



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole da fusariose e na promoção de crescimento de mudas em pimenteira-do-reino na Amazônia Oriental

Jackeline Araújo Mota Siqueira

**Recife – PE
2024**

JACKELINE ARAÚJO MOTA SIQUEIRA

**POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE DA FUSARIOSE E NA
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS EM PIMENTEIRA-DO-REINO NA
AMAZÔNIA ORIENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira

Coorientadora: Dra. Alessandra Keiko Nakasone

Coorientadora: Dra. Iwanne Lima Coelho

**RECIFE – PE
FEVEREIRO - 2024**

**POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE DA FUSARIOSE E NA
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS EM PIMENTEIRA-DO-REINO
NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

JACKELINE ARAÚJO MOTA SIQUERA

Tese _____ e _____ pela banca examinadora em: __/__/____.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Delson Laranjeira

EXAMINADORES:

Dra. Alessandra Keiko Nakasone

Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto

Prof. Dr. Heráclito Eugênio Oliveira da Conceição

Dra. Ruth Linda Benchimol

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S618p

Siqueira, Jackeline Araújo Mota

Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole da fusariose e na promoção de crescimento de mudas em pimenteira do reino na Amazônia Oriental / Jackeline Araújo Mota Siqueira. - 2024.
85 f. : il.

Orientador: Delson Laranjeira.

Coorientadora: Alessandra Keiko Nakasone.

Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2024.

1. Controle biológico. 2. Biofertilizante. 3. *Piper nigrum*. 4. *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. I. Laranjeira, Delson, orient. II. Nakasone, Alessandra Keiko, coorient. III. Título

CDD 632

*Já caí e me quebrei
entre cacos e bagaços,
juntei meus próprios pedaços
e com lágrimas coleí.
Me refiz, me levantei
mais forte do que platina,
feito fogo em gasolina
que acende e vai se espalhando.
**O que aprendi chorando
sorriso nenhum ensina.***

Braulio Bessa

*Ao meu esposo, **Robson Siqueira** e minha filha, **Ester Siqueira**.*

OFEREÇO

*Ao meu sobrinho, **Gael Mota Guimarães** (In memoriam),
por sua angelical intercessão que restituiu minhas
forças para viver o luto à luz da fé e retomar minha
caminhada.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu amor maior, que com Suas mãos divinas me segurou e sustentou até aqui, não me deixando fraquejar diante das dificuldades. A Ele, toda honra e toda glória!

Ao meu esposo, Robson Siqueira, meu maior incentivador e suporte. Nada disso seria possível sem você.

A minha filha, Ester Siqueira, que foi uma fortaleza, mesmo com pouca idade, enfrentou a distância e me fortaleceu com seu sorriso.

A minha mãe, Edneuza e minhas irmãs Paula Karoline, Karine e Kamyla, que me impulsionaram com orações e palavras de apoio.

Aos amigos, família do coração, pelas orações, incentivo, orientação e, por muitas vezes, assumirem minha responsabilidade de mãe auxiliando na rotina da pequena Ester.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Delson Laranjeira, pela disponibilidade, respeito e confiança.

A minha coorientadora, pesquisadora Dra. Alessandra Keiko Nakasone, pelos ensinamentos valiosos, suporte na condução do trabalho, pela amizade construída e pela empatia demonstrada em todo o processo. Gratidão eterna!

A Dra. Iwanne Lima Coelho, coorientadora, que sempre me acolheu com respeito, amizade e extrema competência.

À Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, pelo incentivo à qualificação.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Amazônia Oriental, em especial, ao Laboratório de Fitopatologia por disponibilizar toda estrutura para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Núcleo de Estudo da Biodiversidade em Plantas Superiores da UFRA (EBPS), pelo suporte nas análises bioquímicas da pesquisa.

À Universidade Federal Rural do Pernambuco - UFRPE, ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia - PPGF/UFRPE e ao Laboratório de Fungo de Solo - LAFSOL/UFRPE, pela oportunidade de qualificação a nível de doutorado.

Aos docentes do PPGF/UFRPE, pelos ensinamentos transmitidos que robusteceram os conhecimentos em Fitopatologia.

