IV CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS COINTER - PDVAgro 2019

**TRICHODERMA E BACTÉRIAS ENDOFITICAS PARA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO NA ACLIMATIZAÇÃO DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper
Nigrum L.*) PROVENIENTES DO CULTIVO IN VITRO**

**TRICODERMA Y BACTERIAS ENDOFITICAS PARA LA PROMOCIÓN DEL
CRECIMIENTO EN LA ACTIMIZACIÓN DEL REINO (*Piper Nigrum L.*) DESDE LA
CULTIVACIÓN IN VITRO**

**TRICHODERMA AND ENDOPHTIC BACTERIA FOR PROMOTION OF GROWTH
IN THE ACTIMIZATION OF KINGDOM (*Piper Nigrum L.*) FROM IN VITRO
CULTIVATION**

Apresentação: Comunicação Oral

Danielle Pereira Mendonça¹; Caroline Silva Ferreira²; Fernanda Beatriz Bernaldo da Silva³;
Andrey Nildo de Jesus da Luz Sousa Junior⁴; Oriel
Filgueira Lemos⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/2526-7701.IVCOINTERPDVAgro.2019.0136>

Resumo

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*) tem uma grande relevância no mercado econômico como a especiaria comercializada mundialmente, de grande valor. No entanto, a forma comercial de propagação é por estaquia, que se não usada corretamente favorece e disseminação do fungo *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*. O uso de microrganismos potencializam o crescimento vegetal e controle biológico de pragas e doenças de plantas. O objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento de mudas de pimenteira-do-reino (*Piper Nigrum L.*) provenientes do cultivo in vitro com o uso de microrganismos promotores de crescimento, trichoderma e bactérias endofíticas. O trabalho ocorreu em duas etapas do processo da micropropagação de plantas de pimenteira-do-reino: enraizamento e aclimatização. As plantas enraizadas in vitro de três genótipos foram submetidas à inoculação com 4 microrganismos e água como controle em delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 (genótipos H19; H5 e Takeshi) x 5 (3 bactérias (T1.1, C 3.5 e T 4.9; Trichoderma e água), totalizando 15 tratamentos com 3 repetições. A aclimatização ocorreu em casa de vegetação, durante 30 dias. Foram avaliadas altura (cm), número de folhas, número de raízes, comprimento da raiz (mm), massa fresca da parte aérea (g), massa seca da parte aérea (g), massa fresca das raízes (g), massa seca das raízes (g) Diâmetro do coleto (mm) e Número de entrenós, cujos dados foram submetidos às análises estatísticas de variância de testes de

¹ Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, daniellepereiraam@gmail.com

² Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, carolinesferreiras@gmail.com

³ Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Fernanda_bernaldo@hotmail.com.com

⁴ Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, andreynildo@gmail.com

⁵ Doutor em genética e melhoramento de plantas, Embrapa Amazônia Oriental, oriel.lemos@embrapa.br

comparação de médias. Na fase de aclimatização não é observado efeito significativo das bactérias endofíticas e do Trichoderma das plantas provenientes do cultivo in vitro em nenhuma das variáveis analisadas. Entretanto, há diferença entre os genótipos, com destaque para o híbrido intraespecífico 19.

Palavras-Chave: Aclimatização, formação de mudas, promotores.

Resumen

La pimienta negra (*Piper nigrum* L.) es de gran relevancia en el mercado económico como la especia altamente valorada que se comercializa en todo el mundo. Sin embargo, la forma comercial de propagación es mediante corte, que si no se usa correctamente favorece y propaga el hongo *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*. El uso de microorganismos potencia el crecimiento de las plantas y el control biológico de las plagas y enfermedades de las plantas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de plántulas de pimienta negra (*Piper Nigrum* L.) a partir del cultivo in vitro utilizando microorganismos promotores del crecimiento, trichoderma y bacterias endofíticas. El trabajo se llevó a cabo en dos etapas del proceso de micropropagación de plantas de pimienta negra: enraizamiento y aclimatación. Las plantas enraizadas in vitro de tres genotipos se inocularon con 4 microorganismos y agua como control en un diseño completamente al azar en disposición factorial 3 (genotipos H19; H5 y Takeshi) x 5 (3 bacterias (T1.1, C 3.5 y T Trichoderma y agua), totalizando 15 tratamientos con 3 repeticiones, la aclimatación se produjo en un invernadero durante 30 días, altura (cm), número de hojas, número de raíces, longitud de la raíz (mm), masa fresca brotes (g), masa seca del brote (g), masa fresca de la raíz (g), masa seca de la raíz (g) Diámetro del collarín (mm) y Número de entrenudos, cuyos datos se sometieron a análisis estadístico de varianza de las pruebas de comparación de medias. En la fase de aclimatación, no se observó ningún efecto significativo de las bacterias endofíticas y Trichoderma del cultivo in vitro en ninguna de las variables analizadas. entre genotipos, especialmente el híbrido intraespecífico 19.

