 8/ Cícero	Cristalina-GO
<i>F. solani</i>	FCA 10	2868	Amostra 7/ Cícero	Cristalina-GO
<i>F. solani</i>	FCA 12	2870	Amostra 11/ Jamu 96	Cristalina-GO
<i>F. solani</i>	FCA 19	2873	Amostra 10/ Jamu 96	Cristalina-GO

**Notas:** <sup>1</sup>FCA-Fusarium *Cicer arietinum*. <sup>2</sup> CML-Coleção Micológica de Lavras.

**Fonte:** Da autora.

### 2.3 Morfotipagem dos isolados

A identificação morfológica dos isolados foi feita por meio de caracteres macroscópicos e microscópicos descritos por Gerlach e Nirenberg (1982) e Leslie e Summerell (2006).

Para a caracterização morfológica, os isolados foram cultivados em placas de petri contendo meio BDA e incubados a 25°C no escuro por 4 dias em triplicata para avaliação da taxa de crescimento. A pigmentação da colônia e a formação do micélio aéreo foram observadas após incubação por 10-14 dias em meio BDA a 20°C com fotoperíodo de 12 horas de luz branca

florescente + luz negra. Em meio SNA (*synthetic nutrient-poor agar*) com folha de cravo, sob as mesmas condições anteriores, foram observadas características micromorfológicas, como: tamanho, formato e septação de microconídios e macroconídios; produção de conídios em falsas cabeças; presença e coloração de esporodóquios e tipo e tamanho de fiáldes e clamidósporos. Para cada estrutura caracterizada, foram tomadas 30 medidas com o auxílio de microscópio óptico.

## 2.4 Extração de DNA e análise filogenética dos isolados

Os isolados foram crescidos em meio líquido Malte 2 % por três dias sob agitação de 100 rpm e tiveram o DNA extraído pelo kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega). Posteriormente, foi realizada a amplificação da sequência do gene *EF-1 $\alpha$*  utilizando os *primers* EF1-F (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e EF2-R (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'), descritos por O'Donnell *et al.* (1998). Os produtos da PCR foram purificados por meio do kit Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). As amostras foram sequenciadas pela empresa Macrogen. Os eletroferogramas recebidos foram analisados visualmente com o auxílio do software SeqAssem (HEPPERLE, 2004). As sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, do *National Center for Biotechnological Information* – NCBI, por meio do programa *Alignment Search Tool Basic Local* – BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Com base nos resultados do BLAST foram realizadas análises filogenéticas para cada espécie encontrada. Sequências dos isolados de *F. solani* foram comparadas com as sequências das linhagens filogenéticas do complexo *F. solani* - FSSC (O'DONNELL *et al.*, 2008) . Os isolados de *F. oxysporum* foram comparados com as sequências das linhagens filogenéticas do complexo *F. oxysporum* - FOSC (O'DONNELL *et al.*, 2009) e sequências de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* - NRRL 32153, NRRL 32154, NRRL 32155, NRRL 32156 (GURJAR *et al.*, 2009). Alinhamentos múltiplos das sequências foram gerados utilizando-se o software CLUSTALW

implementado pelo software Mega 5 (TAMURA *et al.*, 2011). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente. A análise foi realizada com o software MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011), utilizando o método de Máxima Parcimônia.

## 2.5 Avaliação da patogenicidade dos isolados

Para o teste de patogenicidade, foram realizados dois experimentos com metodologias diferentes e separados no espaço e no tempo. Ambos foram conduzidos no ICA-UFMG em Montes Claros-MG

O primeiro experimento foi conduzido em casa de vegetação durante os meses de dezembro de 2013 a janeiro de 2014. Os isolados de *Fusarium* obtidos, conforme descrito anteriormente, foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados por 15 dias no escuro sob temperatura de 25 °C. Foram adicionados 20 mL de água destilada estéril às placas de cultivo e os conídios foram suspensos com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, a suspensão de esporos foi filtrada em gaze, quantificada e a concentração ajustada para  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, empregando-se câmara de Neubauer e microscópio óptico no aumento de 40x. Acrescentou-se uma gota de Tween 80 a cada 100 mL de suspensão. Plantas de grão-de-bico cv. Cícero com 7 dias de idade, produzidas previamente em bandejas de polipropileno com substrato comercial, tiveram suas raízes feridas com um bisturi e imersas, separadamente, por 10 minutos em 200 mL da suspensão de conídios de cada isolado de *Fusarium*. Em seguida, as plantas foram transplantadas para vasos de 700 mL contendo solo autoclavado na proporção 1:1 (solo/areia). Para cada isolado, foram inoculadas vinte plantas (repetições). O controle consistiu-se de plantas feridas não inoculadas com *Fusarium*. Foram consideradas plantas doentes aquelas que apresentaram sintomas de murcha e/ou amarelecimento. A incidência da doença foi avaliada semanalmente durante 42 dias (6 semanas). A agressividade dos isolados foi mensurada pelo aumento da incidência por semana, ao longo do período de avaliação.

O segundo experimento foi conduzido em casa de vegetação durante os meses de setembro e novembro de 2014. Os isolados de *Fusarium* foram cultivados durante 15 dias em meio BDA a 25 °C. Posteriormente, dez colônias com 9 cm de cada isolado foram homogeneizadas em 1 L de água com o auxílio de liquidificador. Uma amostra de cada suspensão foi retirada para a análise de unidades formadoras de colônias (UFC). A partir de cada amostra, procederam-se diluições seriadas na base 10 até 10<sup>-5</sup>. Aliquotas de 0,1 mL das diluições 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> foram plaqueadas em meio de cultura BDA + rifamicina (0,2 % v/v), em triplicata, sendo espalhadas uniformemente com alça de Drigalsky. As colônias crescidas após 48 horas em temperatura de 25 °C foram quantificadas. O cálculo do número de microrganismos em UFC.mL<sup>-1</sup> foi resultante do número de colônias x diluição da amostra x 10.

A suspensão obtida de cada isolado foi misturada em substrato composto de solo e areia (2:1) na proporção de 100 mL/kg. Em seguida, o substrato foi colocado em vasos de 700 mL. Para cada isolado, foram utilizados 16 vasos, onde em oito deles foi feito o transplântio de mudas de grão-de-bico, com sete dias de idade, com as raízes feridas. Nos outros, foram colocadas duas sementes de grão-de-bico por vaso e não foi feito nenhum ferimento nas raízes das plantas desenvolvidas. O controle consistiu-se de plantas e de sementes desenvolvidas em solo não inoculado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Após seis semanas, as plantas foram retiradas dos vasos, seccionadas transversalmente e verificadas quanto à ocorrência de podridão de raízes e escurecimento do tecido vascular. Nos vasos onde ocorreu a germinação das duas sementes, somente uma das plantas, escolhida ao acaso, foi levada em consideração na avaliação. A incidência de doença foi avaliada conforme equação descrita anteriormente.

## 2.6 Análise dos dados

Os dados referentes à taxa de crescimento de *F. solani* e *F. oxysporum* foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SAEG 9.1.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Morfotipagem dos isolados

Dos 14 isolados de *Fusarium* caracterizados, obtidos de grão-de-bico, 11 apresentaram marcadores morfológicos típicos de *F. oxysporum* e três de *F. solani*, conforme descrições de Gerlach e Nirenberg (1982) e Leslie e Summerell (2006). Os isolados identificados como *F. oxysporum* apresentaram características macromorfológicas bastante variáveis (TAB. 2). A taxa de crescimento em BDA variou de 9,7 a 14,4 mm/dia. Todos os isolados apresentaram micélio aéreo esparso e cotonoso com coloração branca ou creme. A pigmentação no verso da colônia variou entre as cores violeta, azul, e creme. Essa variabilidade na morfologia também foi verificada entre isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (DUBEY *et al.*, 2010; HONNAREDDY; DUBEY,2007; MANDHARE *et al.*, 2011).



TABELA 2

Caracterização morfológica de isolados de *Fusarium oxysporum* e de *Fusarium solani*

Isolados	<sup>1</sup> Taxa de crescimento (mm/dia)	<sup>2</sup> Coloração da cultura	<sup>3</sup> Macroconídios		<sup>3</sup> Microconídios		<sup>3</sup> Clamidósporos
		Frente/verso	Comp/larg (µm)	septos	Comp/larg (µm)	septos	Diâmetro médio (µm)
<b><i>F. oxysporum</i></b>							
FCA 01	11,1 d*	Branco/Violeta	18-47 x 2-4	3-7	4-16 x 1,5-3	0-1	5-9,5
FCA 02	12,1 c	Branco/Violeta	19-34 x 2-4	2-4	5-18 x 1,5-3	0-1	5-11
FCA 07	11,7 c	Branco/Azul	27-47 x 2,5-5	3-6	4-10 x 1,5-2	0-1	5-8,75
FCA 11	12,8 b	Creme/Creme	29-42 x 3,5-4	3-5	3-12 x 1,5-2	0-1	5,5-10
FCA 13	13,0 b	Branco/Violeta	22-55 x 2,5-4	3-7	4-16 x 1,5-3	0-1	5,5-9,5
FCA 15	12,9 b	Creme/ Violeta	27-36 x 3-4	2-5	3-19 x 1,5-2,5	0-1	5-9,5
FCA 21	10,5 d	Branco/Violeta	31-53 x 3-4	3-6	5-20 x 1,5-3	0-1	3-12
FCA 22	9,7 e	Branco/Violeta	25-55 x 2,5-4	3-5	4,5-17 x 1,5-3	0-1	3,5-10
FCA 24	13,2 b	Branco/Creme	23-46 x 2-3,5	3-5	4-17 x 1,5-2,5	0-1	4,5-10
FCA 26	14,4 a	Branco/Azul	27-42 x 3-3,5	3-5	3-16 x 1-2,5	0-1	5-13,5
FCA 27	10,6 d	Branco/Violeta	17-31 x 3-4	3	4-16 x 1,5-3	0-1	4-15
<b><i>F. solani</i></b>							
FCA 10	10,1 e	Branco/Marron	21-50 x 4-5	3-5	3-26 x 1,5-5	0-2	4-8,5
FCA 12	10,7 d	Branco/Marron	23-45 x 4-5	3-4	6-24 x 2-4	0-2	5-10,5
FCA 19	9,9 e	Branco/Marron	22-51 x 3,5-5	3-5	7-27 x 2-4	0-2	5-10,5

**Notas:** <sup>1</sup>Diâmetro médio da colônia obtido após 4 dias de crescimento em BDA a 25 °C no escuro.

<sup>2</sup>Obtida após 14 dias de crescimento em BDA a 20°C/fotoperíodo de 12 horas de luz branca + luz negra.

<sup>3</sup>Caracterizados após crescimento por 14 dias em SNA a 20°C/fotoperíodo de 12 horas de luz branca.

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott p<0,05.

**Fonte:** Da autora.

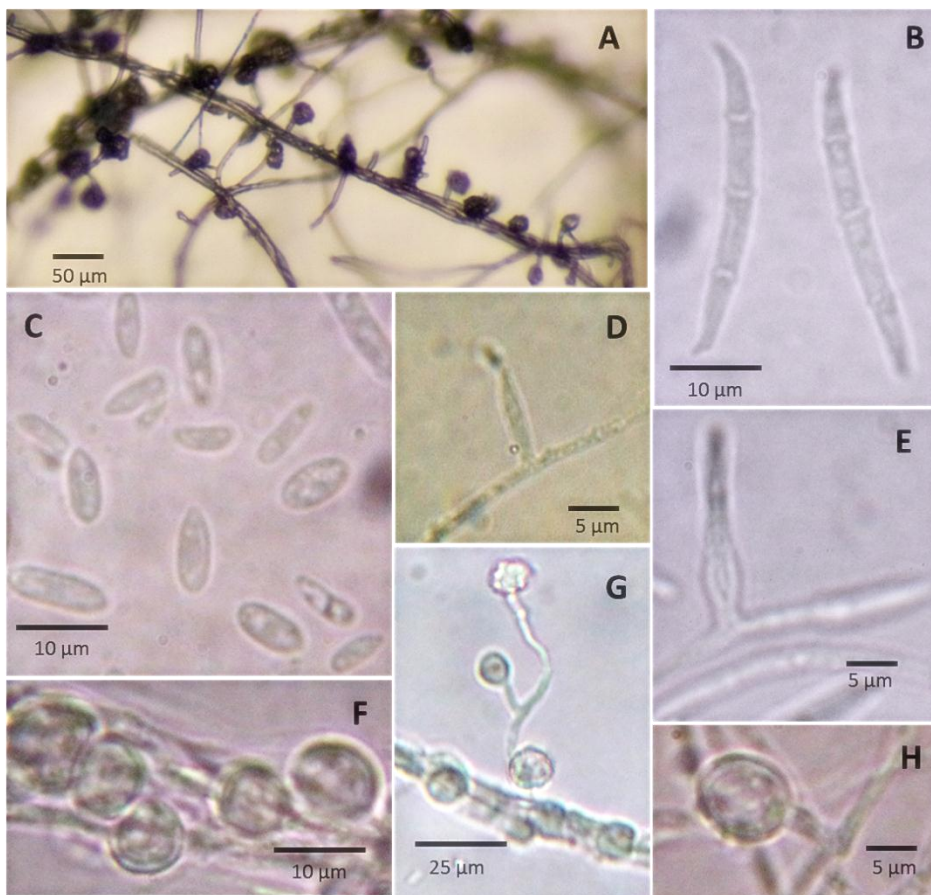
Ao contrário dos isolados de *F. oxysporum*, características de coloração e taxa de crescimento e até mesmo de medidas micromorfológicas nos isolados de *F. solani* variaram muito pouco. Todos os isolados apresentaram micélio aéreo cotonoso e branco com pigmentação marrom no verso da colônia. A taxa de crescimento variou de 9,9 a 10,7 mm/dia. Somente o isolado FCA 10 apresentou micélio ralo com abundantes esporodóquios de coloração creme no centro da colônia.

Em relação à taxa de crescimento, os isolados caracterizados foram divididos em cinco grupos (TAB. 2), sendo o isolado FCA 26 correspondente ao grupo de crescimento mais rápido (a) e os isolados FCA 10, FCA 19 e FCA 22 correspondentes ao grupo de crescimento mais lento (e). Embora essas diferenças tenham sido observadas, crescimento micelial acima de 20 mm no quarto dia é um marcador morfológico utilizado para identificar tanto *F. oxysporum* quanto *F. solani* (BOOTH, 1977). Portanto, não foi possível a distinção das espécies com base nesse parâmetro. A coloração de colônias é considerada uma característica subjetiva, pois está sujeita à variação do ambiente e à percepção do avaliador.

A partir de culturas em meio SNA com folha de cravo, foram caracterizadas as estruturas micromorfológicas, determinando-se as dimensões dos macroconídios, microconídios e clamidóporos de cada isolado (TAB. 2).

Nos isolados de *F. oxysporum*, observou-se, no micélio aéreo, a produção de microconídios agregados em falsas cabeças sobre fiálides curtas (FIG. 1A). Os microconídios apresentaram formas variadas (oval, clavada, cilíndrica e reniforme), com um ou nenhum septo e dimensões médias de 3-20 x 1-3  $\mu\text{m}$  (FIG. 1C). As células conidiogênicas observadas foram monofiálides, simples, curtas, geralmente com formato de garrafa e com comprimento variando de 4-32  $\mu\text{m}$  (FIG. 1D; E). Os macroconídios apresentaram-se com dimensões de 17-55 x 2-5  $\mu\text{m}$ , com formato falcado a quase reto, com a célula basal em forma de pé e célula apical curvada em forma de gancho (FIG. 1B). Revelaram septação variando de 2 a 7, mas a maioria com 3 septos. Os macroconídios foram encontrados sendo

produzidos abundantemente em esporodóquios de coloração esbranquiçada ou alaranjada, e em menor quantidade no micélio aéreo. Os isolados FCA 02, FCA 22 e FCA 27 não apresentaram a formação de esporodóquios. Todos os isolados apresentaram clamidósporos globosos de paredes lisas ou rugosas, formados na hifas de forma intercalar, terminal ou superficial. Foram, em geral, encontrados aos pares, em aglomerados, em cadeia curtas ou mesmo solitários (FIG. 1F- H).