Aos amigos do PPGF /UFRPE, Larissa Almeida, Erasmo Ribeiro, Jadson da Silva, Bruno Mendes e Felipe Araújo que tornaram essa trajetória mais leve.

Aos colegas, pesquisadores, técnicos, estagiários e assistentes do Laboratório de Fitopatologia/ Embrapa Amazônia Oriental por toda dedicação na condução do trabalho e amizade demonstrada.

Aos proprietários das áreas de cultivo de pimenteira-do-reino e ao viveiro ProMudas pelo apoio nas coletas para obtenção dos isolados e doação de todo material vegetal utilizado no trabalho, respectivamente.

Gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
1. A cultura da pimenteira-do-reino	11
2. A fusariose da pimenteira-do-reino.....	14
3. O controle biológico de doenças de plantas.....	16
4. Promoção de crescimento de plantas por microrganismos.....	18
5. Aspectos gerais de <i>Trichoderma</i> spp. e seu potencial de uso na agricultura.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO II	30
Desempenho de <i>Trichoderma</i> spp. oriundos de áreas da Amazônia Oriental no controle da fusariose da pimenteira-do-reino.....	31
Resumo	32
1. Introdução	34
2. Material e Métodos	35
3. Resultados	41
4. Discussão	49
5. Referências Bibliográficas.....	53
CAPÍTULO III	57
Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. como promotores de crescimento em mudas de pimenteira-do-reino na Amazônia Oriental.....	58
Resumo.....	59
1. Introdução	61
2. Material e Métodos	62
3. Resultados	66
4. Discussão	74
5. Referências Bibliográficas	79
CAPÍTULO IV	84
CONCLUSÕES GERAIS	85

Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole da fusariose e na promoção de crescimento de mudas em pimenteira-do-reino na Amazônia Oriental

RESUMO GERAL

Fungos do gênero *Trichoderma* spp. são reconhecidamente capazes de estabelecer interações benéficas com as plantas. Para o manejo eficiente da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) na região amazônica, métodos ecológicos que promovam o controle biológico de doenças fúngicas da cultura e o crescimento das plantas podem ser apontados como opções viáveis diante da biodiversidade inexplorada existente na Amazônia. Os objetivos do estudo consideram (i) obter isolados de *Trichoderma* spp. de áreas com *Piper* spp. na Amazônia Oriental, (ii) selecionar isolados antagonísticos a *F. solani* f. sp. *piperis* através de testes *in vitro*, (iii) avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em produzir enzimas líticas, (iv) determinar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. em reduzir a severidade da fusariose da pimenteira-do-reino, (v) determinar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. de produzir hormônio de crescimento vegetal e vi) investigar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. de promover crescimento em mudas de pimenteira-do-reino e avaliar seus efeitos nas respostas bioquímicas da planta. As coletas para obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp. foram realizadas em quatro municípios da Amazônia Oriental em áreas cultivadas com *Piper* spp. Um total de 80 isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos e avaliados em testes *in vitro* quanto a ação antagonística contra *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, agente causal da fusariose da pimenteira-do-reino, e quanto a capacidade de produzir enzimas líticas. Foram selecionados oito isolados antagonísticos (T9, T18, T44, T62, T69, T76, T77 e T80) nos testes *in vitro*, e avaliados quanto ao potencial de biocontrole sobre a fusariose em mudas pimenteira-do-reino. Os isolados de *Trichoderma* spp. também foram testados quanto a capacidade de produzir ácido indolacético-AIA. Os isolados que apresentaram os melhores resultados (T03, T05, T07, T08, T13, T15, T21, T42, T45, T56, T63) foram testados quanto seu efeito no crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. Foram avaliados o número de folha, número de entrenós, altura das mudas, comprimento da raiz, diâmetro do colo, massa fresca e seca da parte aérea e da raiz. Os efeitos da inoculação com *Trichoderma* spp. as respostas bioquímicas nas mudas foi avaliado por análises bioquímicas do material vegetal da folha e da raiz. Quanto aos testes de biocontrole, a maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. inibiram eficientemente o crescimento micelial do *F. solani* f. sp. *piperis* e produziram pelo menos uma enzima lítica. No ensaio *in vivo*, todos os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados mostraram atividade antifúngica significativa, variando entre 27,30% e 77,80% de redução da severidade dos sintomas da fusariose em relação a testemunha. Os isolados T18 e T80 foram selecionados como promissores agentes de biocontrole sobre a fusariose da pimenteira-do-reino. No ensaio de promoção de crescimento, alguns isolados de *Trichoderma* spp. proporcionaram crescimento das mudas de pimenteira-do-reino quando comparados ao tratamento controle, 60 dias após o transplântio. O isolado T21 foi o mais eficiente quanto as respostas de crescimento, podendo ser um possível promotor de crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. Respostas bioquímicas significativas nas mudas de pimenteira-do-reino, quanto as atividades relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, indicam um bom estado metabólico regulador da planta na presença de *Trichoderma* spp. As evidências fornecidas nesse estudo apoiam fortemente a possibilidade de usar *Trichoderma* spp. como um agente biocontrolador e promotor de crescimento seguro, ecologicamente correto e eficaz para a cultura da pimenteira-do-reino.