Palabras Clave: Aclimatación, formación de plántulas, promotores.

Abstract

Black pepper (*Piper nigrum* L.) is of great relevance in the economic market as the highly valued spice traded worldwide. However, the commercial form of propagation is by cutting, which if not used correctly favors and spreads the fungus *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*. The use of microorganisms potentiates plant growth and biological control of plant pests and diseases. The objective of this work was to evaluate the growth of black pepper (*Piper Nigrum* L.) seedlings from in vitro cultivation using growth promoting microorganisms, trichoderma and endophytic bacteria. The work took place in two stages of the micropropagation process of black pepper plants: rooting and acclimatization. In vitro rooted plants of three genotypes were inoculated with 4 microorganisms and water as a control in a completely randomized design in factorial arrangement 3 (genotypes H19; H5 and Takeshi) x 5 (3 bacteria (T1.1, C 3.5 and T Trichoderma and water), totaling 15 treatments with 3 repetitions, acclimatization occurred in a greenhouse for 30 days, height (cm), number of leaves, number of

roots, root length (mm), freshmass. shoots (g), shootdrymass (g), root freshmass (g), root drymass (g) Colletdiameter (mm) andNumberofinternodes, whose data weresubmittedtostatisticalanalysis ofvarianceofmeancomparisonstests In theacclimatizationphase, no significanteffectofendophyticbacteriaand Trichoderma from in vitro cultivationwasobserved in anyofthevariablesanalyzed. amonggenotypes, especiallytheintraspecific hybrid 19.

Keywords: Acclimatization, seedlingformation, promoters.

Introdução

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é a mais importante especiaria comercializada mundialmente, de grande valor econômico e de uso em larga escala na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, a qual gera emprego e renda aos produtores (LIMA et al., 2010). Os maiores produtores mundiais são Índia, Vietnã, Indonésia e Brasil (IPC, 2016). A pimenteira-do-reino foi inserida no Brasil por colonos portugueses no século XVII, ficando limitada aos estados do litoral brasileiro. Contudo, o cultivo comercial somente se estabeleceu após a introdução da cultivar Cingapura por imigrantes japoneses, em 1933 no município de Tomé-Açu - PA, onde teve início a produção comercial, principalmente de pimenta preta e pimenta branca. Por volta de 1950, os japoneses e os brasileiros introduziram o sistema de cultivo intensivo praticado na Malásia, tornando o Brasil autossuficiente na produção da cultura (DUARTE & ALBUQUERQUE, 2005).

No cenário atual, o estado do Pará é responsável por cerca de 60% da produção nacional (57.379 t.) IBGE (2017). Neste estado, as microrregiões produtoras mais importantes são Guamá, Tomé-Açu, Bragantina e Cametá, representando 70,96% da quantidade total produzida (IBGE, 2014). No entanto, fatores como a ocorrência de doenças, com destaques a fusariose e viroses, reduzem o ciclo de vida da cultura, influenciam na oscilação do preço, elevam os custos de produção e tornam-se pontos determinantes para a queda da produção (LOURINHO, 2014).

O método mais comum de propagação da pimenteira-do-reino é a estaquia que, se não usado corretamente favorece a disseminação do *fungo Fusariumsolani f. sp. Piperis*, causador da fusariose (ALBUQUERQUE & DUARTE, 1977), que ocasionam prejuízos e queda da produção, e provocaram ao longo desses 30 anos a redução da vida útil dos pimentais da Amazônia de 12 a 15 anos para 4 a 6 anos (ALBUQUERQUE, 1961; DUARTE&ALBUQUERQUE, 1986; HAMADA et al., 1988). Além disso, a estaquia permite

a propagação de apenas 50 plantas em um ano e de plantas com dois anos ou mais de idade (MILANEZ et al., 1987)

A vulnerabilidade genética das cultivares à doença e a rápida disseminação do patógeno têm contribuído para a redução do ciclo da cultura (LEMOS et al., 2011). Entretanto, as técnicas de cultura de tecidos surgem como uma alternativa altamente viável para tentar solucionar os problemas relacionados ao cultivo e produtividade da pimenteira-do-reino a partir da rápida propagação de plantas com características agronômicas superiores e livres de doenças em larga escala e menor tempo por meio da micropropagação (MOURA et al., 2008). Outras medidas vêm sendo adotadas para o controle da fusariose como práticas culturais, obtenção de variedades resistentes e aplicação de fungicida (DUARTE&ALBUQUERQUE, 1980; ALBUQUERQUE et al., 1997; ANDO et al., 1997), mas têm se mostrado onerosas ou pouco eficientes. Daí a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas de controle, dentre as quais, o controle biológico com a utilização de microrganismos benéficos (COOK&BAKER, 1986; BAKER,1987) o qual tem sido apontado como opção viável diante da biodiversidade inexplorada existente na Amazônia (STEIN et al., 1996; ENDO et al., 1997).