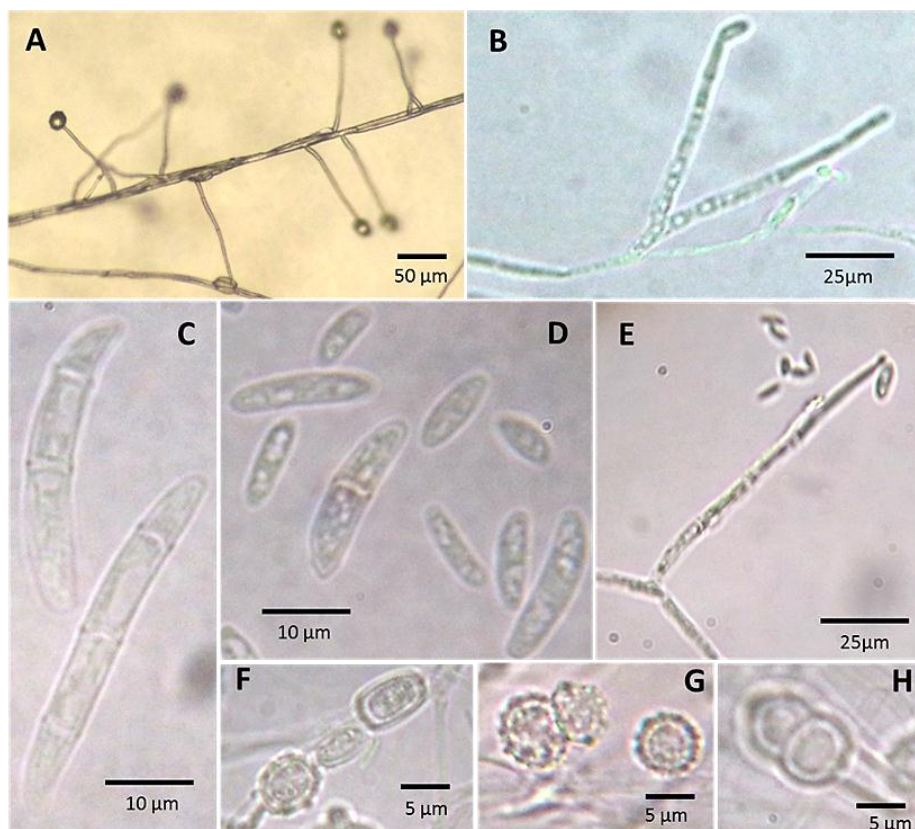


**FIGURA 1-** Características morfológicas dos isolados de *Fusarium oxysporum* obtidos de grão-de-bico:  
 A) Falsas cabeças sobre fiálides curtas  
 B) Macroconídios  
 C) Microconídios  
 D-E) Conidióforo simple  
 F-H) Clamidósporos.

**Fonte:** Da autora.

Nos isolados de *F. solani*, foi observada uma produção de macro de e micronídios em falsas cabeças sobre longas monofiálides (22,5-172,5 µm de comprimento) presentes no micélio aéreo (FIG. 2A; E). Essa característica é um dos principais marcadores morfológicos utilizados para diferenciar espécies de FSSC das espécies de FOSSC (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Conidióforos ramificados no micélio aéreo também foram observados (FIG. 2B). Todos os isolados de *F. solani* apresentaram esporodóquios em abundância com coloração creme a alaranjado pálido. Os macroconídios produzidos no esporodóquio se mostraram maiores que os produzidos no micélio aéreo. No geral, os macroconídios apresentaram 3-5 septos, formato cilíndrico levemente curvado, com célula basal em forma de pé (nem sempre evidente) e célula apical arredonda (FIG. 2C). Foram observados micronídios com 0-2 septos e formatos variando entre globoso, fusiformes, cilíndricos e reniforme (FIG. 2D). Tanto os macro quanto os microconídios de *F. solani* foram mais robustos e apresentam parede mais espessa que os de *F. oxysporum*. As dimensões encontradas foram de 21-51 x 3,5-5 µm para macroconídios e de 3-27 x 1,5-5 µm para microconídios. Todos os isolados de *F. solani* produziram clamidósporos com o mesmo formato e disposição dos encontrados em *F. oxysporum* (FIG. 2F-H), porém foi observado maior frequência de clamidósporos rugosos e com rugosidade mais aparente. O diâmetro médio dos clamidósporos variou de 4-10,5 µm.



**FIGURA 2 -** Características morfológicas dos isolados de *Fusarium solani* obtidos de grão-de-bico:

- A) Falsas cabeças sobre fiálides longas
- B) Conidióforo ramificado
- C) Macroconídios
- D) Microconídios
- E) Fiálide simples
- F-H) Clamidósporos.

**Fonte:** Da autora.

Não foi verificada relação entre as características macro e micromorfológicas ou qualquer marcador morfológico que ajudasse a estratificar os isolados dentro de cada morfotipo identificado. O número limitado de caracteres morfológicos existentes muitas vezes não é suficiente para expressar a grande diversidade existente dentro do gênero *Fusarium* (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Espécies que compartilham a mesma

morfologia podem representar espécies filogenéticas distintas (ODONNELL, 2000).

### 3.2 Filogenia dos isolados

As sequências do gene *EF-1 $\alpha$*  procedentes dos isolados de *Fusarium* spp. e comparadas com a base de dados NCBI validaram a identificação morfológica para cada isolado (TAB. 3). Para cada espécie encontrada, foram feitas as análises filogenéticas.

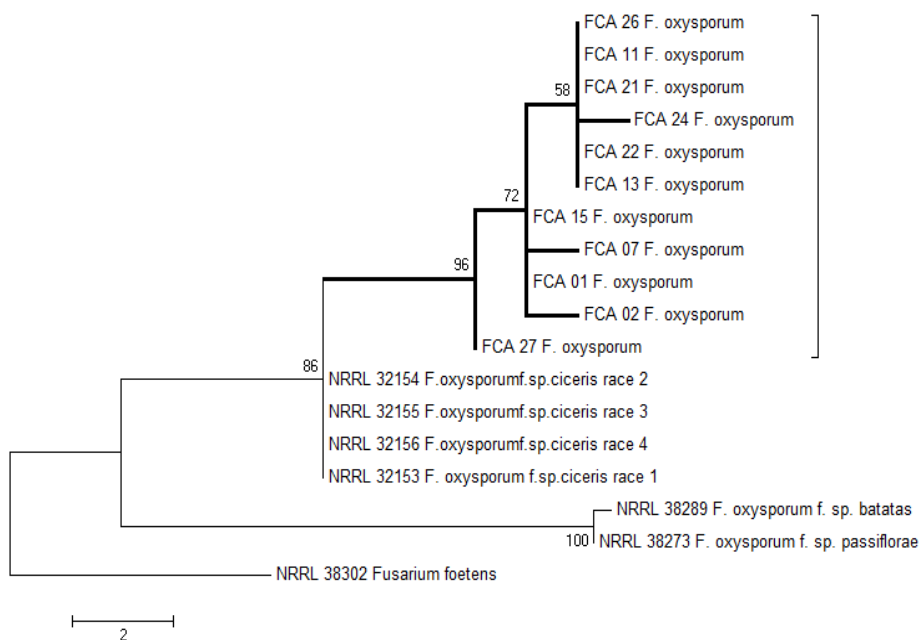
**TABELA 3**

Identificação molecular dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de grão-de-bico com base em sequências do gene *EF-1 $\alpha$* .

Código do isolado	Resultado Blast
FCA 0	<i>F. oxysporum</i>
FCA 02	<i>F. oxysporum</i>
FCA 07	<i>F. oxysporum</i>
FCA 10	<i>F. solani</i>
FCA 11	<i>F. oxysporum</i>
FCA 12	<i>F. solani</i>
FCA 13	<i>F. oxysporum</i>
FCA 15	<i>F. oxysporum</i>
FCA 19	<i>F. solani</i>
FCA 21	<i>F. oxysporum</i>
FCA 22	<i>F. oxysporum</i>
FCA 24	<i>F. oxysporum</i>
FCA 26	<i>F. oxysporum</i>
FCA 27	<i>F. oxysporum</i>

Na análise filogenética gerada, os isolados de *F. oxysporum* (FCA 01, FCA 02, FCA 07, FCA 11, FCA 13, FCA 15, FCA 21, FCA 22, FCA 24, FCA 26 e FCA 27) agruparam em um clado separado dos isolados de *F.*

*oxysporum* f. sp. *ciceris* (GURJAR *et al.*, 2009) com suporte de *bootstrap* de 96 % (FIG. 3). *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* é um dos principais patógenos do grão-de-bico em todo o mundo (SINGH *et al.*, 2007), o qual é uma espécie de origem monofilética (DEMERS, GARZÓN; JIMÉNEZ-GASCO, 2014; JIMÉNEZ-GASCO *et al.*, 2002), que pode ser transmitido por sementes (PANDE *et al.*, 2007). Esse resultado evidencia que diferentes linhagens filogenéticas de FOSC são capazes de parasitar o mesmo hospedeiro. Porém esse trabalho não fornece subsídios suficientes para afirmar que a linhagem formada pelos isolados de *F. oxysporum* de grão-de-bico é uma espécie filogenética distinta dentro de FOSC.



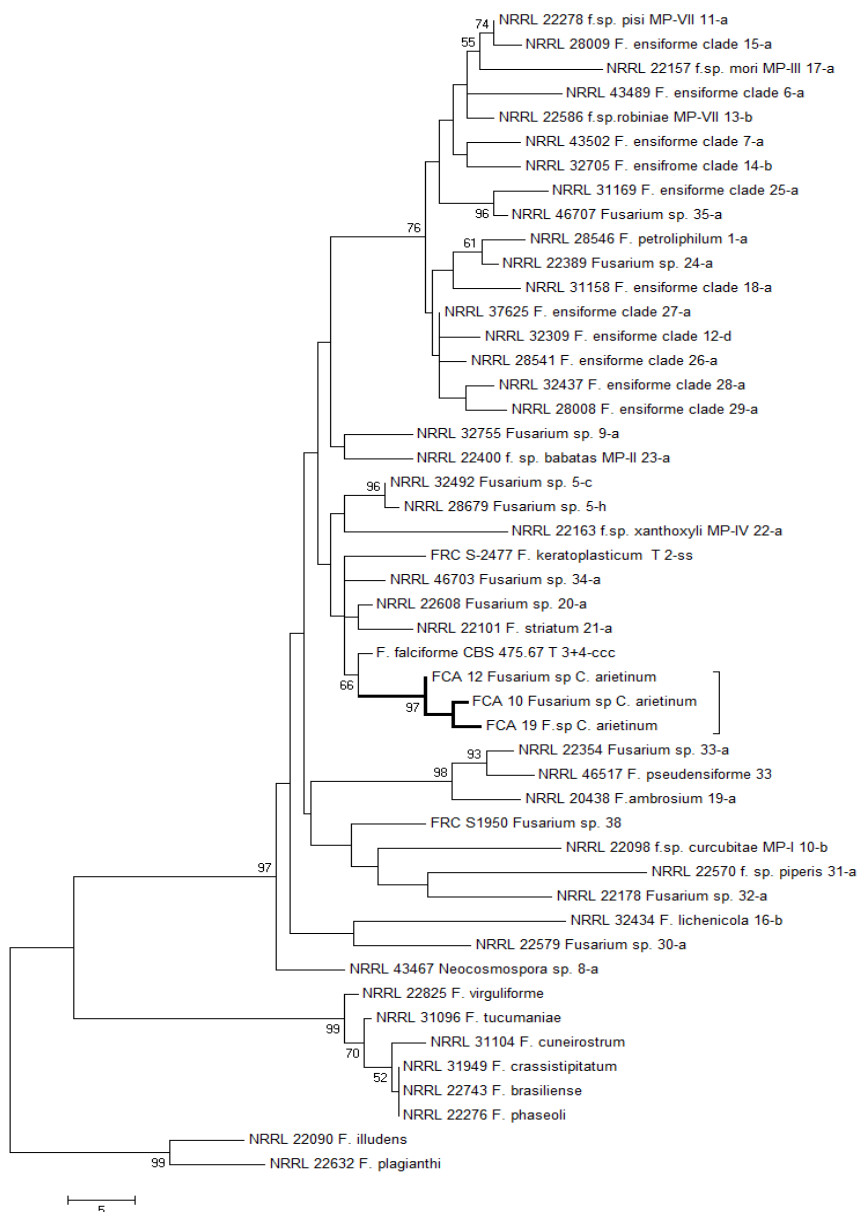
**FIGURA 3 -** Filograma de máxima parcimônia para o gene *EF-1α* de linhagens do complexo *Fusarium oxysporum*, incluindo isolados de grão-de-bico do Brasil. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem acima dos internódios. Essa árvore tem como raiz *F. foetens* NRRL38302.

**Fonte:** Da autora



Os isolados de *F. solani* obtidos de grão-de-bico foram analisados e também formaram uma diferente linhagem dentro de FSSC. Estudos filogenéticos comprovaram que o complexo *F. solani* é distinto e composto de 3 grandes clados. O clado 1 é representado apenas pelas espécies *F. illudens* e *F. plagianthi*, provenientes da Nova Zelândia; o clado 2 compreende patógenos da soja e do feijão que ocorrem na América do Sul, e o clado 3 é o maior e mais diverso, onde estão incluídas espécies associadas ao solo, além de outros patógenos de plantas, incluindo *mating populations* e espécies de importância clínica (O'DONNELL, 2000; O'DONNELL *et al.*, 2008). Na análise filogenética, os isolados de *F. solani* (FCA10, FCA12 e FCA19) agruparam-se juntos, com *bootstrap* de 97 %, no clado 3, tendo como grupo irmão o *holotype* de *F. falciforme* CBS 475-67, linhagem FSSC 3+4 (FIG. 4). *F. falciforme* se trata de um grupo diverso ainda não resolvido filogeneticamente, associado a solos e a infecções humanas (O'DONNELL *et al.*, 2008; NALIM *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos rejeitam a hipótese inicial de que as espécies patogênicas à soja descritas por Aoki *et al.* (2005), representadas no clado 2, estivessem também causando doença em grão-de-bico, visto que o cultivo de soja antecedeu o cultivo de grão-de-bico no local onde os isolados foram obtidos. A espécie *F. solani* f.sp. *pisi*, que é associada à podridão radicular do grão-de-bico (HASANZADE, *et al.*, 2008; WESTERLUND; CAMPBELL; KIMBLE, 1974), também não apresentou relações filogenéticas com os isolados estudados.