Palavras-chave: Controle biológico, biofertilizante, *Piper nigrum*, *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

Potential of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fusariosis and promotion of seedling growth in black pepper in the Eastern Amazon

GENERAL ABSTRACT

Fungi of the genus *Trichoderma* spp. are known to establish beneficial interactions with plants. For the efficient management of black pepper (*Piper nigrum* L.) in the Amazon region, ecological methods that promote the biological control of fungal diseases in the crop and plant growth can be considered viable options given the unexplored biodiversity existing in the Amazon. The objectives of the study include (i) obtaining *Trichoderma* spp. isolates from areas with *Piper* spp. in the Eastern Amazon, (ii) selecting isolates antagonistic to *F. solani* f. sp. *piperis* through in vitro tests, (iii) evaluating the ability of *Trichoderma* spp. isolates to produce lytic enzymes, (iv) determining the potential of *Trichoderma* spp. isolates to reduce the severity of black pepper fusariosis, (v) determining the capacity of *Trichoderma* spp. isolates to produce plant growth hormone, and (vi) investigating the ability of *Trichoderma* spp. isolates to promote growth in black pepper seedlings and evaluate their effects on plant biochemical responses. Collections for obtaining *Trichoderma* spp. isolates were carried out in four municipalities of the Eastern Amazon in areas cultivated with *Piper* spp. A total of 80 *Trichoderma* spp. isolates were obtained and evaluated in in vitro tests for antagonistic action against *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the causal agent of black pepper fusariosis, and for their capacity to produce lytic enzymes. Eight antagonistic isolates (T9, T18, T44, T62, T69, T76, T77, and T80) were selected in the in vitro tests and evaluated for their biocontrol potential on fusariosis in black pepper seedlings. *Trichoderma* spp. isolates were also tested for their ability to produce indoleacetic acid (IAA). The isolates that showed the best results (T03, T05, T07, T08, T13, T15, T21, T42, T45, T56, T63) were tested for their effect on the growth of black pepper seedlings. The number of leaves, number of internodes, height of seedlings, root length, stem diameter, fresh and dry mass of the aerial part and root were evaluated. The effects of *Trichoderma* spp. inoculation on seedling biochemical responses were evaluated by biochemical analyses of leaf and root plant material. Regarding biocontrol tests, most *Trichoderma* spp. isolates efficiently inhibited the mycelial growth of *F. solani* f. sp. *piperis* and produced at least one lytic enzyme. In the in vivo assay, all selected *Trichoderma* spp. isolates showed significant antifungal activity, ranging from 27.30% to 77.80% reduction in fusariosis symptom severity compared to the control. Isolates T18 and T80 were selected as promising biocontrol agents against black pepper fusariosis. In the growth promotion assay, some *Trichoderma* spp. isolates provided growth of black pepper seedlings when compared to the control treatment, 60 days after transplanting. Isolate T21 was the most efficient in growth responses, potentially being a growth promoter of black pepper seedlings. Significant biochemical responses in black pepper seedlings, regarding activities related to nitrogen metabolism, indicate a good metabolic regulatory state of the plant in the presence of *Trichoderma* spp. The evidence provided in this study strongly supports the possibility of using *Trichoderma* spp. as a safe, environmentally friendly, and effective biocontrol agent and growth promoter for black pepper cultivation.