Os microrganismos endofíticos são compostos principalmente por fungos e bactérias que habitam no interior dos vegetais e vivem comumente na parte aérea, ou seja, folhas, caules sem causar danos aparentes (AZEVEDO, 1998; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004; ASSUMPÇÃO et al., 2009). Esses microrganismos se diferenciam dos fitopatogênicos que causam doenças ao seu hospedeiro e também dos epifíticos que são aqueles que vivem na superfície de órgãos vegetais (AZEVEDO, 1998; SOUZA et al., 2004).

Os microrganismos endofíticos são eminentemente importantes para a agricultura e à indústria, sobretudo na alimentícia e farmacêutica; diversas espécies selecionadas de endófitos apresentam potencial de emprego nas indústrias de defensivos agrícolas, além de serem utilizadas como vetores genéticos. O empenho na utilização de microrganismos em práticas agrícolas cresceu significativamente nos últimos anos, pois tanto na elevação de crescimento vegetal como no controle biológico de pragas e doenças de plantas entre outras aplicações, eles se compõem em potenciais substitutos de produtos químicos, podendo beneficiar desta maneira a preservação do ambiente (SOUZA, 2001; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Isolados de *Trichoderma spp.* são relatados como possíveis parasitas de

invertebrados, graças à habilidade de produzir enzimas que degradam quitina e interferem na sobrevivência e/ou no antagonismo aos mesmos. O potencial uso de *Trichoderma spp.* em biorremediação e supressão de plantas invasoras que afetam cultivos de interesse econômico, vem sendo bastante estudado pois, os efeitos benéficos que ocorrem nas interações diretas com tais organismos, algumas espécies de *Trichoderma* são capazes de colonizar as superfícies de raízes e causar mudanças substanciais no metabolismo de plantas, de modo a promover o estímulo aos mecanismos de defesa das plantas, o aumento da disponibilidade de nutrientes e a tolerância ao estresse.

Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento de mudas de pimenteira-do-reino (*Piper Nigrum* L.) provenientes do cultivo *in vitro* com o uso de microrganismos promotores de crescimento, *trichoderma* e bactérias endofíticas.

Fundamentação Teórica

Há um grande potencial de microrganismos a serem usados na agricultura, dentre os grupos encontram-se aqueles associados à promoção de crescimento de plantas. Diante disso, o estudo desses microrganismos vem merecendo destaques durante os últimos anos, em razão da grande demanda por tecnologias sustentáveis, que podem reduzir os custos de produção, aumentar a produtividade e a rentabilidade do agronegócio (GOMES, et al., 2016).

Os microrganismos podem interagir de diferentes formas com as plantas, funcionando coletivamente como um microbioma. Podem colonizar virtualmente todos os tecidos internos das plantas, a superfície das folhas (filosfera) e os três compartimentos da raiz separadamente: rizosfera, rizoplane e endosfera. O efeito da interação planta-microrganismo pode ser benéfico para a planta hospedeira, auxiliando no seu desenvolvimento, ou tornando-se prejudicial quando o microrganismo parasita a planta levando à diminuição do seu crescimento ou à morte. Em ambos os casos, mostra-se importante o estudo dos grupos microbianos que se associam com as plantas visando compreender esta interação para estimular aqueles que auxiliam no desenvolvimento vegetal, bem como estabelecer formas de controle de fitopatógenos (MENDES et al., 2013).

A associação de plantas com bactérias benéficas vem adquirindo importância crescente no biocontrole de plantas e doenças. Sabe-se que algumas bactérias, mais especificamente as rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP), além de terem efeito como promotoras de crescimento, contribuem para aumentar a capacidade

competitiva do hospedeiro, o comportamento fisiológico de plantas tratadas com agentes de biocontrole vem sendo estudado visando comprovar mudanças fisiológicas associadas às infecções provocadas por determinados patógenos (ZHANG et al., 1996).

Ultimamente estão sendo formulados novos antibióticos, antimicrobianos, imunossupressores e compostos anticancerígenos que foram isolados e purificados a partir de microrganismos endofíticos (AZEVEDO, 1998). Alguns deles podem amplificar o crescimento das plantas relacionado à produção de fitohormônios ou à sua colaboração na aquisição de nutrientes vegetais, especialmente nitrogênio e fósforo (GAGNE-BOURGUE et al., 2013). A espécie *Azospirillum brasilense* produz ácido fenilacético, referente às auxinas, que diverge dos agentes patogênicos das plantas (ROMERO et al., 2003). A auxina e outros hormônios vegetais sintetizados por microrganismos podem ter ações antimicrobianas imediatas e também, impactar em outros processos fisiológicos, como crescimento e sinalização vegetal (MORSHED et al., 2005).