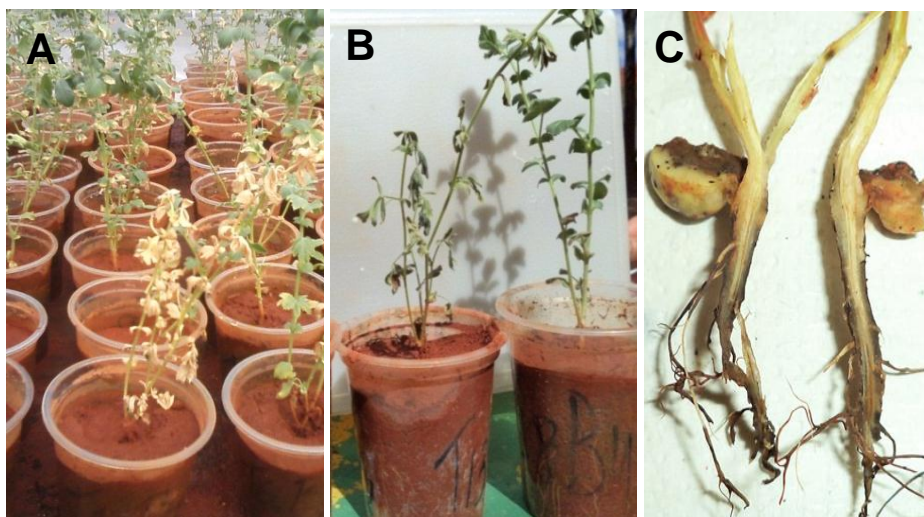


**FIGURA 4 -** Filograma de máxima parcimônia para o gene *EF-1α* de linhagens do complexo *Fusarium solani*, incluindo isolados de grão-de-bico do Brasil. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são indicados em porcentagem acima dos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. plagianthi* NRRL22632 e *F. illudens* NRRL22090.

**Fonte:** Da autora.

### 3.3 Patogenicidade dos isolados de *Fusarium*

No teste patogenicidade onde se feriu o sistema radicular (experimento 1), todos os isolados testados de *F. oxysporum* e de *F. solani* foram patogênicos ao grão-de-bico e apresentaram sintomas já na primeira semana após inoculação (FIG. 5). No entanto, quando o teste de patogenicidade foi feito com plantas com ferimento ou sementeira direta (experimento 2), não foram observados sintomas de fusariose durante as 6 semanas de avaliação, mas apenas necrose e escurecimento dos vasos do sistema radicular (FIG. 6; 7). Os isolados de *F. oxysporum* apresentaram maior incidência da doença e agressividade em relação aos isolados de *F. solani*, quando as raízes foram feridas antes da inoculação (GRAF. 1). Com exceção do isolado FCA 22, todos os demais isolados foram capazes de parasitar e causar doença nas plantas, independentemente da metodologia utilizada, do transplante ou da sementeira direta (TAB. 4). Os resultados não evidenciaram relação entre a quantidade de inóculo colocada no solo e a incidência de doença.



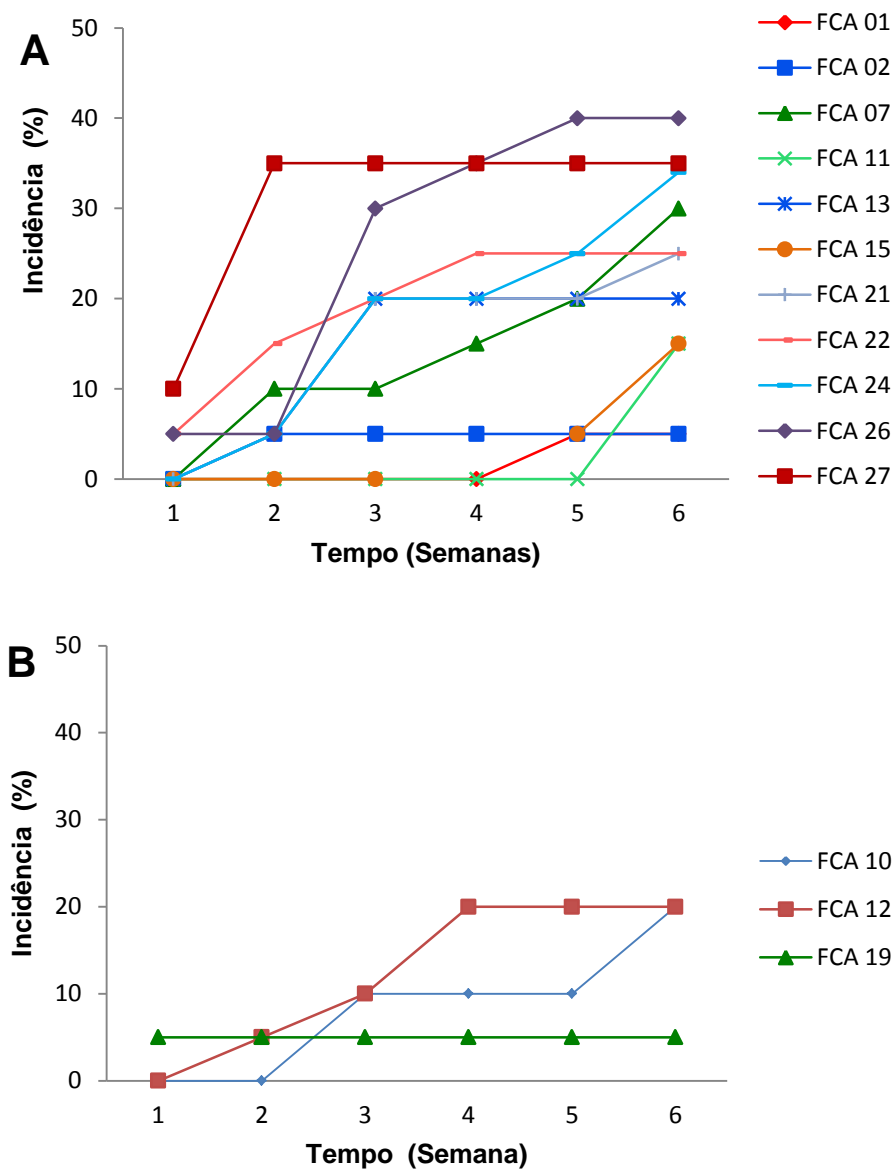
**FIGURA 5 -** Sintomas causados por *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* em plantas de gão-de-bico cv. Cícero:  
 A) Planta com amarelecimento  
 B) Planta com murcha (esquerda) ao lado de planta sadia  
 C) Planta com podridão radicular.

**Fonte:** Da autora.

Nas plantas com ferimento radicular e inoculadas (Experimento 1), os sintomas iniciais foram amarelecimento rápido a partir do limbo foliar, com posterior seca e morte das plantas (FIG. 5A). Muitas chegaram a murchar e secar mesmo antes de começarem a amarelecer (FIG. 5B). Após a verificação do sistema radicular, as raízes estavam completamente apodrecidas ou apresentavam escurecimento dos tecidos internos, mas não necessariamente nos feixes vasculares (FIG. 5C). Nessas plantas, não foram observados sintomas que pudessem distinguir as espécie de *F. solani* de *F. oxysporum*. A partir desses tecidos afetados, foi feito o reisolamento. Os fungos reisolados apresentaram as mesmas características morfológicas dos fungos inoculados, completando, assim, os postulados de Koch. As plantas controle não apresentaram sintomas de fusariose.

A incidência da doença iniciou-se já na primeira semana para os isolados de *F. oxysporum*, com aumento crescente da agressividade até a sexta semana (GRAF. 1A). Os isolados variaram em agressividade de acordo

com a velocidade com que causaram doenças, sendo o isolado FCA 27 o mais agressivo, causando alta incidência de doença já na segunda semana após a inoculação, enquanto os isolados FCA 01, FCA 02, FCA 11 e FCA 15 foram os menos agressivos. Os isolados FCA 07, FCA 13, FCA 21, FCA 22 e FCA 24 apresentaram agressividade intermediária (GRAF. 1A). Já para *F. solani*, os isolados FCA10 e FCA12 apresentaram aumento na incidência e na agressividade a partir da segunda semana de inoculação, com exceção do isolado FCA 19, que permaneceu constante (GRAF. 1B). Esses resultados mostram que isolados de uma mesma espécie podem variar em agressividade, mesmo sendo obtidos de uma mesma cultura e região geográfica. Diferenças entre espécies ou entre isolados da mesma espécie podem ser resultado de fatores genéticos (PEREIRA *et al.*, 2006). Jiménez-Gasco *et al.* (2004) relataram que as diferenças entre a agressividade de cepas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* pode ser explicada pela existência de diferentes patotipos e raças do patógeno.



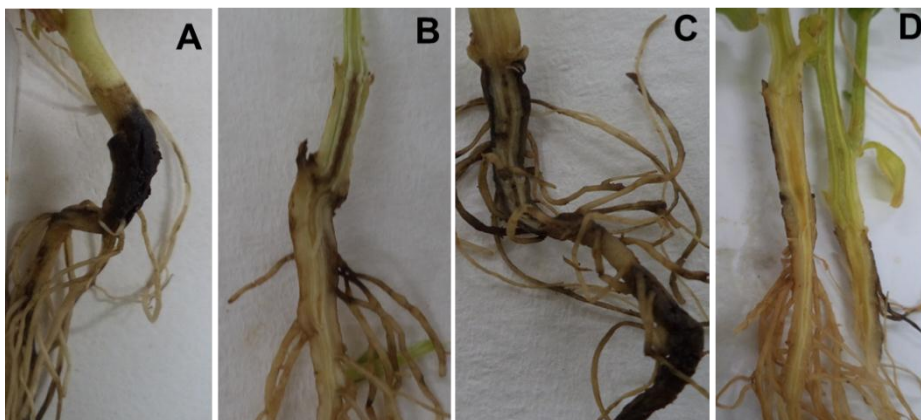
**GRÁFICO 1-** Curva de progresso de fusariose em plantas de grão-de-bico cv. Cícero em função dos isolados avaliados:  
 A) De *Fusarium oxysporum*  
 B) De *Fusarium solani*.

**Fonte:** Da autora.

Westerlund *et al.* (1974) utilizaram a mesma metodologia de ferimento e observaram sintomas de *F. solani* aos 10 e 14 dias, enquanto, para *F. oxysporum* foi aos 14 e 21 dias após a inoculação de mudas de grão-de-bico. Esses autores observaram também que, embora plantas de grão-de-bico inoculadas com *F. oxysporum* e *F. solani* apresentassem sintomas similares na parte aérea, os sintomas internos e abaixo do solo eram distintos para *F. oxysporum* (descoloração vascular) e *F. solani* (podridão negra nas raízes sem descoloração vascular). Em outro estudo, Trapero-Casas e Jiménez-Díaz (1985) relataram que isolados de *F. oxysporum*, além de causarem amarelecimento e murcha foliar associados a descoloração vascular em plantas de grão-de-bico, também causaram podridão de raízes e do colo. Na presente pesquisa, os sintomas das plantas inoculadas com as espécies estudadas também não apresentaram quadro sintomatológico de diferenciação. Portanto, nem sempre a sintomatologia causada pelo patógeno é distinta, o que torna difícil o diagnóstico do agente etiológico somente com parâmetros visuais.

Quando as mudas feridas foram transplantadas ou feita a semeadura direta e o substrato infestado com *Fusarium* (experimento 2), no final da sexta semana, todas as plantas de grão-de-bico estavam aparentemente saudáveis, com as folhas verdes, não demonstrando nenhum sinal de amarelecimento ou murcha. Porém, quando as raízes foram examinadas, observou-se que muitas plantas apresentaram o tecido radicular enegrecido, com necrose aparente ou escurecimento dos vasos condutores (FIG. 6; 7). Nesse experimento, também comprovou-se o teste de patogenicidade após reisolamento dos isolados de *F. solani* e *F. oxysporum* e ausência de doença nas plantas controle. Partindo desse princípio, pode-se confirmar que todos os isolados de *F. oxysporum*, quanto de *F. solani* foram patogênicos ao grão-de-bico, causando incidências que variaram entre os isolados e a metodologia utilizada (TAB. 4). Os resultados mostram que nem sempre plantas de grão-de-bico doentes exteriorizam sintomas, o que pode dificultar a adoção de medidas de controle e permitir a multiplicação do patógeno na área de cultivo. Segundo Zote *et al.* (1996), a incidência da murcha em

campos de cultivo aumenta consideravelmente a cada ano e sua gravidade está diretamente relacionada ao aumento da densidade do inóculo de patógenos de solo.



**FIGURA 6 -** Sintoma de necrose radicular e vascular em plantas de grão-de-bico cv. Cícero após a sexta semana da inoculação com isolados de *Fusarium oxysporum*:  
A-C) Plantas inoculadas;  
D) Testemunha não inoculada.

**Fonte:** Da autora





**FIGURA 7 -** Sintoma de necrose radicular e vascular em plantas de grão-de-bico cv. Cícero após a sexta semana da inoculação com isolados *Fusarium solani*:  
A-C) Plantas inoculadas  
D) Testemunha não inoculada.

**Fonte:** Da autora.

TABELA 4

Incidência de fusariose em plantas de grão-de-bico transplantadas ou semeadas diretamente em solo infestado com diferentes isolados de *Fusarium* spp. e cultivadas após seis semanas em casa de vegetação

ISOLADO	INCIDÊNCIA (%)		
	<sup>1</sup> UFC/mL Inoculadas no solo	<sup>2</sup> Semeadura	<sup>2</sup> Transplântio de plantas feridas
<b><i>F. oxysporum</i></b>			
FCA 01	1,43 x 10 <sup>6</sup>	37,5	12,5
FCA 02	4,33 x 10 <sup>6</sup>	50	87,5
FCA 07	8,27 x 10 <sup>6</sup>	37,5	12,5
FCA 11	5,07 x 10 <sup>6</sup>	12,5	37,5
FCA 13	1,18x 10 <sup>7</sup>	25	100
FCA 15	9,3 x 10 <sup>6</sup>	12,5	25
FCA 21	1,39 x 10 <sup>7</sup>	50	37,5
FCA 22	3,43 x 10 <sup>6</sup>	0	12,5
FCA 24	5,3 x 10 <sup>6</sup>	50	62,5
FCA 26	3,8 x 10 <sup>6</sup>	75	37,5
FCA 27	6,33 x 10 <sup>6</sup>	50	62,5
<b><i>F. solani</i></b>			
FCA 10	4.03 x 10 <sup>6</sup>	37,5	75
FCA 12	7,8 x 10 <sup>6</sup>	37,5	75
FCA 19	2,56 x 10 <sup>6</sup>	37,5	100
<b>Controle</b>		<b>0</b>	<b>0</b>

**Notas:**<sup>1</sup> Unidades Formadoras de Colônia.

<sup>2</sup> Total de oito plantas.

**Fonte:** Da autora.

As temperaturas observadas no período de condução dos dois experimentos de patogenicidade foram altas, quase não havendo variação entre as temperaturas médias (TAB. 05). Porém a umidade relativa do ar observada foi menor durante a condução do experimento 2 (meses de setembro e outubro). Dessa forma, a maior umidade, associada às altas temperaturas, pode ter favorecido os patógenos que agravaram o quadro sintomatológico da doença no experimento 1. Landa *et al.* (2006) observaram que a temperatura afeta a severidade e a taxa de desenvolvimento dos

sintomas da murcha de fusarium, bem como a expressão de resistência ou suscetibilidade de certos genótipos de grão-de-bico. Navas-Cortés *et al.* (2007) reportaram uma correlação positiva entre a temperatura do solo e a severidade da murcha-de-fusarium. Os resultados mostram que, além da temperatura, a umidade também pode influenciar o processo de desenvolvimento da doença.

**TABELA 5**

Médias de temperaturas (°C) máximas, mínimas e médias, umidade relativa do ar e precipitação no períodos dos experimentos de patogenicidade

		<b>T. Max</b>	<b>T. Min</b>	<b>T. Média</b>	<b>U.R (%)</b>	<b>Precipitação (mm)</b>
<b>Experimento 1</b>	Dez/ 2013	27,38	20,87	23,37	84,54	15,2
	Jan/2014	30,82	19,34	24,84	69,52	0,64
<b>Experimento 2</b>	Set/ 2014	31,77	17,2	24,57	49,92	0,17
	Out/2014	31,55	18,58	25,04	54,91	2,99

**Fonte:** Estação meteorológica do ICA/UFMG.

Praticamente todos os isolados foram capazes de parasitar e causar doença nas plantas, independentemente do ferimento feito (TAB. 4). Somente o isolado FCA 22 não conseguiu causar doença em plantas sem ferimento. Para a maioria dos isolados inoculados, incluindo todos os de *F. solani*, a incidência de doença foi maior em plantas feridas, o que ressalta a importância de se evitar danos às raízes das plantas durante os tratamentos culturais.