Keywords: Biological control, biofertilizer, *Piper nigrum*, *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

CAPÍTULO I

Introdução Geral

POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. NO BIOCONTROLE DA FUSARIOSE E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS EM PIMENTEIRA-DO-REINO NA AMAZÔNIA ORIENTAL

INTRODUÇÃO GERAL

1. A CULTURA DA PIMENTEIRA-DO-REINO

A pimenta preta (*Piper nigrum* L.), também conhecida como pimenta redonda, pimenta da Índia e, no Brasil, pimenta-do-reino, é originária do Sul da Índia (SIM, 1986). Era chamada de pimenta de Portugal durante o período colonial e passou a se chamar pimenta-do-reino depois da colonização no Brasil. Foi introduzida no Brasil no Estado da Bahia, seguida de Maranhão e Paraíba, mas foi no Estado do Pará que a cultura ganhou escalas comerciais (ALIXANDRE *et al.*, 2022). Amplamente cultivada por imigrantes japoneses na região Amazônica na década de 1930, tornou-se fonte de renda de grandes e pequenos produtores e destaca-se desde a antiguidade como a especiaria mais importante comercializada mundialmente (ALBUQUERQUE *et al.*, 1971; DUARTE *et al.*, 2006).

A cultura ganhou tanto destaque no mercado mundial que alcançou espaço nas bolsas de valores, tornando-se uma commodity agrícola em função da demanda mundial e do preço elevado em determinadas safras, pago aos produtores (CARNEIRO JÚNIOR *et al.*, 2017). A produção dessa commodity agrícola está concentrada principalmente no continente asiático e na América do Sul (FAO, 2020). O Brasil apresenta destaque mundial como segundo maior produtor e exportador de pimenta-do-reino, detendo, junto com o Vietnã e Indonésia, 65% do mercado global do produto (FAO, 2020; PAES E CRUZ, 2022; VIDAL, 2020). O Brasil, no ano de 2022, produziu 128 mil toneladas da especiaria em uma área de 41 mil hectares (ha), com um rendimento médio de 3.107 Kg/ ha, movimentando quase 2 bilhões de reais no agronegócio brasileiro (IBGE, 2022).

No Brasil, atualmente, as principais regiões produtoras são os estados do Pará, Espírito Santo e, em menor volume, Bahia (CARNEIRO JÚNIOR *et al.*, 2017; IBGE, 2020; PAES; CRUZ, 2022). O estado do Pará historicamente sempre foi o maior produtor e exportador nacional, porém, nos últimos anos, o Espírito Santo apresentou grande expansão de área, ultrapassando o Pará em produção e exportação (MARTINS, 2020; PAES; CRUZ, 2022; VIDAL, 2020). Além disso, a cultura no Estado do Pará, nos últimos anos, sofre por falta de investimentos, redução de produção devido a doença fusariose ou técnicas de manejo inadequadas ou obsoletas, bem como, grandes oscilações de preço que causam diminuição da

rentabilidade do produtor (CARNEIRO JÚNIOR *et al.*, 2017).

O Pará e o Espírito Santo respondem por quase 90% da área plantada com pimenteira do reino no Brasil (IBGE, 2020). A concentração dos cultivos em algumas regiões do país deve-se a exigência da cultura por elevada temperatura, umidade do ar e precipitação. O estado do Pará apresenta a maior área plantada com pimenteira-do-reino do país, 43,8% em 2019, sendo que os principais municípios produtores estão situados no nordeste do Estado (IBGE, 2022; PAES; CRUZ, 2022; VIDAL, 2020).

A cultura da pimenteira-do-reino desempenha papel socioeconômico fundamental na agricultura familiar e no agronegócio, promovendo inclusão social e renda (ALIXANDRE *et al.*, 2022). No período de safra, no estado do Pará, a atividade emprega cerca de 70 a 80 mil pessoas, e divisas em torno de 50 milhões de dólares ao ano através das exportações (FILGUEIRAS *et al.*, 2012). A pimenta-do-reino é usada em larga escala como condimento devido ao seu componente pungente piperina, proporcionando sabor agradável e facilitando a digestão dos alimentos, sendo consumida também pelas indústrias de carnes e conservas e, ainda, nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e até defensivos agrícolas (FERNANDES, 2019; LEITE; BERTOTTI, 2020; MELO *et al.*, 2021; OLIVEIRA, 2020; REGO; SAAD *et al.*, 2022; SCHNABEL *et al.*, 2021; SILVA, 2017; TAKOREE *et al.*, 2019; VEIGA; MARCUCCI, 2018).