Metodologia

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia e casa-de-vegetação da Embrapa Amazônia Oriental, em duas etapas do processo da micropropagação de plantas de pimenteira-do-reino: aclimatização e formação de mudas. Foram utilizadas como fonte de explantes gemas apicais e axilares, que foram multiplicadas *in vitro*, para obtenção dos brotos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizados em arranjo fatorial 3 (genótipos) x 5 (4 promotores de crescimento e água como controle), totalizando 15 tratamentos com 3 repetições, sendo 3 genótipos: híbrido intraespecífico (Bento x Guajarina) denominado de H 19 , interespecífico (Bragantina x P.arborium) denominado H 09, Takeshi e 4 promotores de crescimento: três bactérias(T1.1, C 3.5 e T 4.9); o fungo (*Trichoderma*) e o tratamento controle (água). As bactérias endofíticas utilizadas foram provenientes do cultivo de pimenteira-do-reino em sistema de produção familiar, sendo as bactérias T1.1 e C3.5 do Monocultivo em Castanhal-PA, T4.9 do SAF (cacau, cupuaçu, banana, abacate e manga) em Tomé- Açu-PA; e o o o *Trichoderma sp.* de Castanhal- PA. Para a coleta de dados foram retiradas 6 plantas por tratamento, para a fase de aclimatização. Os dados foram submetidos às análises de variância pelo programa SAS (SAS institute, 2014) e teste de comparação de média de Tukey a 5% de probabilidade. As variáveis número de folha e massa seca da raiz, na fase de aclimatização, não apresentaram valores normais de

distribuição, por isso, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e o teste DAN 5% paracomparação de médias.

ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DOS GENÓTIPOS

Os explantes (segmentos nodais e ápices caulinares) provenientes de brotos *in vitro* foram cultivados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 0,05 mg L⁻¹ de ANA (Ácido naftalenoacético) com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm por 20 minutos. As condições de cultivo foram em sala de crescimento com condições controladas de temperatura (25 ± 3 °C), fotoperíodo de 16 h. e intensidade luminosa de 3.000 lux, por um período de cultivos *in vitro* durante seis semanas.

SUBMISSÃO DAS RAÍZES AOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO

Para a inoculação dos microrganismos nas raízes das plantas produzidas *in vitro*, inicialmente foram feitas as soluções de suspensão para as bactérias endofíticas T1.1, T4.9 e C3.5 seguido a metodologia de Mariano (2016) onde é preparado a suspensão em água. Após isso a solução foi ajustada a concentração para 108 UFC mL⁻¹. O Trichoderma foi cultivado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por 24hs com temperatura de 28°C durante 7 dias e para o preparo da solução foi realizado padronização da concentração de conídios para 1x10⁶ conídios/mL com auxílio da câmara de Neubauer. Após a retirada das plantas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, foi realizado a lavagem das raízes em água corrente para retirada do excesso de meio de cultura das raízes. Em seguida, as plantas foram emergidas nas soluções durante 30 minutos.

ACCLIMATIZAÇÃO

Em casa-de-vegetação, foram enraizados 15 brotos de pimenteira-do-reino por tratamento em soluções promotoras de crescimento os materiais foram transportados e colocados em vasos em formato de cone, contendo substrato de fibra de coco e vermiculita na proporção de 5:1, respectivamente, previamente umedecidos com água. Durante o período de cultivo, realizou-se aos 15 dias e depois aos 30 dias a nutrição das plântulas utilizando nutritiva com a metade da concentração de macro e micronutrientes de MS (½ MS) (MURASHIGE & SKOOG, 1962), além disso, as plantas foram irrigadas com água duas vezes ao dia durante 30 dias. Após esse período foram realizadas avaliações das variáveis: altura da planta (cm), número de folhas, número de raízes, comprimento da raiz (medido entre o coleto da planta e o ápice radicular mais distante) (mm), massa fresca da parte aérea (g), massa seca da parte aérea (g), massa fresca das raízes (g), massa seca das raízes (g), Diâmetro

do coleto (mm) e Número de entrenó. As mensurações para comprimento da raiz e diâmetro do coleto foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital (precisão de 0,01 mm), para a altura utilizou-se uma régua na medição. Para avaliação de massa seca, as plantas foram divididas em raiz e parte aérea (caule e folha) e cada parte foi armazenada em sacos de papel e levada para estufa de ventilação forçada a 65 °C, até atingirem massa seca constante (72 horas). De cada tratamento foram retiradas duas plantas para obtenção dos dados que foram submetidos às análises estatísticas.