Nesse ensaio também não foi possível identificar sintomas que diferenciavam a doença causada por *F. oxysporum* da causada por *F. solani*. De acordo com Harverson (2011), essas espécies fazem parte de um complexo de fungos do solo que incluem outros patógenos, como: *Pythium* spp., *Phytophthora megasperma* e *Rhizoctonia solani*. Todos causam doenças no grão-de-bico, as quais são difíceis de serem diagnosticadas com base em sintomas. Dessa forma, o uso de ferramentas morfológicas e moleculares faz-se necessário para a identificação correta do patógeno.

#### 4 CONCLUSÃO

Não foram observados morfotipos distintos para os isolados de *F. oxysporum* e *F. solani* avaliados.

Há linhagens filogeneticamente distintas de *F. oxysporum* e *F. solani*, capazes de parasitar e causar doença em grão-de-bico.

Todos os isolados de *F. oxysporum* e *F. solani* foram patogênicos ao grão-de-bico cv. Cícero.

O isolado FCA 27 de *F. oxysporum* e FCA 12 de *F. solani* foram os mais agressivos em causar doença na planta hospedeira estudada.

### **CAPÍTULO 3: POTENCIAL ANTAGONISTA DE *Trichoderma* sp. A *Fusarium solani* E *Fusarium oxysporum* CAUSADORES DE PODRIDÃO RADICULAR EM GRÃO-DE-BICO**

#### **RESUMO**

O objetivo desta pesquisa foi selecionar isolados de *Trichoderma* sp. com o potencial antagonístico a *F. solani* e *F. oxysporum* causadores da podridão radicular em grão-de-bico, por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Isolados de *Trichoderma* sp. obtidos da rizosfera de plantas de grão-de-bico foram avaliados *in vitro* quanto ao antagonismo a isolados patogênicos de *F. solani* e *F. oxysporum*, por meio da competição em culturas pareadas e da produção de compostos orgânicos voláteis e não voláteis termoestáveis com atividade fungicida e/ou fungistática. No experimento de antagonismo em casa vegetação, quatro isolados de *Trichoderma* sp. selecionados foram avaliados isoladamente e combinados em comparação ao produto comercial Quality®. Os isolados de *Trichoderma* sp. foram eficientes competidores e produziram metabólitos voláteis capazes de inibir o crescimento micelial das duas espécies de *Fusarium* testadas. Os metabólitos não voláteis termoestáveis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram baixa atividade inibitória a *F. solani* e *F. oxysporum* e variaram quanto à sua ação. Apesar do efeito antagonista observado *in vitro* dos isolados de *Trichoderma* testados, os mesmos não controlaram a fusariose e nem promoveram o crescimento do grão-de-bico nas condições *in vivo* estudadas. Resultado similar foi observado também no controle.

**Palavras-chave:** *Cicer arietinum*. Fusariose. composto orgânicos voláteis. Antagonismo. Controle biológico.

### CHAPTER 3: ANTAGONIST POTENTIAL OF *Trichoderma* sp. AGAINST *Fusarium oxysporum* AND *Fusarium solani* CAUSING ROOT ROT IN CHICKPEA.

#### ABSTRACT

The aim of this study was to select isolates of *Trichoderma* sp. with the potential antagonistic to *F. solani* and *F. oxysporum* causing of the root rot disease in chickpea through experiments *in vitro* and *in vivo*. *Trichoderma* sp. Isolated obtained from the rhizosphere of chickpea plants were evaluated *in vitro* as to antagonism to pathogenic isolates of *F. solani* and *F. oxysporum* through competition in paired culture tests and of the production of volatile organic compounds and non-volatile thermostable with fungicidal and/or fungistatic activity. In the antagonism experiment in greenhouse four isolates of *Trichoderma* sp. selected were evaluated separately and combined as compared to the commercial product Quality®. The *Trichoderma* sp. were efficient competitors and produced volatile metabolites capable of inhibiting the mycelial growth of two species of *Fusarium* tested. The non-volatile thermostable metabolites produced by isolates of *Trichoderma* sp. showed a low inhibitory activity to *F. solani* and *F. oxysporum* and varied as their action. Despite the antagonistic effect observed *in vitro* of *Trichoderma* isolates tested, the same did not control fusarium neither promoted the chickpea growth in *in vivo* conditions studied. A similar result was also observed in the control.

**Keywords:** *Cicer arietinum*. *Fusarium*. Volatile organic compound. Antagonism. Biological control.



## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium* envolve fungos cosmopolitas, habitantes do solo e abundantes em regiões temperadas e tropicais. Muitas espécies são importantes patógenos de plantas cultivadas, causando sérios danos econômico ao setor agrícola (LESLIE; SUMMEREL, 2006).

Na cultura do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), duas importantes doenças causadas por *Fusarium* sp. são conhecidas: a murcha de fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* e a podridão negra da raiz, causada por *Fusarium solani*. Ambas espécies encontram-se presentes em vários países do mundo, onde se cultiva o grão-de-bico (NENE *et al.*, 2012). Em estudos do capítulo anterior, foram identificadas as espécies de *F. solani* e *F. oxysporum*, provenientes de plantas de grão-de-bico com sintomas da doença cultivadas no Planalto Central do Brasil, as quais foram patogênicas e agressivas, causando podridão radicular, com consequente, murcha e morte das plantas.

Devido à sobrevivência no solo por meio de clamidósporos, essas espécies são difíceis de serem manejadas por métodos convencionais, como controle químico e rotação de culturas (MOHAMMADI; BANIHASHEMI, 2006; SINGH *et al.*, 2007). O uso de cultivares resistentes é pouco eficiente devido à grande variabilidade de *Fusarium* (JIMENEZ-GASCO *et al.*, 2005). Os fungos do gênero *Trichoderma* têm sido amplamente estudados como antagonistas a fitopatógenos. Por serem isolados do solo e da rizosfera de plantas, obtêm maior sucesso no controle de doenças radiculares (AGUIAR *et al.*, 2013). Esses microrganismos possuem grande versatilidade de mecanismos de ação, atuando sobre outros fungos por meio de antibiose e metabólitos voláteis, micoparasitismo, produção de enzimas degradadoras de parede celular e competição por nutrientes e substrato (HARMAN *et al.*, 2004; VINALE *et al.*, 2008b; ZHANG *et al.*, 2014). Além dos mecanismos mencionados, isolados de *Trichoderma* também podem atuar como promotores de crescimento e indutores de resistência contra diversos patógenos (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009; HARMAN *et al.*, 2004).

Bioprodutos à base de *Trichoderma* spp. são comercializados em várias regiões do mundo (BETTIOL *et al.*, 2012). No Brasil, a limitada disponibilidade de bioformulados devidamente registrados no Ministério da Agricultura Pesca e Abastecimento (MAPA) para culturas de importância econômica, aliada à falta de identificação de novos isolados com potencial no biocontrole e à pouca divulgação dos benefícios do uso desses agentes, limitam a sua utilização pelo produtor (MACHADO *et al.*, 2012). Portanto, a prospecção de isolados e a avaliação do seu potencial antagônico a fitopatógenos são etapas primordiais no processo de desenvolvimento de produtos biológicos para controle de doenças de plantas. Partindo desse princípio, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar e selecionar isolados de *Trichoderma* sp., por meio de teste *in vitro* e *in vivo*, quanto ao potencial antagônico à espécies de *F. solani* e *F. oxysporum*, causadoras da podridão radicular e murcha no grão-de-bico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção de isolados de *Trichoderma*

As amostragens foram realizadas no mês de julho de 2013, em área de cultivo comercial de grão-de-bico, no município de Cristalina-GO. Amostras de solo da rizosfera de plantas de grão-de-bico de diferentes genótipos com sintomas da doença murcha de fusarium (amarelecimento, murcha e descoloração nos tecidos vasculares) foram coletadas, colocadas em sacos plásticos e armazenadas em geladeira a 4 °C.

Os isolamentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Minas Gerais, *campus* Montes Claros, por meio da técnica de diluições seriadas. Para isso, 25 g de cada amostra de solo foram homogeneizadas em 225 mL de água destililada esterilizada (ADE) (diluição  $10^{-1}$ ). Na segunda diluição ( $10^{-2}$ ), transferiu-se 1 mL da diluição  $10^{-1}$  para tubo de ensaio contendo 9 mL de ADE e, assim, sucessivamente, até a diluição  $10^{-4}$ . Alíquotas de aproximadamente 100  $\mu$ L das diluições  $10^{-4}$  foram colocadas em placas de petri contendo meio BDA, espalhadas com uma alça de Drigalsky e incubadas em BOD a 25 °C, sendo transferidas as colônias típicas de *Trichoderma* para outras placas contendo o mesmo meio de cultura, obtendo-se, assim, colônias puras dos isolados de *Trichoderma*. As características macroscópicas e microscópicas de cada isolado foram examinadas para confirmação do gênero. A partir das culturas puras obtidas foram feitas culturas monoconidiais que foram conservadas em ADE (CASTELLANI, 1939) e em tubos de ensaio contendo meio BDA e armazenadas a 4 °C para usos posteriores (TAB.1).

**TABELA 1**

Isolados de *Trichoderma* sp. obtidos da rizosfera de plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) cultivadas em Cristalina-GO

<sup>1</sup> Código	Amostra/cultivar
T 01	Amostra 12/CNPH 0233
T 02	Amostra 12/CNPH 0233
T 03	Amostra 3/ CNPH 0334
T 04	Amostra 3/CNPH 0334
T 05	Amostra 6/Cícero
T 06	Amostra 12/ CNPH 0233
T 07	Amostra 10/ Jamu 96
T 08	Amostra 10/ Jamu 96
T 09	Amostra 10/Jamu 96
T 10	Amostra 6/Cícero
T 11	Amostra 6/Cícero
T 12	Amostra 1/CNPH 0334
T 13	Amostra 1/ CNPH 0334
T 14	Amostra 3/CNPH 0334
T 15	Amostra 12/ CNPH 0233
T 16	Amostra 5/ Cícero
T 17	Amostra 10/ Jamu 96
T 18	Amostra 10/ Jamu 96
T 19	Amostra 5/ Cícero
T 20	Amostra 1/ CNPH 0334
T 21	Amostra 1/ CNPH 0334

**Notas:**<sup>1</sup>T-Isolados de *Trichoderma*.

**Fonte:** Da autora.

## 2. 2 Isolados dos patógenos utilizados

Foram utilizados os isolados FCA 27 e FCA 12 de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, respectivamente, pertencentes à micoteca do

Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Ambos foram obtidos de tecidos radiculares de plantas de grão-de-bico coletadas em Cristalina-GO, com sintomas aparentes de fusariose, sendo comprovadamente patogênicos e agressivos ao cultivar Cícero de grão-de-bico (Capítulo 1).

## **2.3 Ensaio de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. a *Fusarium* spp.**

Todos os isolados de *Trichoderma* sp. foram avaliados quanto ao potencial antagonista aos isolados de *Fusarium* supracitados, por meio da competição em culturas pareadas. Treze isolados foram selecionados e avaliados quanto à produção de metabólitos secundários com atividade fungicida/fungistática (não voláteis) e a produção de compostos orgânicos voláteis (COV).

### **2.3.1 Ensaio de competição por nutrientes**

Neste experimento, foram avaliados os isolados de *Trichoderma* sp. contra os isolados de *Fusarium* spp. pelo método das culturas pareadas (DENNIS ; WEBSTER, 1971c). Para isso, um disco de micélio de 4 mm de diâmetro do isolado de *Fusarium* e outro do antagonista, provenientes de culturas maduras com sete dias de crescimento em meio BDA, foram colocados em placa de petri de 90 mm, contendo o mesmo meio de cultura, em lados opostos e distantes a 1 cm da lateral da placa de petri. No controle, colocou-se apenas o disco de *Fusarium* na periferia das placas. Cada pareamento foi feito em triplicata e as placas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Após esse período, o crescimento radial das colônias dos patógenos foi medido para o cálculo da inibição do crescimento micelial, conforme a equação a seguir, onde ICM = percentagem de inibição de crescimento micelial, C = crescimento radial de *Fusarium* no controle, e T = crescimento radial de *Fusarium* na presença de *Trichoderma* sp.:

$$\text{ICM} = \text{C-T} / \text{C} \times 100$$

Os isolados de *Trichoderma* sp. foram classificados quanto ao antagonismo, conforme a escala de notas proposta por Bell *et al.* (1982), considerando a sua capacidade de competição a saber: nota 1, *Trichoderma* sp. cobre 100% da superfície do meio e coloniza totalmente o patógeno; nota 2, *Trichoderma* sp. cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio e coloniza parcialmente o patógeno; nota 3, *Trichoderma* sp. ocupa pelo menos 1/2 da superfície do meio sem colonizar o patógeno; nota 4, patógeno não é colonizado e cresce sobre pelo menos 2/3 do meio; e nota 5, patógeno cobre 100% da superfície do meio.

### **2.3.2 Avaliação da inibição de *Fusarium* spp. por compostos orgânicos voláteis**

Os isolados de *Trichoderma* sp. foram cultivados em placas de petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA e mantidos em temperatura ambiente durante três dias. Em placas separadas, com mesmo diâmetro, e contendo o mesmo meio de cultura, foram cultivados os isolados de *Fusarium* spp. por meio de um disco de micélio de 4 mm. Para avaliar a produção de compostos orgânicos voláteis, utilizou-se o método das placas invertidas (DENNIS; WEBSTER 1971b). Para isso, as tampas das placas foram removidas e a parte inferior daquelas contendo *Fusarium* spp. foram invertidas sobre aquelas contendo os isolados de *Trichoderma* sp. As laterais foram seladas com várias camadas de filme plástico de PVC transparente. O controle consistiu de placas inoculadas com *Fusarium* spp. invertidas sobre placas contendo meio BDA não inoculado. Cada tratamento foi feito em triplicata. Após esse procedimento, as placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. O diâmetro das colônias de *Fusarium* foi medido no 4º, 7º e 10º dia de incubação, para o cálculo da inibição do crescimento micelial, utilizando-se a mesma equação mencionada anteriormente.

### **2.3.3 Avaliação da inibição de *Fusarium* spp. por compostos orgânicos não voláteis**

Foi utilizada a metodologia proposta por Dennis e Webster (1971a), com modificações. De cada isolado de *Trichoderma* sp., crescido em meio BDA por sete dias, foram retirados oito discos miceliais (4 mm), os quais foram transferidos para erlenmeyers contendo 100 mL de caldo BD (200 g batata-20 g dextrose-1 L de água). Após 20 dias de crescimento em temperatura ambiente e sob agitação manual diária, o meio líquido dos Erlenmeyers foi filtrado em membrana milipore de 0,45 µm de diâmetro do poro em sistema de filtração composto por coletor graduado, frasco receptor e pinça de alumínio para união do conjunto em kitassato, acoplado em bomba de sucção a vácuo. Os filtrados fúngicos obtidos foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos e incorporados ao meio BDA fundente na proporção de 20 % (v/v). O tratamento controle consistiu-se de meio BDA, acrescido de água estéril na mesma proporção dos filtrados. O meio de cultura foi vertido em placas e, após a solidificação, colocou-se, no centro, um disco de micélio dos isolados de *Fusarium*. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento. As placas foram incubadas em câmara BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações do diâmetros das colônias foram feitas aos quatro, sete e dez dias após a incubação para o cálculo do índice de inibição, conforme descrito anteriormente.