Em termos botânicos, o gênero *Piper* pertence à classe das Eudicotiledôneas, ordem *Piperales* e família das *Piperaceae* e apresenta grande biodiversidade (GBIF, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2020). A espécie *P. nigrum* é uma planta perene, arbustiva, semi lenhosa e trepadeira que cresce aderida a tutores de madeiras (estações) ou troncos de árvores. Apresenta flores muito pequenas, hermafroditas, em inflorescência tipo espiga. Apresenta inflorescência do tipo espiga e o fruto do tipo drupa com um endocarpo carnoso originado da parede interna do ovário. A pimenteira, na parte aérea, apresenta três tipos de ramos, sendo um chamado de ramo de crescimento (ou ortotrópico), que se desenvolve junto ao tutor, fixando-se a este por raízes adventícias grampiformes. O outro tipo de ramo é o produtivo (ou plagiotrópico), que se desenvolve lateralmente e há ainda, os ramos ladrões que se desenvolvem a partir da base ou das extremidades da planta. As folhas são sempre inteiras com disposição alternadas, pecioladas e localizadas à altura dos nós existentes nos ramos. O caule é formado por uma haste central que possui raízes adventícias, grampiformes, que se originam nos nós e aderem livremente no suporte e as hastes laterais que são desprovidas de raízes aderentes e cujas gemas originam as flores e frutos. O sistema radicular possui 3 a 6 raízes laterais fasciculadas, localizadas principalmente na profundidade de até 30 cm, no raio de aproximadamente 60 cm em torno da

planta, e uma raiz central que ajuda a fixar a planta no solo (BARRIGA, 1982; DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005).

A pimenteira-do-reino é uma planta tropical que requer condições climáticas quentes e úmidas para um bom desenvolvimento. Os fatores climáticos mais importantes incluem altas temperaturas, entre 25°C e 35 °C, luz solar intensa, precipitação pluviométrica anual entre 1.500 mm e 3.000 mm e umidade relativa acima de 80%. A planta necessita de solo rico em nutrientes que apresente boa drenagem e com teor de argila suficiente para reter a umidade relativa durante o período mais seco do ano (DIAS, 2014; DUARTE *et al.*, 2006).

A produção das pimenteiros indicada para escala comercial é através da propagação vegetativa via processo de estaquia (DUARTE, 1999; GOMES FILHO, 2017; SECUDINO 2012). No processo de estaquia deve-se observar à formação das mudas e as plantas matrizes que dão origem a essas mudas para se obter uma plantação uniforme e sadia (COSTA, 2020). Na propagação por estacas, os ramos de plantas adultas com aproximadamente 15 a 20 cm de comprimento (estacas) são enraizadas em canteiros utilizando substrato de casca de arroz carbonizada, vermiculita ou, principalmente, areia branca. As estacas são colocadas ligeiramente inclinadas, enterrando-se os dois nós e deixando-se a folha de fora. As mudas devem permanecer durante 20 a 30 dias nos propagadores e, quando as estacas começarem a brotar, é feito o transplântio para sacos plásticos pretos perfurados (LEMOS; POLTRONIERI; TREMACOLDI, 2014).

Várias são as cultivares de pimenteira-do-reino identificadas na literatura e algumas dessas são exploradas nas principais regiões produtoras do Brasil, como Apra, Cingapura, Clonada, Bragantina, Guajarina, Kottanadan e outras (BARATA *et al.*, 2021; CHEN; DAYOD; TAWAN, 2018; DUARTE, 2004; LEMOS *et al.*, 2014; NILO *et al.*, 2017). Cada cultivar apresenta características agrônômicas próprias que incluem, por exemplo, frutificação, ciclo de maturação, arquitetura da planta, colheita e rendimento médio (POLTRONIERI; LEMOS, 2014). A Embrapa Amazônia Oriental desenvolve pesquisas com a finalidade de lançar novas cultivares, como a nova cultivar “Embrapa/Clonada” com características diferenciadas e vantajosas de frutificação, colheita, rendimento, livre de vírus, entre outros, obtidas a partir de um longo processo de seleção no campo, germinação *in vitro* das sementes dessas plantas em laboratório e clonagem para garantir que as mudas produzidas pelo processo de micropropagação mantenha fidelidade às matrizes (Oriol Lemos, comunicação pessoal, 9 de fevereiro de 2023). No entanto, a vulnerabilidade genética das cultivares amazônicas e a ausência de fusariose na Índia, centro de diversidade de *P. nigrum*, constituem as principais limitações para o melhoramento genético da pimenta-do-reino (POLTRONIERI *et al.*, 2020).