Resultados e Discussão

No processo de aclimatização, os genótipos H9 e Takeshi na ausência dos microorganismos não demonstraram diferença significativa quando comparados aos tratamentos com o *Trichoderma* e T4.9 os quais obtiveram as menores médias de altura. O crescimento inferior das plantas na fase de aclimatização deve-se ao processo inicial de colonização das raízes pelos microrganismos. Este fato refletiu no comportamento das plantas do H19 sob as ações das bactérias C3.5 e T1.1 em comparação com o controle (água), em que as plantas submetidas à água apresentaram maior média de altura (8,47 cm), mas as diferenças para os promotores de crescimento T4.9 e *Trichoderma* não foram significativas. (Tabela 1). As médias obtidas das plantas sob a ação do *Trichoderma*, da bactéria T4.9 e da água, foram semelhantes quando se tratava do H19 (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito dos promotores de crescimento na altura de plantas de pimenteira-do-reino de diferentes genótipos após 30 dias na fase de aclimatização.

PROMOTORES	GENÓTIPOS		
	HÍBRIDO 19	HÍBRIDO 9	TAKESHI
Água	8,47 aA	5,43 aB	4,73 aB
C3.5	4,68 bA	5,27 aA	2,93 aA
T1.1	5,40 bA	5,17 aA	3,77 aA
T4.9	7,83 abA	5,47 aAB	3,15 aB
<i>Trichoderma</i>	6,60 abA	6,20 aAB	4,00 aB
CV %16			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Própria (2019)

Resultados semelhantes foram encontrados por Cruz (2018) ao utilizar o substrato fibra de coco no plantio de mudas de pimenteira-do-reino, onde a água destilada como tratamento controle e o *Trichoderma asperellum* obtiveram as maiores alturas, sendo considerado o *Trichoderma asperellum* de grande potencial como promotor de crescimento.

De acordo com Santos &Varavallo (2011), às bactérias endofíticas colonizam os tecidos vegetais internos, interagindo de forma benéfica à planta, produzindo substâncias que promovem o crescimento e ajudam no controle biológico de doenças. Entretanto, nesta fase de aclimatização estavam ainda no processo de colonização (Tabela 1).

As plantas no processo de aclimatização dos genótipos H09 e Takeshi tiveram comportamento semelhantes para a variável massa seca da parte aérea. Percebeu-se que a altura está relacionada com o peso da matéria seca da parte aérea, pois obteve um comportamento semelhante para essa variável em relação aos genótipos citados anteriormente (Tabela 1). As plantas do H09 submetidas às inoculações com a bactéria endofítica T4.9 (5,47cm) e o Trichoderma (6,20 cm) demonstraram comportamento semelhante àquelas do H19. Contudo, o H19 obteve maiores médias em relação a Takeshi (Tabela 1 e 2).

Tabela 2: Respostas quanto ação de promotores de crescimento para a variável massa seca da parte aérea de diferentes genótipos após 30 dias na fase de aclimatização.

GENÓTIPOS			
PROMOTORES	HÍBRIDO 19	HÍBRIDO 9	TAKESHI
Água	0,16 aA	0,09 aB	0,10 aB
C3.5	0,06 bA	0,10 aA	0,06 aA
T1.1	0,07 bA	0,05 aA	0,05 aA
T4.9	0,13abA	0,08 aAB	0,05 aB
Trichoderma	0,09 abA	0,11 aAB	0,06 aB
CV %	41,15		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.Fonte: Própria (2019)

Para as variáveis, pode-se observar também que não há efeito significativo para genótipo (Tabela 3) e para promotores de crescimento (Tabela 4) nas variáveis diâmetro do coleto e massa fresca da raiz, apresentando comportamentos semelhantes estatisticamente. A variável diâmetro do coleto é a mais utilizada para indicar a capacidade de sobrevivência das mudas em campo (DANIEL et al., 1997). Existe uma grande correlação entre a percentagem de sobrevivência de mudas após o plantio em campo e o diâmetro do coleto (SOUZA et al., 2006). Esses resultados diferem de Amaral et al. (2017) que analisando a eficiência da utilização de vermicomposto e ou isolados fúngicos do gênero Trichoderma como promotores de crescimento em mudas de carobas (*Jacarandamicrantha*) observou que houve aumento significativo no diâmetro do coleto quando o substrato foi inoculado com isolados de

Trichoderma sp.

Tabela 3: Efeito da ação de promotores de crescimento para comprimento de raiz (mm), diâmetro do coleto (mm), entrenós e massa fresca da raiz (g) para genótipos da pimenteira-do-reino após 30 dias na fase de aclimatização.