### **2.4 Experimento em casa de vegetação**

Para o teste de antagonismo *in vivo* foram utilizados os isolados T1, T3, T7 e T13 de *Trichoderma* sp. individualmente e em mistura (mix). O experimento foi realizado nos meses de dezembro de 2014 e janeiro de 2015. Esses isolados foram selecionados por terem apresentado bons resultados nos experimentos *in vitro*. Para comparação, foi utilizado o produto comercial

Quality®, à base de *Trichoderma asperellum*, na formulação em grânulos dispersíveis (WG).

Os isolados de *Fusarium* spp. foram cultivados em placas de 90 mm com meio BDA por 15 dias. Posteriormente, o meio de cultura com as colônias fúngicas foram trituradas em liquidificador na proporção de 10 placas por litro. Retirou-se uma alíquota da suspensão para a análise das unidades formadoras de colônias. Já os isolados de *Trichoderma* sp. foram cultivados no mesmo meio e incubados por sete dias. Após esse período, 20 mL de água foram adicionados às placas de cultivo e os conídios foram suspensos com um bastão de vidro. A suspensão de esporos foi filtrada em gaze, quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para  $5,0 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>. O produto comercial Quality® foi diluído em água, de forma a obter essa mesma concentração. O mix foi obtido por meio da mistura de partes iguais das suspensões calibradas dos isolados T1, T3, T7, 13. A seguir, 50 mL das suspensões de *Trichoderma* e de *Fusarium* foram homogeneizadas em 1 kg de substrato composto por solo e areia, previamente autoclavados, na proporção 1:1. Plantas de grão-de-bico da cultivar 'Cícero', com sete dias de idade, produzidas em bandejas de propileno, tiveram suas raízes feridas com bisturi. Em seguida, foram transplantadas para os vasos contendo substrato infestado com os diferentes tratamentos contendo os isolados de *Trichoderma* e *Fusarium*. O controle consistiu de plantas feridas transplantadas em solo não inoculado. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (7x2)+1, sendo seis tratamentos com *Trichoderma* sp. (T1, T3, T7, T13, mix e Quality®) e um sem *Trichoderma* x dois isolados de *Fusarium* spp. (*Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*) + tratamento adicional sem inoculado (controle), totalizando 15 tratamentos com oito repetições. As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob irrigação, diária durante cinco semanas. Após esse período, as plantas foram retiradas dos vasos e avaliadas quanto ao desenvolvimento e à ocorrência da doença. Foram medidos os comprimentos do sistema radicular e da parte aérea e obtidas as suas respectivas massas frescas e secas. Para a determinação da matéria seca das plantas, as raízes



e a parte aérea foram separadas, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de ventilação forçada a 65 °C por 48 h. A doença foi avaliada pela análise visual de sintomas de fusariose, lesões radiculares no interior dos vasos condutores.

## **2.5 Análise dos dados**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. Para os dados relativos a inibição por metabólitos não voláteis termoestáveis foi utilizada a transformação dos dados para “arco seno da raiz quadrada de  $y/100$ ”. Antes da transformação dos dados, os valores “zero” foram transformados para  $1/4 n$ , onde  $n$  = número máximo de observações (valor médio do controle). As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SAEG.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Ensaio de competição por nutrientes

No experimento de antagonismo em culturas pareadas, todos os isolados de *Trichoderma* sp. inibiram o crescimento de *F. solani* e *F. oxysporum* (TAB. 2). Foram observadas variações entre os isolados em relação à capacidade de supressão do crescimento das espécies de *Fusarium* no sétimo dia de avaliação. Os isolados de *Trichoderma* sp. inibiram entre 37,43 a 50,29 % o crescimento micelial de *F. solani*, sendo as maiores inibições causadas pelos isolados T1, T2, T3, T4, T5, T7, T11 e T12. Já para *F. oxysporum*, a inibição do crescimento micelial variou de 21,53 a 45,03% e os isolados T1, T3, T6, T12, T13, T16, T18 e T19 foram os que causaram as maiores inibições. Na testemunha, o diâmetro médio das colônias de *Fusarium* foi de 5,7 cm para *F. solani* e 4,6 cm para *F. oxysporum*, respectivamente.

TABELA 2

Inibição do crescimento micelial (ICM) de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* por isolados de *Trichoderma* sp. em cultivo pareado e atribuição de notas, conforme Bell *et al.*(1982)

Isolados	ICM (%)		*NOTAS	
	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
T1	49,71 aA	40,96 aB	2,0 bA	1,7 aA
T2	45,61 aA	35,21 bB	2,0 bA	1,0 bB
T3	45,28 aA	45,03 aA	1,3 bA	1,7 aA
T4	43,86 aA	31,61 cB	1,7 bA	1,3 bA
T5	46,20 aA	32,33 cB	1,7 bA	2,0 aA
T6	37,43 bA	38,80 aA	2,3 aA	2,0 aB
T7	45,03 aA	34,49 bB	2,0 bA	1,7 aA
T8	39,77 bA	34,49 bA	2,7 aA	1,7 aB
T9	39,18 bA	31,61 cB	2,0 bA	1,3 bA
T10	42,69 bA	34,49 bB	2,0 bA	2,0 aA
T11	44,44 aA	27,29 cB	1,7 bA	2,0 aA
T12	50,29 aA	40,24 aB	2,0 bA	1,0 bB
T13	40,94 bA	42,59 aA	1,7 bA	1,3 bA
T14	38,60 bA	35,93 bA	1,7 bA	2,0 aA
T15	40,35 bA	28,73 cB	2,0 bA	2,0 aA
T16	41,52 bA	40,96 aA	2,0 bA	1,7 aA
T17	39,77bA	36,65 bA	2,0 bA	1,7 aA
T18	40,35 bA	43,12 aA	2,0 bA	1,0 bB
T19	40,45 bA	40,24 aA	2,0 bA	1,3 bA
T20	37,43 bA	24,41 dB	2,0 bA	1,0 bB
T21	38,60 bA	21,53 dB	3,0 aA	2,0 aB
<b>CV (%)</b>	11,34		23,82	

**Notas:** Dados seguidos pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

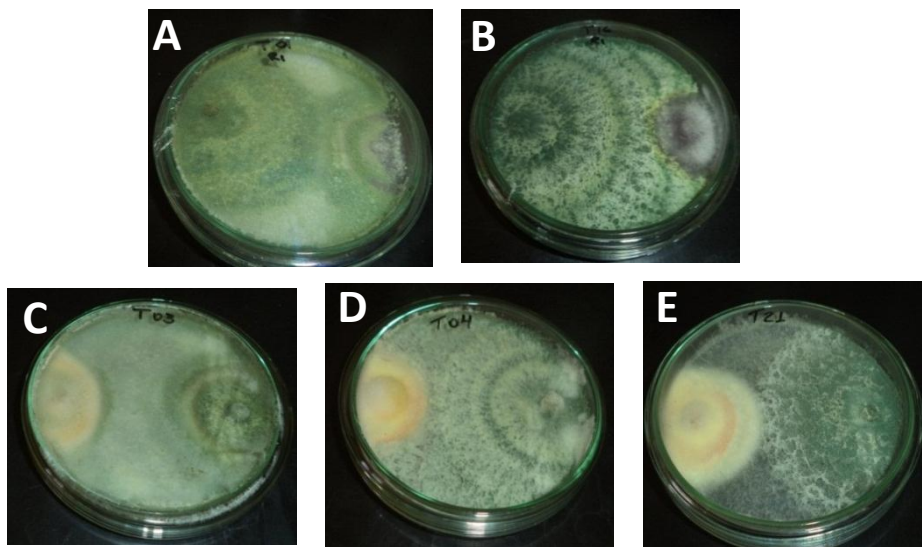
\* Classificação conforme escala de notas de Bell *et al.*(1982).

**Fonte:** Da autora.

Os principais mecanismos envolvidos no antagonismo de fungos por *Trichoderma* sp. a fungos fitopatogênicos são a competição por nutrientes e espaço, o hiperparasitismo e a produção de substâncias antibióticas e enzimas hidrolíticas (HARMAN *et al.*, 2004). A maioria dos isolados de *Trichoderma* sp. avaliados no pareamento com *F. solani* ou *F. oxysporum* apresentou rápido crescimento em meio de cultura. Segundo Benítez *et al.* (2004), alguns fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes, o que faz de *Trichoderma* sp. um fungo bastante competitivo devido ao seu rápido crescimento. Zhang *et al.* (2014) observaram, em estudo de antagonismo do isolado de *Trichoderma harzianum* T-E5 a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, que ocorreu hiperparasitismo, produção de substâncias extracelulares, como a excreção de enzimas e compostos voláteis induzida e regulada pela presença de *F. oxysporum*. No presente experimento, porém não foi observada a presença de halos de inibição, que são típicos da expressão de antibiose. Grande parte dos isolados avaliados nesta pesquisa (T1, T2, T4, T5, T7, T9, T10, T11, T15, T20, T21) foi estatisticamente mais eficientes na inibição do crescimento de *F. solani* do que de *F. oxysporum*. Portanto, a variação na inibição observada nesta pesquisa pode ser explicada pelo fato de que espécies de *Trichoderma* podem ser diferencialmente seletivas contra diferentes fungos e o controle exercido variável entre espécies ou entre isolados da mesma espécie (LOUZADA *et al.*, 2009; WELLS *et al.*, 1972).

De acordo com a classificação proposta por Bell *et al.* (1992), é considerado um isolado com bom potencial antagonista aqueles cuja nota, (valor médio) seja  $\leq 2$ , ou seja, o isolado que cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio e coloniza parcialmente o patógeno. Dessa forma, todos os isolados de *Trichoderma* sp. foram considerados bons antagonistas a *F. oxysporum*, destacando-se os isolados T2, T4, T9, T12, T13, T18, T19 e T20. Somente os isolados T6, T8 e T21 não foram bons antagonistas a *F. solani* com notas  $\geq 2,3$  e estatisticamente superiores aos demais.

Os isolados T2, T6, T8, T12, T18, T20 e T21 se mostraram mais agressivos a *F. oxysporum*, colonizando uma superfície maior desse patógeno do que de *F. solani* (FIG. 1). A capacidade de *Trichoderma* sp. em parasitar fungos fitopatogênicos tem sido relatada em vários estudos (MELO; FAULL, 2000; BENHAMOU;CHET, 1996; LOUZADA *et al.*, 2009; RAM; KENDURKAR, 2014). *Trichoderma* sp. são capazes de reconhecer as hifas de outros fungos e crescer em sua direção presumivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, e, após a infecção, utilizam o conteúdo das hifas hospedeiras como fonte de nutrientes por meio de enzimas degradadoras de parede celular, como glucanases, quitinases e proteases (HARMAN *et al.*, 2004). Apesar do crescimento e o enrolamento de hifas serem importantes no processo de parasitismo, isso não garante sucesso no controle biológico (ALMEIDA *et al.*, 2007). Os antagonistas mais promissores são aqueles que apresentam mais de um mecanismos de ação (MELO; AZEVEDO, 1998).



**FIGURA 1-** Atribuição de notas aos isolados de *Trichoderma* sp. quanto ao antagonismo exercido sobre *Fusarium oxysporum*:

- A) Nota 1,
  - B) Nota 2;
- e sobre *Fusarium solani*:
- C) nota 1,
  - D) nota 2,
  - E) nota 3.

**Fonte:** Da autora.

Baseado no desempenho no experimento de culturas pareadas, os isolados T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T11, T12, T13, T16, T18 e T19 foram selecionados para a avaliação da produção de compostos orgânicos voláteis e não voláteis.

### 3.2 Inibição de *Fusarium* spp. por compostos orgânicos voláteis

Todos os isolados de *Trichoderma* sp. avaliados produziram compostos orgânicos voláteis que inibiram, significativamente, o crescimento micelial de *F. solani* e *F. oxysporum* a partir do terceiro dia de incubação (TAB. 3). Os patógenos afetados pelos metabólitos voláteis apresentaram micélio ralo e atrofiado.

TABELA 3

Inibição do crescimento micelial (ICM) de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* por compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* sp. aos 3, 7 e 10 dias de incubação

Isolados	ICM (%)					
	<i>F. solani</i>			<i>F. oxysporum</i>		
	3° dia <sup>ns</sup>	7° dia	10° dia	3° dia	7° dia	10° dia
T1	71,87	82,34 a	80,68 a	52,17 b	58,15 b	53,21 b
T2	67,18	75,92 a	69,74 a	50,24 b	70,66 a	76,02 a
T3	74,48	78,86 a	77,65 a	46,37 b	50,93 b	53,41 b
T4	69,79	71,11 a	70,67 a	51,69 b	50,46 b	51,27 b
T5	58,33	49,97 b	45,76 b	44,06 b	35,79 c	35,48 b
T6	65,63	75,65 a	72,99 a	54,11 b	53,10 b	58,28 a
T7	73,95	80,47 a	79,98 a	66,18 a	78,35 a	81,48 a
T11	66,67	54,78 b	49,95 b	18,84 d	31,94 c	30,40 b
T12	59,89	67,63 a	59,03 b	35,27 c	42,28 c	45,42 b
T13	59,74	53,71 b	44,59 b	47,83 b	57,43 b	60,03 a
T16	64,06	78,33 a	77,88 a	63,76 a	66,81 a	70,17 a
T18	57,29	47,03 b	41,11 b	22,70 d	15,34 c	27,68 b
T19	65,10	69,77 a	67,18 a	56,04 b	49,49 b	49,12 b
CV(%)	12,84	11,24	17,58	16,73	24,41	28,68

**Notas:** Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

<sup>ns</sup>Não significativo.

**Fonte:** Da autora.

Em *F. solani*, a inibição do crescimento micelial foi alta, acima de 57 % já no 3º dia de avaliação, não havendo diferença significativa entre os isolados de *Trichoderma* sp. No 7º e 10º dia de avaliação os isolados T1, T2, T3, T4, T6, T7, T16 e T19 se diferenciaram quanto a produção de metabólitos, causando maiores inibições no crescimento de *F. solani*.

Já para *F. oxysporum*, as maiores inibições foram causadas pelos metabólitos voláteis produzidos pelos isolados T2, T7 e T16, tanto no sétimo dia quanto no décimo dia de avaliação. Apenas os isolados T7 e T16 foram eficientes em inibir o crescimento das duas espécies de *Fusarium* acima de 60%, a partir do terceiro ao décimo dia de avaliação. O efeito inibitório de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* sp. já foi observado em vários fitopatógenos, como *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, *Rhizopus stolonifer*, *Rosellinia necatrix*, *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae* (ARJONA-GIRONA *et al.*, 2014; BOMFIM *et al.*, 2010; DUBEY; SURESH; SINGH, 2007; EZIASHI *et al.*, 2006; ISAIAS *et al.*, 2014; ZAFARI; KOUSHKI; BAZGIR, 2008). Alguns isolados produziram metabólitos voláteis eficientes em inibir ambos *F. solani* e *F. oxysporum* (T2, T7 e 16), enquanto outros foram eficientes na inibição de uma única espécie de *Fusarium*. Esses resultados evidenciam que os isolados de *Trichoderma* sp. produzem compostos voláteis variados, conforme a interação com a espécie de *Fusarium* e/ou pode reagir com os compostos orgânicos voláteis produzidos por *Fusarium*, formando outro(s) composto(s) com maior ou menor atividade inibitória ao patógeno, com o tempo de exposição. Harman *et al.* (2004) observaram que a capacidade de *Trichoderma* em produzir substâncias e o efeito fungicida podem variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie. Em outro estudo, Denis e Webster (1971b) verificaram que *Trichoderma* sp. podem produzir o mesmo complexo de metabólitos em diferentes proporções ou podem produzir compostos químicos inteiramente diferentes.

Keszler *et al.* (2000), utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massa, identificaram 21 compostos voláteis produzidos por *T. atroviride*, derivados principalmente de pironas e dioxolano.