O ciclo produtivo da pimenteira-do-reino pode ser superior a 12 anos, sofrendo influência de fatores como condições climáticas, variedade genética, práticas culturais empregadas e principalmente fatores fitossanitários, como a fusariose da pimenteira-do-reino, que pode reduzir drasticamente a vida útil da cultura (COSTA, 2020; TREMACOLDI, 2010, 2014). No Brasil, além da fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperi* F.C. Albuquerque.), doença mais importante da cultura, outras doenças fúngicas também acometem pimenteira-do-reino como a murcha amarela (*Fusarium oxysporum* Schltdl.), queima-do-fio (*Koleroga noxia* Donk) e antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc.) (TREMACOLDI, 2010).

2. A FUSARIOSE DA PIMENTEIRA-DO-REINO

A fusariose da pimenteira-do-reino, também conhecida por podridão-das-raízes, foi detectada pela primeira vez no Estado do Pará em 1957 (ALBUQUERQUE; FERRAZ, 1976; ALBUQUERQUE; DUARTE, 1991) e está, atualmente, disseminada em todos os estados brasileiros produtores de pimenta-do-reino (LOURINHO *et al.*, 2014). A doença, de ocorrência restrita ao Brasil, é a mais devastadora da cultura causando redução na produção e na vida útil das pimenteiras nas regiões produtoras para apenas quatro a cinco anos (CARDEIRO JÚNIOR *et al.*, 2017; LOURINHO *et al.*, 2014; TREMACOLDI, 2010). As perdas são da ordem de 10 milhões de dólares anuais e redução de, aproximadamente, 3% da área cultivada anualmente, com uma produtividade média diminuída pela metade, de 4,0 t/ha para de 2,0 t/ha (CARDEIRO JÚNIOR *et al.*, 2017; TREMACOLDI, 2010).

O agente causal da fusariose da pimenteira-do-reino é o fungo *Fusarium solani* Mart. (Sacc.) f. sp. *piperis* Albuquerque. (Teleomorfo: *Nectria haematococca* Berk & Br. f.sp. *piperis* Albuquerque.). Pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Nectriaceae (ALBUQUERQUE; FERRAZ, 1976; DUARTE; ALBUQUERQUE; ALBUQUERQUE, 2005; INDEX FUNGORUM, 2023). Em meio de cultura batata-dextrose-água (BDA), o fungo apresenta crescimento lento, demorando de nove a dez dias para que a colônia alcance um diâmetro de nove centímetros. Produz macroconídios e microconídios, podendo formar estrutura de resistência denominada clamidósporos. Suas hifas são hialinas septadas e os conidióforos são longos, cujas colônias têm aparência cotonosa, inicialmente brancas, chegando a um vermelho intenso (TREMACOLDI, 2010; VAZ, 2013).

As populações do complexo de espécies de *Fusarium solani* são importantes agentes etiológicos de várias doenças de plantas que apresentam variações em sua morfologia, fisiologia e patogenicidade. Dentro de cada espécie de *Fusarium* pode haver subdivisão ou *forma specialis* (EDEL *et al.*, 1997; ŠIŠIĆ *et al.*, 2018). O conceito forma *specialis* é aplicado para

reconhecer isolados fitopatogênicos que apresentam características morfológicas semelhantes a isolados saprofíticos de mesma espécie, mas que diferenciam em sua habilidade para parasitar hospedeiros específicos (MICHEREFF, 2001; SNYDER; HANSEN, 1953). Estudos comprovaram a especificidade de isolados patogênicos de *F. solani* à pimenteira-do-reino quando não observaram infecções em mudas de feijão, ervilha, abóbora e batata inoculadas com *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. Uma vez que a inoculação do mesmo isolado em mudas de pimenteira-do-reino resultou no desenvolvimento dos sintomas da doença, os autores atribuíram a denominação forma *specialis piperis* (ALBUQUERQUE; FERRAZ, 1976).