GENÓTIPO	COMPRIMENTO DE RAIZ (MM)	DIÂMETRO DO COLETO (MM)	ENTRENÓS	MASSA FRESCA DA RAIZ (G)
Híbrido 19	114,63a	2,33a	6,01a	0,15a
Híbrido 9	96,22a	2,44a	4,95b	0,11a
Takeshi	53,67b	2,22a	4,75b	0,11a
CV %	26,91	20,1	8,9	52,9

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Própria (2019).

Quanto ao número de entrenós, as plantas dos genótipos (Tabela 3) expressaram diferenças, em que o H19 gerou maior número de entrenós, mas os promotores de crescimento não influenciaram para essa diferença significativa (tabela 4). Ocorreu para comprimento de raiz, uma diferença significativa dos genótipos, o H19 e H09, tiveram médias de 114,63 mm e 96,22 mm, respectivamente, diferindo significativamente para o genótipo Takeshi com média 53,67 mm (Tabela 3). O bom desempenho dos híbridos 19 e 9 são resultados do programa de melhoramento genético da Embrapa Amazônia Oriental que visa a obtenção de híbridos que expressem caracteres produtivos superiores aos pais como produção de espiga/planta, comprimento das espigas, tamanho dos frutos, espessura da casca dos frutos, tamanho das sementes seca, peso das sementes seca, ou seja, são selecionados e reproduzidos para serem plantas superiores aos parentais (LEMOS et al., 2011).

A ação dos microrganismos como promotores de crescimento foi inicialmente inibitória nesta fase de aclimatização, pois o maior comprimento de raiz ocorreu no tratamento controle (119,69 mm) que diferiu significativamente da bactéria T1.1 e do Trichoderma, porém não diferiu significativamente das bactérias C3.5 e T4.9 (tabela 4). Dessa forma, as bactérias endofíticas possivelmente demonstram potencial efeito no crescimento das raízes. Hallmannet al., (1997) relatam que pesquisas demonstraram que bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas e os principais mecanismos pelos quais as bactérias endofíticas promovem o crescimento de plantas são a fixação de nitrogênio (BODDEY & DOBEREINER, 1995). De maneira semelhante, Chanway (1997) obteve aumento no comprimento de raízes das plântulas de tomateiro inoculadas com bactérias endofíticas.

Tabela 4: Efeito da ação de promotores de crescimento durante a fase de aclimatização para o Comprimento de raiz (mm), diâmetro (mm), entrenós e massa fresca da raiz (g) sob a ação de promotores de crescimento durante a fase de aclimatização de pimenteira do reino.

PROMOTORES DE CRESCIMENTO	COMPRIMENTO DE RAIZ (MM)	DIÂMETRO (MM)	ENTRENÓS	MASSA FRESCA DA RAIZ (G)
Água	119,69a	2,53a	5,43a	0,13a
T4.9	96,04ab	2,40a	5,27a	0,13a
C3.5	89,11ab	2,24a	5,18a	0,12a
Tricho	83,20bc	2,26a	5,27a	0,11a
T1.1	52,82c	2,20a	5,00a	0,12a
CV %	26,9	20,1	8,99	52,9

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Própria (2019).

Machado et al (2015) utilizaram o *Trichoderma spp.* na emergência e crescimento de mudas de cambará (*Gochnatiapolyomorpha*) obtiveram resultados semelhantes quanto ao comprimento da raiz pois, essa espécie apresentou bom crescimento mesmo sem a adição de trichoderma. Comparando os promotores de crescimento, é possível perceber a maior média para o tratamento controle, no entanto entre o promotor T4.9 e C3.5 não há uma diferença significativa quando comparados com a água. Ressalte-se que a aclimatização é uma fase de adaptação em que as plantas são transferidas do meio in vitro para o ex vitro, e também os microrganismos estão em processo de colonização e necessitam de assimilados da planta, passam por estresses, o que pode ter influenciado para redução do comprimento das raízes, mas para alguns promotores de crescimento essa redução não foi significativa (Tabela 3).

Para as variáveis número de folhas não houve diferença significativa para genótipos e nem entre os promotores de crescimento (Tabela 5 e 6). Resultado semelhante foi encontrado por Sousa (2017) ao verificar a Influência de Trichoderma sobre o crescimento inicial de plântulas de graviola ao constatar que o número médio de folhas foi estatisticamente semelhante.

Tabela 5: Respostas dos genótipos de pimenteira-do-reino quanto ao número de folhas e massa seca de raiz (g) após 30 dias na fase de aclimatização.

GENÓTIPO	NÚMERO DE FOLHAS	MASSA SECA DA RAIZ (G)
Híbrido 9	4,20 a	0,0210 a
Híbrido 19	4,00 a	0,0177 ab
Takeshi	5,12 a	0,0127 b
CV %	24,5	26,4

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Própria (2019).