Siddiquee *et al.* (2012) utilizaram a mesma metodologia e identificaram mais de 278 compostos voláteis produzidos por *T. harzianum*, que incluem hidrocarbonetos saturados (C7-C30), ciclo-hexano, ciclopentano, ácidos graxos, álcoois, ésteres, compostos contendo enxofre, pirano simples e derivados de benzeno. Muitos desses compostos podem ter ação antibiótica isolada (ARJONA-GIRONA *et al.*, 2014; CLAYDON; ALLAN, 1987; VINALE *et al.*, 2006), ou podem agir sinergicamente, o que explica a grande capacidade desses metabólitos voláteis na paralização do crescimento micelial de fitopatógenos.

Os isolados de *Trichoderma* sp. estudados produziram compostos voláteis que apresentaram grande potencial na inibição de *F. solani* e *F. oxysporum* e devem ser identificados para melhor entendimento sobre a sua formação e as suas funções nas interações biológicas.

### **3.3 Inibição de *Fusarium* spp. por compostos orgânicos não voláteis**

Os compostos orgânicos não voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* sp. estudados tiveram pouco efeito na inibição de *F. solani* e *F. oxysporum* e variaram quanto à sua ação (TAB. 4).

TABELA 4

Inibição do crescimento micelial (ICM) de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* por compostos orgânicos não voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* sp. aos 3, 7 e 10 dias de incubação

Isolados	ICM <sup>1</sup>					
	<i>F. solani</i>			<i>F. oxysporum</i>		
	3° Dia	7°Dia	10° Dia <sup>ns</sup>	3° Dia	7°Dia	10° Dia
T1	0,082 (1,26) c	0,514 (24,55) a	0,228 (12,22)	0,166 (3,47) b	0,260 (6,74) a	0,357(12,42) a
T2	0,187 (4,77) b	0,350 (12,77) a	0,157 (5,93)	0,323 (10,67) a	0,329 (10,87) a	0,336 (11,10) a
T3	0,026 (0,00) c	0,298 (11,56) a	0,164 (3,70)	0,168 (3,75) b	0,230 (5,20) a	0,254 (6,38) b
T4	0,397 (14,34) a	0,331(10,76) a	0,017 (0,00)	0,155 (2,88) b	0,156 (3,31) b	0,119 (1,93) c
T5	0,026 (0,00) c	0,032 (0,12) b	0,017 (0,00)	0,093 (1,62) b	0,048 (0,39) b	0,081(1,45) c
T6	0,334 (11,08) a	0,336 (11,16) a	0,017 (0,00)	0,301 (8,87) a	0,340 (11,90) a	0,283 (7,89) b
T7	0,026 (0,00) c	0,476 (21,17) a	0,380 (13,9)	0,267 (7,07) a	0,318 (10,36) a	0,270 (7,32) b
T11	0,125 (2,44) b	0,383 (14,37) a	0,204 (4,63)	0,077 (1,01) b	0,241 (5,72) a	0,227 (5,05) b
T12	0,026 (0,00) c	0,118 (2,32) b	0,151 (5,56)	0,030 (0,00) b	0,104 (2,45) b	0,188 (3,93) b
T13	0,389 (13,87) a	0,393 (14,77) a	0,047 (0,37)	0,346 (11,87) a	0,445 (18,60) a	0,416 (16,38) a
T16	0,374 (13,40) a	0,465 (20,77) a	0,296 (11,85)	0,280 (7,67) a	0,284 (8,81) a	0,248 (6,95) b
T18	0,048 (0,32) c	0,294 (9,16) a	0,145 (2,96)	0,269 (7,67) a	0,129 (2,28) b	0,202 (4,11) b
T19	0,351 (12,01) a	0,211 (4,76) b	0,017 (0,0)	0,215 (4,68) a	0,252 (6,75) a	0,226 (7,03) b
CV(%)	37,87	35,85	115,89	38,46	38,34	33,93

**Notas:** Dados seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

<sup>1</sup> Dados transformados para "arco seno da raiz quadrada de  $y/100$ "; entre parênteses=médias originais em percentagem.

<sup>ns</sup> Não significativo.

**Fonte:** Da autora.

Os compostos não voláteis obtidos dos isolados T4, T6, T13, T16 e T19 foram os que mais reduziram o crescimento das colônias no terceiro dia de incubação de *F. solani*. No sétimo dia de incubação, todos os isolados, exceto T5, T12 e T19, causaram redução significativa no crescimento do patógeno. Porém esse efeito não continuou até ao décimo dia de incubação, em que *F. solani* iniciou o seu crescimento, não ocorrendo diferença estatística entre os tratamentos. Os resultados obtidos mostraram que os compostos não voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram baixa atividade sobre *F. solani*. Para *F. oxysporum*, observou-se maior efeito inibitório dos compostos não voláteis produzidos pelos isolados T2, T6, T7, T13, T16, T18, T19, no terceiro dia de incubação, e pelos isolados T1, T2, T3, T6, T7, T11, T13, T16 e T9, no sétimo dia de incubação. No décimo dia de incubação, ocorreram as maiores inibições pelos compostos não voláteis dos isolados T1, T2 e T13, sendo que os compostos produzidos pelos isolados T4 e T5 tiveram o menor efeito inibitório a *F. oxysporum*. Zafari *et al.* (2008) observaram que a porcentagem de inibição de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* por filtrados obtidos de isolados de *Trichoderma* spp. diminuiu com o aumento do período de incubação, sugerindo que parte do efeito inibitório inicial era devido a metabólitos voláteis presentes no filtrado. Isaias *et al.* (2014) verificaram que a resposta de diferentes fungos pode variar de acordo com os metabólitos produzidos pelo antagonista. O efeito inibitório dos metabólitos não voláteis de *Trichoderma* sp. deve-se à presença de substâncias com ação antibiótica, como os compostos gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina (DENNIS; WEBSTER, 1971a).

Embora o efeito dos compostos não voláteis da maioria dos isolados de *Trichoderma* tenha sido significativo, ocorreu baixa inibição em relação à ação dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelos mesmos isolados. Neste experimento, a maior inibição observada foi de 24,5 % a *F. solani* incubados por sete dias em meio de cultura contendo o filtrado do isolado T1. Mulatu *et al.* (2013) trabalharam com filtrados (compostos não voláteis) de *Trichoderma* sp. adicionado ao meio de cultivo na mesma concentração

utilizada no presente estudo (20 % v/v), e observaram inibições do crescimento de *Fusarium xyloarioides* de 18,9 a 60 %. Em outro estudo, Eziashi *et al.* (2008), utilizando metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. pelo método do papel celofane, observaram inibição do crescimento de *Ceratocystis paradoxa* variando entre 0 a 74 %.

Isaias *et al.* (2014) avaliaram o efeito de metabólitos não voláteis e metabólitos não voláteis termoestáveis de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. e observaram inibição do crescimento de *Sclerotium rolfsii* entre 0 a 100%, para metabólitos não voláteis e de 0 a 72,05 %, para metabólitos não voláteis termoestáveis. Para esses autores, apesar de ter havido uma diminuição nas porcentagens de inibição, os metabólitos de *Trichoderma* spp. se mantiveram ativos, mesmo após serem autoclavados. Portanto, na presente pesquisa, a autoclavagem do filtrados a 121 °C por 20 minutos pode ter degradado os compostos com atividade antifúngica e/ou ocorrido reação entre os compostos, formando outras substâncias com baixa ação fungitóxica e até mesmo nula. Por outro lado, a diluição dos filtrados no meio de cultura também pode ter interferido na expressão da sua capacidade inibitória. Daniel *et al.* (2014) observaram uma correlação positiva entre a concentração do extrato do isolado *Trichoderma asperellum* T2-31 no meio de cultura e a inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*. Portanto, pela metodologia adotada neste experimento, pode-se concluir que a autoclavagem proporcionou redução da atividade inibitória dos metabólitos secundários produzidos pelo isolados de *Trichoderma* avaliados.

Com base nos melhores resultados obtidos nos experimentos com metabólitos voláteis e não voláteis, foram selecionados os isolados T1, T3, T7 e T13 para as avaliações in vivo.

### 3.4 Experimento em casa de vegetação

Na avaliação em casa de vegetação, não foi possível verificar o potencial antagonico dos isolados de *Trichoderma* sp. a *Fusarium solani* (FCA 12) e *Fusarium oxysporum* (FCA 27), pois as plantas inoculadas com os patógenos (Controle positivo) não desenvolveram os sintomas esperados e não se diferenciaram da testemunha (Controle negativo) em relação às variáveis avaliadas (TAB.5; 6). A expressão de doença em planta é consequência da interação de três componentes: patógeno virulento, hospedeiros suscetíveis e ambiente favorável. O ambiente pode influenciar o crescimento e a suscetibilidade da planta hospedeira, a multiplicação, a disseminação, a sobrevivência e as atividades do patógeno, assim como a interação entre a planta hospedeira e o patógeno (GUINI *et al.*, 2011). Os isolados de *Fusarium* utilizados neste experimento foram os mesmos selecionados no teste de patogenicidade, e como não induziram sintomas de podridão radicular em nenhuma das plantas avaliadas (controle positivo), mesmo na presença da hospedeira e com temperatura adequada, podendo estar associados as plantas como saprofiticos ou interação entre espécies ou isolados de *Fusarium*.

TABELA 5

Efeito do tratamento do solo com *Trichoderma* sp. sobre o crescimento e a massa fresca e seca de plantas de grão-de-bico cultivadas em solo infestado com *Fusarium solani*

Tratamento	Comprimento (cm)		Massa fresca (g)		Massa seca (g)	
	Parte aérea <sup>ns</sup>	Raiz <sup>ns</sup>	Parte aérea <sup>ns</sup>	Raiz <sup>ns</sup>	Parte aérea <sup>ns</sup>	Raiz <sup>ns</sup>
T1	29,2	29,6	5,1	6,02	1,05	0,47
T3	30,7	31,3	4,23	4,96	0,89	0,42
T7	32,8	30,5	4,93	5,98	0,93	0,46
T13	29,8	31,5	4,08	4,11	0,81	0,41
<sup>1</sup> Mix	30,8	27,8	5,48	7,01	1,09	0,64
Quality®	31	32,5	4,29	4,55	0,99	0,41
<sup>2</sup> Controle +	32,2	31	4,31	6,02	0,77	0,49
<sup>3</sup> Controle -	34,25	27,16	4,31	6,91	0,87	0,60
CV (%)	13,26	24,61	34,13	41,00	36,10	43,99

Notas: <sup>1</sup>Mistura T1+T3+T7+T13.

<sup>2</sup>Plantas inoculadas somente com *Fusarium solani*.

<sup>3</sup>Plantas não inoculadas.

Dados seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Fonte: Da autora.

TABELA 6

Efeito do tratamento do solo com *Trichoderma* sp. sobre o crescimento e a massa fresca e seca de plantas grão-de-bico cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum*

Tratamento	Comprimento (cm)		Massa fresca (g)		Massa seca (g)	
	Parte aérea	Raiz <sup>ns</sup>	Parte aérea	Raiz	Parte aérea <sup>ns</sup>	Raiz
T1	32,8 a	30,1	4,77 a	3,81 b	0,91	0,44 a
T3	22,0 a	25,5	2,28 b	1,27 c	0,46	0,14 b
T7	24,7 c	29,1	2,94 b	3,51 b	0,57	0,33 b
T13	28,8 b	33,2	2,69 b	2,93 b	0,74	0,35 b
<sup>1</sup> Mix	28,5 b	27,1	3,93a	4,49 b	0,72	0,31 b
Quality®	28,8 b	26,5	4,55 a	6,63 a	0,94	0,54 a
<sup>2</sup> Controle +	36,5 a	30,6	4,52 a	5,54 a	0,91	0,41 a
<sup>3</sup> Controle -	34,2 a	27,2	4,31 a	6,91 a	0,87	0,60 a
CV (%)	17,13	27,75	37,73	40,09	45,56	49,94

Notas:<sup>1</sup> Mistura T1+T3+T7+T13.

<sup>2</sup> Plantas inoculadas somente com *Fusarium oxysporum*.

<sup>3</sup> Plantas não inoculadas.

<sup>ns</sup> Não significativo.

Dados seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Fonte: Da autora.

Muitos estudos mostram o potencial de *Trichoderma* sp. como promotores de crescimento de plantas (AGUIAR *et al.*, 2013; SOUZA PEDRO *et al.*, 2012; VINALE *et al.*, 2004), incluindo grão-de-bico (JYOTSNA *et al.*, 2008). *Trichoderma* pode produzir hormônios e solubilizar nutrientes no solo que são aproveitados pelas plantas e resultam em maior incremento no crescimento (CONTRERAS-CORNEJO, 2009), porém esse potencial também não foi observado neste estudo. Os tratamentos com *Trichoderma* sp. não tiveram efeito significativo sobre o desenvolvimento de plantas de grão-de-bico cultivadas em solo infestado por *Fusarium solani* (TAB. 5). Nas plantas cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum*, os tratamentos com *Trichoderma* sp. não apresentaram efeito superior significativo para nenhuma

das variáveis analisadas (TAB. 6). Ethur *et al.* (2005) avaliaram isolados de *T. virens* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro, e observaram que alguns isolados não interferiram no crescimento das plantas, enquanto outros interferiram de forma negativa. Segundo esses autores, além da variabilidade entre isolados de *Trichoderma* spp., pode-se encontrar, também, diferenças na ação desses, dependendo da temperatura, da umidade e do tipo de solo.

Foi observada interação significativa entre os tratamentos e as espécies de *Fusarium* para as variáveis comprimento da parte aérea e massa fresca de raízes (TAB. 7). Nas plantas cultivadas em solo infestado com *F. oxysporum*, observou-se menor efeito dos isolados T3 e T7 na promoção do desenvolvimento da parte aérea das plantas. Resultado similar para massa fresca de raízes também foi observado nos tratamentos T3, T7 e no MIX. Os resultados obtidos neste experimento confirmam ressalvas de Bell *et al.* (1982) e Harman (1991), em que bons resultados no antagonismo *in vitro* podem não ser confirmados *in vivo*, uma vez que ocorre interação complexa entre vários fatores bióticos e abióticos, os quais podem afetar os mecanismos de ação de *Trichoderma* sp. e as reações do hospedeiro e do agente patogênico.



TABELA 7

Comprimento da parte aérea e massa fresca de raízes de plantas de grão-de-bico em função da interação entre o tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. e *Fusarium* spp.

Tratamentos	Comprimento da parte aérea		Massa fresca de raízes	
	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
T1	29,2 aA	32,8 aA	6,02 aA	3,81 bA
T3	30,7 aA	22,0 cB	4,96 aA	1,27 bB
T7	32,8 aA	24,7 cB	5,98aA	3,51 bB
T13	29,8 aA	28,8 bA	4,11aA	2,93 bA
<sup>1</sup> Mix	30,8 aA	28,5 bA	7,01aA	4,49 aB
Quality®	31 aA	28,8 bA	4,55 aA	6,63 aA
<sup>2</sup> Controle +	32,2aA	36,5 aA	6,02aA	5,54aA
CV (%)	15,96		41,43	

Notas: <sup>1</sup>Mistura T1+T3+T7+T13.

<sup>2</sup>Plantas inoculadas somente com *Fusarium oxysporum* ou *Fusarium solani*. Dados seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Fonte: Da autora.

#### 4 CONCLUSÃO

Os isolados T2, T4, T5, T7 e T11 de *Trichoderma* sp. apresentaram maior inibição do crescimento de *F. solani*, enquanto os isolados T6, T13, T16, T18 e T19 foram mais eficientes na inibição de *F. oxysporum* em cultivo pareado.

Os isolados T1, T3 e T12 foram eficientes na inibição de ambas as espécies de *Fusarium* em cultivo pareado.