Todavia, os híbridos obtiveram médias para a massa seca da raiz, semelhantes entre si, porém, o híbrido 9 diferiu significativamente do genótipo Takeshi. Por outro lado, os

promotores de crescimento não influenciaram positivamente para essa variável (Tabela 6). Resultados semelhantes foram encontrados por Carvalho (2009) ao estudar isolados de *Trichoderma* sp. como promotores de crescimento do feijoeiro observou que também não houve diferença significativa nos valores médios de massa seca da raiz das plantas de feijão.

Tabela 6: Respostas dos promotores de crescimento para número de folhas e massa seca de raiz (g) após 30 dias na fase de aclimatização.

PROMOTORES DE CRESCIMENTO	NÚMERO DE FOLHAS	MASSA SECA DA RAIZ (G)
Água	28,25 a	0,0225 a
C3.5	21,19 a	0,0138 a
T1.1	18,17 a	0,0128 a
T4.9	16,43 a	0,0200 a
Trichoderma	20,78 a	0,0183 a
CV %	21,5	26,1

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e pela mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Própria (2019).

É possível observar o comportamento dos genótipos sob o efeito dos promotores de crescimento, na fase de aclimatização após 30 dias (Figura 1 e 2).

Figura 1: Genótipos Takeshi e Híbrido 9 após 30 dias da inoculação dos promotores de crescimento.(A) takeshi e água, (B) Takeshi e Trichoderma, (C) Takeshi e T1.1, (D) Takeshi e C3.5, (E) Takeshi e T4.9, (F) Híbrido 9 e água, (G) Híbrido 9 e trichoderma, (H) Híbrido 9 e T1.1, (I) Híbrido 9 e C3.5, (J) Híbrido 9 e T4.9.

Fonte: Autores

Figura 2: Genótipos Híbrido 19 após 30 dias da inoculação dos promotores de crescimento.(L) Híbrido 19 e água, (M) Híbrido 19 e trichoderma, (N) Híbrido 19 e T1.1, (O) Híbrido 19 e C3.5, (P) Híbrido 19 e T4.9.

Fonte: Autores

Conclusões

O presente trabalho permite as seguintes conclusões:

- Na fase de aclimatização não é observado efeito significativo das bactérias endofíticas e do *Trichoderma* das plantas provenientes do cultivo in vitro em nenhuma das variáveis analisadas. Entretanto, há diferença entre os genótipos, com destaque para o híbrido intraespecífico 19;
- Em relação aos genótipos, o híbrido intraespecífico 19 se adapta melhor ao processo de aclimatização, seguido do híbrido interespecífico 09;
- Para maior eficiência das fases de aclimatização recomenda-se o híbrido 19 associado ao promotor de crescimento *Trichoderma*.

Referências

AMARAL, P. P.; STEFFEN, G. P. K.; MALDANER, J.; MISSIO, E. L.; SALDANHA, C. W. **Promotores de crescimento na propagação de caroba**. Pesquisa Florestal Brasileira, v. 37, n. 90, p. 149-157, 2017.

ASSUMPCÃO, L. C.; LAÇAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. **Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

AZEVEDO, G.B.A **Efeito de Trichoderma spp. no crescimento de mudas clonais de Eucalyptuscamaldulensis**.Sci. For., Piracicaba, v. 45, n. 114, p. 343-352, jun. 2017.

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J.L. **Microrganismos Endofíticos**. Embrapa Meio Ambiente, 1998.

BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. **Nitrogenfixationassociatedwith grasses andcereals: recentresultsandpespectives for the future research**. FertilizersResearch, v. 42, p. 241-250, 1995.

CARVALHO, D.D.C.; MARTINS, I.; LOBO JÚNIOR, M.; MELLO, S.C.M. **Isolados de Trichoderma sp. promotores de crescimento do feijoeiro (phaseolusvulgaris)**. Tropical plantpathology. Vol. 34 (Ago/2009). Brasília.

CHANWAY, C. P. **Inoculationoftree roots withplantgrowthpromotingsoilbacteria: anemergingtechnology for reforestation**. Forest Science, Bethesda, v. 43, p. 99- 112, 1997.

CRUZ, E.S. Taxa de Sobrevivência e Altura de Mudas de Pimenta-do-reino na Presença de Diferentes Espécies de Trichoderma. In: Encontro Nacional sobre substratos para plantas, 2018, Canela- RS. **Anais**.

DANIEL, O; C A, VITORINO,A.C.T.; ALOVISI, A.A. **Aplicação de fósforo em mudas de Acaciamangium WILLD**. Revista Árvore, v. 21, n. 2, p. 163-168, 1997.

COOK, R.J.; HENIS, Y. (Ed.). **Biologicalcontrolofsoil-borne plantpathogens**. Wallingford : CAB International, 1990. p.93-108.