Todos os isolados de *Trichoderma* sp. avaliados produziram metabólitos voláteis capazes de inibir o crescimento micelial de *F. solani* e *F. oxysporum*.

Os compostos não voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* sp. possuem pouca atividade inibitória a *F. solani* e *F. oxysporum*.

Os compostos não voláteis produzidos pelos isolados T1, T2 e T13 foram os mais eficientes na inibição do crescimento de *F. oxysporum*.

Na avaliação do antagonismo *in vivo*, não foi possível observar o efeito dos tratamentos com isolados de *Trichoderma* sp. sobre o controle de *F. oxysporum* e *F. solani*.

Os tratamentos com *Trichoderma* sp. T1, T3, T7 e T13 selecionados nos experimentos de pareamento de cultura e antibiose não promoveram o crescimento das plantas de grão-de-bico nas condições avaliadas, nem mesmo quando utilizados juntos (Mix).

## REFERÊNCIAS

ACHARJEE, S.; SARMAH, B. K. Biotechnologically generating 'super chickpea' for food and nutritional security. **Plant Science**, v. 207, p. 108-116, 2013.

AGUIAR, A. R.; MACHADO, D. F. M.; PARANHOS, J. T.; SILVA, A. C. F. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de mudas do feijoeiro cv. Carioca e controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Ciência e Natura**, v. 34, n. 2, 2013.

AKRAMI, M.; KHIAMI, H. K.; SHIKHLINSKI, H.; KHOSHVAGHTEI, H. Biocontrolling two pathogens of chickpea *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* by different combinations of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma virens* under field condition. **International Journal of Agricultural Science Research**, v. 1, n. 3, p. 041-045, 2012 .

ALMEIDA, F. B.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 8, p. 1189-93, 2007.

ANDRABI, M.; VAID, A.; RAZDAN, V. Evaluation of different measures to control wilt causing pathogens in chickpea. **Journal of Plant Protection Research**, v. 51, n. 1, p. 55-59, 2011.

ANIMISHA, S. Z.; JAISWAL, K. K.; PANDEY, P. Integrated Management of Chickpea Wilt Incites by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, **International Journal of Agricultural Research**, v.7, n. 5, p. 284-290, 2012.

AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumanae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, v. 46, p. 162-183, 2005.

ARJONA-GIRONA, I.; VINALE, F.; RUANO-ROSA, D.; LORITO, M.; LÓPEZ-HERRERA, C. J. Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot. **European Journal of Plant Pathology**, v. 140, p. 385-397, 2014.

ARTIAGA, O. P. Avaliação de genótipos de grão-de-bico no Cerrado do Planalto Central Brasileiro. Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2012. 92 p.:il.

ARTIAGA, O. P.; SPEHAR, C. R.; SILVA, P. P.; NASCIMENTO, W. M.; BOITEUX, L. S. Chemical and genetic control of fusarium wilt in chickpea and

their effects on stand establishment under tropical conditions. In: international symposium on seed, transplant and stand establishment os horticultural crops: sowing the future of tropical horticulture, 6., 2012, Brasília, DF: Embrapa, 2012.

ÁVILA, Z. D.; CARVALHO, S.; BRAÚNA, L.; GOMES, D.; SILVA, M.; MELLO, S. D. M. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, v. 117, 2005.

BAAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, v. 90, n. 8, p. 891-900, 2000.

BAKHSH, A.; IQBAL, S. M.; HAQ, I. K. Evolution of chickpea germplasm for wilt resistance, **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 583-593, 2007.

BARBOSA, M. M. T. L.; SANTANA, C. A. M.; Desafios para o futuro da produção sustentável de alimentos. **Parcerias Estratégicas**, Brasília-DF, v. 17, n. 35, p. 55-74 , 2012.

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.

BENHAMOU, N; CHET, I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotiumrolfsii* by *Trichodermaharzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. **Phytopathology**, v. 86, n. 4, p.405-416, 1996.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C. E ;CONDÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z .V.; JÚNIOR, T. J. P.; CORRÊA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M., COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J.L. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas** Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, 2012.155 p. — (Documentos / Embrapa Meio Ambiente; 88).

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*: II infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n.11, p. 2357-2372, 1991.

BOMFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S. D.; SOUZA, I. V. B.; DIAS, N. O. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.

BOOTH, C. ***Fusarium: Laboratory guide to the identification of the major species***. Kew : Common Wealth Mycological Institute, 1977. 58 p.

BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Kew: Commonwelth Mycological Institute, Surrey, United Kingdom 1971, 327p.

BRAGA, N. R.; VIEIRA, R. F.; RAMOS, J. A. O. A cultura do grão-de-bico. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 16, p. 47-52, 1992.

BRAGA, N. R. Possibilidades da cultura do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) na microrregião de Viçosa, Minas Gerais: competição entre cultivares e nutrição mineral. Viçosa, 1997. 101 p. Tese (doutorado). Universidade Federal de Viçosa.

BRAGA, N. R.; VIERIRA, C.; VIEIRA, R. F. Comportamento de cultivares de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) na microrregião de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 44, p. 577-591, 1997.

BROTMAN, Y.; GUPTA, K. J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v. 20, p. 390-391, 2010.

CABRAL, C. S.; MELO, M. P.; FONSECA-BOITEUX, M. E. N.; BOITEUX, L.S.; REIS, A. Identificação de isolados de *Fusarium solani* causando podridão de raiz em grão-de-bico (*Cicer arietinum*) na região central do Brasil, 46° Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2013.

CAMPOS, V. P; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 525-535, 2010.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHAND, H.; KHIRBAT, S. K. Chickpea wilt and its management-A review. **Agricultural Reviews**, v. 30, n. 1, p. 1-12, 2009.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea / Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. **Studies in Mycology**. v. 48, p. 1-116, 2004.

CHRISTODOULOU, V.; BAMPIDIS, V. A.; SOSSIDOU, E.; AMBROSIADIS, J.; HUCKO, B.; ILIADIS, C.; KODES, A. The use of extruded chickpeas in diets for growing-finishing pigs. **Czech Journal Of Animal Science**, v. 51, n. 8, p. 334, 2006.

CLAYDON, N.; ALLAN, M. Antifungal alkyl pirones of *Trichoderma harzianum*, **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 4, p. 503-513, 1987.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; 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, n. 3, p. 1579-1592. 2009.

DANIEL, H. C. F.; WILFREDO, F. F.; FRANCISCO, C. R.; GABRIEL, G. M.; EPIFANIO, C. A.; Antibiosis *in vitro* of *Trichoderma* strains metabolic extract on mycelial growth and reproductive capacity of *Fusarium oxysporum* isolated from pepper plants (*Capsicum annum L.*), **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 387-399, 2014.

DANIEL, J. F. S.; RODRIGUES FILHO, E. Peptaibols of *Trichoderma*. **Natural product reports**, v. 24, n. 5, p. 1128-1141, 2007.

DEMERS, J. E.; GARZÓN, C. D.; JIMÉNEZ-GASCO, M. D. M., Striking genetic similarity races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* confirms a monophyletic origin and clonal evolution of the chickpea vascular wilt pathogen. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 2, p. 303-318, 2014.

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, 1971c.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. Production of nonvolatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 25 -39, 1971a.

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

DUBEY, S. C.; SURESH, M.; SINGH, B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* for integrated management of chickpea wilt. **Biological Control**, v. 40, n. 1, p. 118-127, 2007.

DUBEY, S. C.; SINGH, S. R.; SINGH, B. Morphological and pathogenic variability of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 43, n. 2, p. 174-190, 2010.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F.; STEFANELLO, D. R.; ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 127-133, 2005.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle

de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*, **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 885-887, 2001.

EZIASHI, E. I.; UMA, N. U.; ADEKUNLE, A. A.; AIREDE, C. E. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystisparadoxa* in culture medium. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 9, 2006.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization, FAO Statistical Year Book, 2011 <http://www.faostat.fao.org>. Acesso em 24/06/2013

FERREIRA, A. C. P.; BRAZACA, S. G. C.; VALTER, A. Alterações químicas e nutricionais do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) cru irradiado e submetido à cocção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.80-88, 2006.

FORTES, F.O., SILVA, A.C.F., ALMANÇA, M.A.K.; TEDESCO, S.B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, v. 31, n. 2, p.221-228, 2007.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its bio-control. **New Phytologist**, v. 157, p. 493-502, 2003.

GAUR, P. M.; TRIPATHI, S. ;GOWDA, C. L. L.;RANGA RAO, G. V.; SHARMA, H.C.; PANDE, S.; SHARMA, M. **Chickpea Seed Production Manual**. India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 2010, 28 p.

GERLACH, W.; NIREMBERG, H. **The genus Fusarium: a pictorial atlas**. Berlin: Biologischen Bundesanstalt fur Land-und Forstwirtschaft, 1982. 406p.

GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 23, n. 11, p. 1011–1020, 1991.

GIORDANO, L. B. **Instruções Técnicas 14, Brasília**, Embrapa Hortaliças, 1998, p.3.

GURJAR, G. S.; BARVE, M. P.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 484-495, 2009.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant disease**, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

HARVERSON, R. M. Soilborne Root Diseases of Chickpeas in Nebraska, **Neb Guide**, Univesdity of Nebraska, 2011.

HAZANZADE, F.; RASTEGAR, M., JAFARPOUR, B.; KERMANI, M. Identification of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* the cause of root rot in chickpea and assessment of its genetic diversity using AFLP in Northeast Iran. **Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 7, p. 737-741, 2008.

HEPPERLE, D. **SeqAssem**©: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences: win32-version. Klein Raden: Sequentx, 2004.

HONNAREDDY, N.; DUBEY, S.C. Morphological characterization of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* 1. sp. *ciceris* causing chickpea wilt **Indian Phytopathology**, v. 60, n. 3, p. 373-376, 2007.

HOSSAIN, S; FORD, R.; NEIL, D. M.; PITTOCK, C.; PANOZZO, J. F. inheritance of seed size in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and identification of QTL based on 100-seed weight and seed size index. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 126-135, 2010.

INSAM, H., SEEWALD, M. S. A. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. **Biology and Fertility of soils** , v. 46, n. 3, p.199-213, 2010.

IQBAL, A.; ATEEQ, N.; KHALIL, I. A.; PERVEEN, S.; SALEEMULLAH, S. Physicochemical characteristics and amino acid profile of chickpea cultivars grown in Pakistan. **Journal of Foodservice**, v. 17, n. 2, p. 94-101, 2006.

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

JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, D.; LANDA, B. B.; KANG, S.;JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; NAVAS-CORTÉS, J. A. Quantitative and Microscopic Assessment of Compatible and Incompatible Interactions between Chickpea Cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Races. **PLoS ONE**, v.8, n.4, 2013.

JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, D.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; MONTES-BORREGO, M.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; LANDA, B. B. Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of Fusarium yellows in chickpea. **Plant Disease**., n. 95, v. 7, p. 860-870, 2011.

JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; MILGROOM, M. G.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. **Plant Pathology**, v. 51, n. 1, p. 72-77, 2002.

JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; NAVAS-CORTES, J.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum*: A case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. **Internacional Microbiology**, v. 7, p.95-104, 2004.



JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. **Phytopathology**, v. 93, p. 200-209, 2003.

JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; NAVAS-CORTES, J.; JIMÉNEZ-DIAZ, R. M. Evolucion de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, el agente de la Fusariosis vascular del garbanzo, en razas patogenicas y patotipos. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v. 31, p. 59-69, 2005.

JUKANTI, A. K.; GAUR, P. M.; GOWDA, C. L. L.; CHIBBAR, R. N. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 1, p.11-26, 2012.

JYOTSNA; SRIVASTAVA, A.; SINGH, R. P.; SRIVASTAVA, A. K.; SAXENA, A. K.; ARORA, D. K. Growth promotion and charcoal rot management in chickpea by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 48, n. 1, p. 81-92, 2008.

KESLER, A.; FORGÁCS, 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 Chromatographic Science**, v. 38, 2000.

KHAN, S. M.; YASSER, M., INAYATULLAH, I.; KHAN, M. A. Varietal screening of chickpea and the efficacy of different insecticides against chickpea pod borer *Helicoverpa armigera* (Hb.). **Gomal University Journal of Research**.v. 25, n. 1, p. 20-24, 2009.

KISTLER, H. C. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v. 27, n.4, p. 474–479, 1997.

LANDA, B. B., NAVAS-CORTÉS, J. A., JIMÉNEZ-GASCO, M. M., KATAN, J., RETIG, B., AND JIMÉNEZ- DÍAZ, R. M. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of Fusarium wilt. **Plant Disease** v. 90, p. 365-374, 2006.

LANDA, B. B.; NAVAS-CORTES, J. A.; JIMENEZ-DIAZ, M. Integrated management of fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance and biological control. **Phytopathology**, v. 94, p. 946-960, 2004.

LAURENCE, M. H.; SUMMERELL, B. A.; BURGESS, L. W.; LIEW, E. C. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal biology**, v. 118, n. 4, p. 374-384, 2014.

LESLIE, J. F. *Gibberella fugikuroi*: available populations and variable traits. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 282-291, 1995.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B.A; **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Blackwell Publishing Asia, Australia. 2006.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 3, p. 107-117, 2001.

LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*, **Biota Neotropica**, v. 9, n.3, 2009.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R; SILVA, A. C. F. D.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n.1, p. 274-288, 2012.

MAHERI-SIS, N.; CHAMANI, M.; ALI-ASGHAR, S.; MIRZA-AGHAZADEH, A.; AGHAJANZADEH-GOLSHANI, A. Nutritional evaluation of kabuli and desi type chickpeas (*Cicer arietinum* L.) for ruminants using in vitro gas production technique. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 16, 2010.

MAITI, R. K. The chickpea Crop. In: MAITI, R.; WHESCHE-EBELING, P. **Advances in Chickpea Science**. Enfield: Science Publishers Inc., p. 1-32, 2001.

MANARA, W.; RIBEIRO, N. D. Grão-de-bico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 359-365, 1992.

MANDHARE, V. K.; DESHMUKH, G. P., PATIL, J. V., KALE, A. A. Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* isolates from maharashtra, india. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 2, 2011.

MARGHEIM, J.;BALTENSPERGER, D. D.; WILSON, R. G.; LYON, D. J.; HEIN, G. L.; HARVESON, R. M.; BURGNER, P.; KRALL, J. M.; CECIL, J. T.; RICKERTSEN, J. R.; MERRIGAN, A. P.; WATSON, M. H.; HANSEN, B. J. **Chickpea Production In The High Plains**. University of Nebraska Cooperative Extension EC04- 183, Lincoln, Nebraska, 2004.

MEKI, S.; AHMED, S.; SAKHUJA, P. K. Control of chickpea wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*) using *Trichoderma* spp. in Ethiopia. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.44, n.5, 2009.

MELO, I. S.; FAULL, J. L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 1, 2000.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, Embrapa-CNPDA, p.135-156, 1991.

MERKUZ, A.; GETACHEW, A. Management of Chickpea Wild (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*) using *Trichoderma* spp. **International Journal of Current Research**, v. 4, n. 5, p. 128-134, 2012.

MOHAMMADI, H; BANIHASHEMI, Z. Distribution, pathogenicity and survival of *Fusarium* sp. the causal agents of chickpea wilt and root rot in the fars province of Iran. **Journal of plant Pathogen**, Iran, v. 41, p. 687-708, 2006.

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.1992.

MORADI, H.; BAHRAMNEJAD, B.; AMINI, J.; SIOSEMARDEH, A.; HAJI-ALLAHVERDIPOOR, K. Suppression of chickpea ('*Cicer arietinum*'L.) 'Fusariums' wilt by '*Bacillus subtilis*' and '*Trichoderma harzianum*'.**Plant Omics**, v. 5, n. 2, p. 68-74. 2012.

MORATH, U.; HUNG, R; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 73-83, 2012.

MOTA, T. C. Desempenho produtivo de grão-de-bico irrigado em função da época de plantio em Montes Claros-MG. Monografia- Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

MOTLAGH, M. R. S.; SAMIMI, Z..Evaluation of *Trichoderma* spp., as biological agents in some of plant pathogens.**Annals of Biological Research**, v. 4, n. 3, p. 173-179, 2013.

MUEHLBAUER, F.J.; TULLU, A. *Cicer arietinum* L. Disponível em: [HTTP://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/chickpea.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/chickpea.html). Acessado em: 24 jun.2013.

MULATU, A.; MEGERSA, N.; ALEMU, T. Characterization of fungal extracts from *Trichoderma* isolates: their effects against coffee wilt pathogen (*Gibberella xyloarioides*), **Ethiopian Journal of Science**, v., n. 2, p. 81-92, 2013.

NALIM, F. A.; SAMUELS, G. J.; WIJESUNDERA, R. L.; GEISER, D. M. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia**, v. 103, n. 6, p. 1302-1330, 2011.

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.; LANDA, B. B.; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, M. A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Quantitative modeling of the effects of temperature and inoculum density *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris races 0 and 5 on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. **Phytopathology**, v. 97, n. 5, p. 564-573, 2007.

NELSON, P. E.; TOUSON, T. A.; MARASSAS, W. F. O. **Fusarium species, an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.

NENE, Y. L.; REDDY, M. V.; HAWARE, M. P.; GHANEKAR, A. M.; AMIN, K. S.; PANDE, S.; SHARMA, M. **Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. Information Bulletin No. 28 (revised)**. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 2012.

NENE, Y. L.; SHEILA, V. K.; SHARMA, S. B. **A world list of chickpea and pigeonpea pathogens**, 5th edition, ICRISAT, Patancheru, India. 1996. 27p.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; MAGNON, K. C.; COX, P. A.; REVANKAR, S. G.; SANCHE, S.; GEISER, D. M.; JUBA, J. H., VAN BURIK J. A. H.; PADHYE, A.; ANAISSIE, E. J.; FRANCESCO, A.; WALSH, T. J.; ROBINSON, J. S. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5109-5120, 2004.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; SARVER, B. A. J.; BALAJEE, S. A.; SCROERS, H. J.; SUMMERBELL, R. C.; ROBERT, V. A. R. G.; CROUS, P. W.; ZHANG, AOKI, T.; JUNG, K.; PARK, J.; LEE, Y. H.; KANG, S.; PARK, B.; GEISER, D. M. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3708-3718, 2010.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*-*Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, Lawrence, v. 92, p. 919-938, 2000.

O'DONNELL, K., GUEIDAN, C., SINK, S., JOHNSTON, P. R., CROUS, P. W., GLENN, A., RILEY, R., ZITOMER, N. C., COLYER, P., WAALWIJK, C., VAN DER LEE, T., MORETTI, A., KANG, S., KIM, H.-S., GEISER, D. M., JUBA, J. H., BAAYEN, R. P., CROMEY, M. G., BITHELL, S., SUTTON, D. A., SKOVGAARD, K. R., KISTLER, P., ELLIOTT, H. C., DAVIS, M., SARVER, M. B. A. J., A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 12, p. 936-948, 2009.

O'DONNELL, K., SUTTON, D. A., FOTHERGILL, A., MCCARTHY, D., RINALDI, M. G., BRANDT, M. E., ZHANG, N., GEISER, D. M. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2477-2490, 2008.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

PANDE, S.; RAO, J. N.; SHARMA, M. Establishment of the chickpea wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in the soil through seed transmission. **Plant Pathology Journal**, v. 23, n. 1, p. 3-6, 2007.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de Lasiodiplodia theobromae. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 572-578, 2006.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – Uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas – usos e perspectivas**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, 341p.

RAO, P. P.; BIRTHAL, P. S.; BHAGAVATULA, S.; BANTILAN, M. C. S. **Chickpea and Pigeonpea Economies in Asia: Facts, Trends and Outlook**. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, Andhra Pradesh, India, 2010, p. 1–76 <http://oar.icrisat.org/id/eprint/191>

ROMEIRO, R. S. - **Controle biológico de doenças de plantas – procedimentos**. Viçosa, Editora UFV, 2007, 172 p.

RURAL NEWS. Conheça o cultivo do grão-de-bico, planta cultivada no cerrado e no sul do Brasil. Disponível em: <http://www.ruralnews.com.br/visualiza.php?id=267> <acesso em 20 de junho de 2013.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.

SCHROERS, H. J.; BAAYEN, R. P.; MEFFERT, J. P.; GRUYTER, J.; HOOFTMAN, M.; K. O'DONNELL. *Fusarium foetens*, a new species pathogenic to begonia elatior hybrids (*Begonia x hiemalis*) and the sister taxon of the *Fusarium oxysporum* species complex. **Mycologia**, v. 96, n. 2, p. 393-406, 2004.

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

SHARMA, S.; YADAV, N.; SINGH, A.; KUMAR, R. Nutritional and antinutritional profile of newly developed chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 2, p. 805-810, 2013.

SHI, M.; CHEN, L.; WANG, X. W.; ZHANG, T.; ZHAO, P. B.; SONG, X. Y.; SUN, C. Y.; CHEN, X. L.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 166-175, 2012.

SIDDIQUEE, S., CHEONG, B. E., TASLIMA, K., KAUSAR, H., HASAN, M. M. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. **Journal of chromatographic science**, v. 50, n. 4, p. 358-367, 2012.

SILVA, V. N.; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M. ; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro; **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n.12, p. 1609-1618, 2011.

SINGH, F.; DIWAKAR, B. **Chickpea botany and production practices**. Skill development series, n. 16, 1995.

SINGH, G.; CHEN, W.; RUBIALES, D.; MOORE, K.; SHARMA, Y. R.; GAN, Y. **Diseases and their management**. In: Chickpea Breeding and Management. CAB International, p. 497-519. 2007.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; KANNAN S.; SINGH, S. D.; Genetic variability of *Fusarium* wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.), **Mycopathologiam**, v. 155, p. 71-178, 2002.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. Kew: Common wealth Mycological Institute, 1994. 132p.

SMITH, S. N. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. **Plant Pathology Bulletin**, v. 16, n. 3, p. 97-120, 2007.

SOUTHWOOD, M. J. ;VILJOEN, A.; MOSTERT, L.; ROSE, L.J.; MCLEOD, A. Phylogenetic and biological characterization of *Fusarium oxysporum* isolates associated with onion in South Africa. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p.1250-1261, 2012.

SOUZA PEDRO, E. A.; HARAKAVA, R.; LUCON, C. M. M.; GUZZO, S. D. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p. 1589-1595, 2012.

STEFANELLO, L.; BONETT, P. L. *Avaliação do desenvolvimento de milho com Trichoderma spp.*, **Cultivando o Saber**. Cascavel, v. 6, n. 1, p. 121-127, 2013.

STOPPACHER, N.; KLUGER, B.; ZEILINGER, S.; KRŠKA, R.; 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, n. 2, p. 187-193, 2010.

SUGA, H.; HASENGAWA, T.; ITSUI, H, AGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Phylogenetic analysis and the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. **Mycological Research**, p. 1175-1183.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant disease**, v. 87, n. 2, p. 117-128, 2003.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAVANO, O. L.; SILVA JUNIOR, S. I.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Avaliação nutricional de proteínas do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) por método químico e microbiológico. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 1, p. 17-22, 2008.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D.M; HIBBETT, D. S FISHER, M. C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 1, p. 21-32, 2000.

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 DER MAESEN, L. J. G. Origin, history, and taxonomy of chickpea. IN:SAXENA, M. C. AND SINGH,K. B. **The Chickpea**, CAB International Publications, UK. 1987.

VIEIRA, R. F.; RESENDE, M. A. V. ; CASTRO, M. C. S. Comportamento de cultivares de grão-de-bico na Zona da Mata e Norte de Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p.166-170, julho 1999.

VINALE, F.; D'AMBROSIO, G.; ABADI, K.; SCALA, F.; MARRA, R.; TURRA, D.; WOO, S. L.; LORITO, M. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. **Journal of Zhejiang University Science** v. 30, p. 2-8, 2004.

VINALE, F.; MARRA, R.; SCALA, F.; GHISALBERTI, E. L.; LORITO, M.; SIVASITHAMPARAM, K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 143-148, 2006.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; BARBETTI, M. J.; LI, H.; WOO, S. L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n. 1, p. 80-86, 2008 a.

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

WESTERLUND, F. V.; CAMPBELL, R. N; KIMBLE, K. A. Fungal root rots wilt of chickpea in California. **Phytopathology**, v. 64, p. 432-436, 1973.

WIEST, A.; GRZEGORSKI, D.; XU, B. W.; GOULARD, C.; REBUFFAT, S.; EBBOLE, D. J.; BODO, B.; KENERLEY, C. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 23, p. 20862-20868, 2002.

WOOD, J. A.; GRUSAK, M. A. Nutritional value of chickpea. In YADAV, S. S.; REDDEN, R. R.; CHEN, W.; SHARMA, B. **Chickpea Breeding and Management**. CABI Publishing. Chapter 5, pp. 101-142. ISBN-13: 978-1845932138. 2007

YADAV, S. S.; LONGNECKER, N.; DUSUNCELI, F.; BEJIGA, G.; YADAV, M., RIZVI, A. H.; MANOHAR, M.; REDDY, A. A.; XAXIAO, Z.; CHEN, W. Uses, Consumption and utilization. **Chickpea Breeding and Management**, CAB International Wellingford, UK, p. 72-100, 2007.

ZAFARI, D.; KOUSHKI, M. M.; BAZGIR, E. Biocontrol evaluation of wheat take-all disease by *Trichoderma* screened isolates. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, 2008.

ZHANG, N.; O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; NALIM, F. A.; SUMMERBELL, R. C.; PADHYE, A. A.; GEISER, D. M. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2186-2190, 2006.



ZHANG, F.; YANG, X.; RAN, W.; SHEN, Q. *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. **FEMS Microbiology Letters**, v. 359 p.116–123, 2014.

ZOTE, K. K.; HAWARE, M. P.; JAYANTHI, S.; NARAYANA RAO, J. Effects of inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Race 1 and Race 2 on chickpea wilt. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 35, p. 43-47. 1996.

## APÊNDICE

TABELA 1

Quadro resumo da análise de variância da taxa de crescimento micelial dos isolados de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*

FV	GL	Quadrados Médios	
		Crescimento micelial	
Isolados de fusarium	13	99,04**	
Resíduo	26	4,92	
CV (%)		4,75	

Notas: \*\* Significativo a 1%

Fonte: Da autora

TABELA 2

Quadro resumo da análise de variância da inibição do crescimento micelial (ICM) de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* por isolados de *Trichoderma* sp. em cultivo pareado e atribuição de notas conforme Bell et al.(1982)

FV	GL	Quadrados Médios	
		<sup>1</sup> ICM	<sup>2</sup> Classificação
Trichoderma sp.	20	100,88**	0,46**
Fusarium spp.	1	1540,31**	4,57**
Tricoderma sp. x Fusarium spp.	20	58,72**	0,37*
Resíduo	84	19,32	0,18
CV (%)		11,34	23,82

Notas: <sup>1</sup>ICM- Inibição do crescimento micelial; <sup>2</sup> Classificação de acordo com escala de Bell et al.(1982).

\* Significativo a 5%; \*\* Significativo a 1%

Fonte: Da autora

**TABELA 3**

Quadro resumo da análise de variância da inibição do crescimento micelial (ICM) de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* por compostos orgânicos voláteis produzidos por *Trichoderma* sp. aos 3, 7 e 10 dia de incubação

		<b>Quadrados Médios</b>					
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b><i>F. solani</i></b>			<b><i>F. oxysporum</i></b>		
		<b>ICM 3°d</b>	<b>ICM 7°d</b>	<b>ICM 10°d</b>	<b>ICM 3°d</b>	<b>ICM 7°d</b>	<b>ICM 10°d</b>
<b>Tratamento</b>	12	100,11	465,83**	633,55**	592,75**	856,51**	811,80**
<b>Resíduo</b>	26	71,20	58,59	128,15	61,50	153,90	233,09
<b>CV (%)</b>		12,84	11,24	17,58	16,73	24,41	28,68

**Notas:**\*\* Significativo a 1%

**Fonte:** Da autora

TABELA 4

Quadro resumo da análise de variância da inibição crescimento micelial (ICM) de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* por compostos orgânicos não voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* sp. aos 3, 7 e 10 dias de incubação

FV	GL	Quadrados Médios					
		<i>F. solani</i>			<i>F. oxysporum</i>		
		ICM 3°d	ICM 7°d	ICM 10°	ICM 3°	ICM 7°	ICM 10°
<b>Tratamento</b>	12	0,074**	0,057**	0,041	0,031**	0,036**	0,025**
<b>Resíduo</b>	26	0,005	0,013	0,027	0,006	0,008	0,007
<b>CV (%)</b>		37,87	35,84	115,59	37,48	38,33	33,93

**Notas:**\*\* Significativo a 1%

**Fonte:** Da autora

**TABELA 5**

Quadro resumo da análise de variância do efeito do tratamento do solo com *Trichoderma* sp. sobre o crescimento e a massa fresca e seca de plantas de grão-de-bico cultivadas em solo infestado com *Fusarium solani*.

FV	GL	Quadrados Médios					
		CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
<b>Tratamento</b>	7	16,15	20,67	1,48	6,83	0,07	0,05
<b>Resíduo</b>	40	17,29	55,19	2,52	5,49	0,11	0,05
<b>CV (%)</b>		13,26	24,61	34,13	41,00	36,10	43,99

**Notas:** CPA- Comprimento de parte aérea; CR- Comprimento de raiz; MFPA- Massa fresca da parte aérea; MFR- Massa fresca da raiz; MSPA- Massa seca da parte aérea; MSR- Massa seca da raiz;

\*\* Significativo a 1%;\*Significativo a 5 %

**Fonte:** Da autora

**TABELA 6**

Quadro resumo da análise de variância do efeito do tratamento do solo com *Trichoderma* sp. sobre o crescimento e a massa fresca e seca de plantas de grão-de-bico cultivadas em solo infestado com *Fusarium oxysporum*

FV	GL	Quadrados Médios					
		CPA	CR	MFPA	MFR	MSPA	MSR
<b>Tratamento</b>	7	140,70**	39,27	5,62*	21,99**	0,18	0,12**
<b>Resíduo</b>	40	25,63	63,33	2,00	3,09	0,12	0,04
<b>CV (%)</b>		17,13	27,75	37,73	40,09	45,56	49,94

**Notas:** CPA- Comprimento de parte aérea; CR- Comprimento de raiz; MFPA- Massa fresca da parte aérea; MFR- Massa fresca da raiz; MSPA- Massa seca da parte aérea; MSR- Massa seca da raiz;

\*\* Significativo a 1%; \*Significativo a 5%

**Fonte:** Da autora

**TABELA 7**

Quadro resumo da análise de variância do comprimento da parte aérea e massa fresca de raízes de plantas de grão-de-bico em função da interação entre o tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. e *Fusarium* spp.

FV	GL	Quadrados Médios	
		<sup>1</sup> CPA	<sup>2</sup> MFR
Tratamento	6	70,75**	14,30**
Fusarium spp.	1	89,07	48,58**
Tratamento x Fusarium spp.	6	77,43**	10,46*
Resíduo	70	22,79	3,94
CV (%)		15,96	41,43

**Notas:**<sup>1</sup>CPA-Comprimento da parte aérea;

<sup>2</sup>MFR-Massa fresca de raiz;

\*\* Significativo a 1%; \*Significativo a 5%

**Fonte:** Da autora