ALBUQUERQUE, F.C.; DUARTE, M.L.R. **Pimenta do reino e suas doenças na região Amazônica**. Ciência Agrícola v.2,p.114–119, 1977.

GAGNE-BOURGUE F. et al. **Isolationandcharacterizationofindigenousendophyticbacteriaassociatedwithleavesofswitc hgrass (Panicumvirgatum L.) cultivars**. JournalofAppliedMicrobiology, v. 114, 3. Ed., p.836-853, 2013.

GOMES, E. A.; SILVA, U. de C.; PAIVA, C. A. O.; LANA, U. G. de P; MARRIEL, I. E.; SANTOS, V. L. dos. **Microrganismos promotores de crescimento de plantas**. Sete lagoas: Embrapa milho e sorgo, 2016. 51 p.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. **Bacterialendophytes in agriculturalcrops**. CanadianJournalofMicrobiology, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARMAN, G. E. **Mythand dogmas ofbiocontrolchanges in perceptionsderivedfromresearchontrichodermaharzianum T-22**. PlantDisease. V. 84, 377-393, 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – **SIDRA**. Produção agrícola municipal: Pará. Rio de Janeiro: IBGE; 2014 Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2012/default.shtm>. Acesso em: 30 de Jan. 2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – **SIDRA**. IBGE; 2014 Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2012/default.shtm>. Acesso em: 30 de Jan. 2017.

KLOEPPER, J.W. **Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents of soil-borne diseases**. In: METTING, B. (Ed.). Soil microbial technologies. New York : M. Dekker, 1993. p.255-274.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. **Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. Proceedings. Angers: Institut National de la Recherche, 1978. v.2, p.879-882.

LE MOS, O. F. de; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. de M.; MENEZES, I. C. de M.; MONDIN, M. Conservação e melhoramento genético da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) associado às técnicas de biotecnologia. Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2011. 45 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 375).

LIMA, J. S. S.; OLIVEIRA, R. B.; ROCHA, W.; OLIVEIRA, P. C.; QUARTEZANI, W.Z. **Análise espacial de atributos químicos do solo e da produção da cultura pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. IDESIA (Chile), v.28, n° 2, p. 31-39, Ag., 2010.

LOURINHO et al. **Conjuntura da pimenta-do-reino no mercado nacional e na região norte do Brasil**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Belém, PA, 2014.

MACHADO, D. F. M.; TAVARES, A. P.; SIDINEI, J. L.; SILVA, A. C. F. da. **Trichoderma spp. NA EMERGÊNCIA E CRESCIMENTO DE MUDAS DE CAMBARÁ (*Gochnati polymorpha* (Less.) Cabrera)**. Revista Árvore, Viçosa-MG, v.39, n.1, p.167-176, 2015.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. **The rhizosphere microbiome: significance of plant-beneficial, plant pathogenic and human-pathogenic microorganisms**. FEMS microbiology reviews, Amsterdam, v. 37, p.634-663, 2013.

MILANEZ, D.; VENTURA, J.A.; FANTON, C.J. **Cultura da pimenta-do-reino**. Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária-EMCAPA. 94 p. 1987.

MORSHED, M. G. et al. **Migratory songbirds disperse ticks across Canada, and first isolation of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from the avian tick, *Ixodes auritulus***. Journal of Parasitology, v. 91, p. 780-790, 2005.

MOURA, E. F.; MENEZES, I. C. de; LEMOS, O. F. de. **Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 72-76, jan./fev. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A **revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.** Physiologia Plantarum. Copenhagen. v. 15, p. 473–497, 1962.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Microrganismos endofíticos.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. **Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas.** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos.** Viçosa – MG, Ed. UFV, 2013a, 269 p

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. **Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico.** Ciências Biológicas e da Saúde, 32, 199-212, 2011.b

SAS INSTITUTE INC. **SAS University Edition: version for Windows.** Cary, NC, USA. SAS Institute, 2014.

SOUSA, A.C.L. **Uso de Trichoderma spp. na emergência de plântulas de graviola e produção de mudas em diferentes substratos e ambientes.** Pombal, 2017. 76f. : il. color.

SOUZA, C. A. M. et al. **Crescimento em campo de espécies florestais em diferentes condições de adubação.** Ciência Florestal, v. 16, n. 3, p. 243-249, 2006.

SOUZA, M. L. **Utilização de microrganismos na agricultura.** Biotecnologia, Piracicaba, n. 21, p. 28-31, 2001.

ZHANG, P.G.; SUTTON, J.C.; TAN, W.; HOPKIN, A.A. **Gliocladium roseum reduces physiological changes associated with infection of black spruce seedlings by Botrytis cinerea.** Canadian Journal of Plant Pathology, Guelph, v.18, p.7-13, 1996. Dordrecht : Kluwer Academic, 1991. p.211-220.