O fungo *F. solani* f. sp. *piperis* habita, naturalmente, os solos e sobrevive tanto na planta quanto na matéria orgânica do solo, como saprófita (MATOS; REINHARDT, 2009; TREMACOLDI, 2010). O modo de penetração do fungo nas raízes ainda não foi completamente esclarecido, mas acredita-se que seja de forma direta por meio de germinação de clamidósporo ou macroconídios que entram em contato com o sistema radicular das plantas. De forma natural, observa-se que a infecção inicial pode ocorrer pelas raízes mais jovens e raízes secundárias, em plantas com mais de dois anos de idade. O período chuvoso favorece a multiplicação do patógeno e o avanço da colonização dos tecidos das raízes em uma mesma planta, bem como a disseminação da doença entre plantas vizinhas (TREMACOLDI *et al.*, 2010; SCHERM; YANG, 1996; VENTURA; COSTA, 2004).

Quanto aos sintomas da doença, a infecção da fusariose geralmente inicia pelas raízes mais jovens e secundárias de plantas com mais de 2 anos de idade. Com isso, as raízes apodrecem e os sintomas reflexos na parte aérea das pimenteiras tornam-se mais visíveis, como o amarelecimento, murcha e necrose das folhas. No estágio avançado, a podridão alcança o colo da planta, ficando visível o escurecimento dos tecidos internos do caule. Como o período chuvoso favorece a fusariose, nas condições paraenses de cultivo é comum as plantas morrerem depois de 2 ou 3 anos com a doença (TREMACOLDI *et al.*, 2014).

O manejo da fusariose é dificultado pela forma de sobrevivência do patógeno, sua alta capacidade de competição saprofítica e pela impossibilidade de diagnosticar a infecção inicial nas raízes no ambiente subterrâneo. Devido à ausência de produtos químicos eficientes ou cultivares comerciais resistentes, o controle indicado para *F. solani* f. sp. *piperis* ainda é a prevenção como o uso de mudas de alto padrão fitossanitário e monitoramento em campo. O controle alternativo com o uso de resíduos orgânicos como carapaça de caranguejo, casca de mandioca e folhas de nim são reportados como positivos em resultados de pesquisa (AGROFIT, 2023; BENCHIMOL; SUTTON; DIAS-FILHO, 2006; D'ADDAZIO *et al.*, 2016; ROCHA *et*

al., 2016; TREMACOLDI, 2010, 2014). Com isso, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos de controle, entre os quais o controle biológico, através da utilização de microrganismos antagonistas, tem sido apontado como opção viável em vários patossistemas (BETTIOL; MORANDI, 2009; O'BRIEN, 2017).

3. O CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS

A crescente necessidade na demanda de alimentos devido ao crescimento populacional, a maior concentração da população nas cidades e o aumento da renda per capita fez com que a atenção agrícola fosse voltada para o aumento da produtividade e diminuição das perdas da produção e rendimento anual devido a pragas e doenças (SAATH; FACHINELLO, 2018; VALIN *et al.*, 2014). Apesar da contribuição inegável do uso do controle químico no manejo de doenças de plantas visando a segurança alimentar, uma preocupação crescente são os efeitos negativos desse método sobre a saúde humana e o meio ambiente (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

Com isso, o controle biológico ou biocontrole ganhou espaço e vem se consolidando com uma ferramenta importante no manejo de doenças de plantas podendo gerar efeitos na produção de alimentos, suprimento de nutrientes e equilíbrio ambiental, afetando assim o desenvolvimento econômico e a sustentabilidade ecológica (O'BRIEN, 2017; HE, D. - C. *et al.*, 2021). Além disso, mostra-se como um meio alternativo de controle de doenças de plantas onde a resistência a doenças ou o controle químico não estão disponíveis (COLLINGE, 2022).

O controle biológico pode ser conceituado simplesmente como “o controle de um organismo por outro organismo, ou ainda o controle de um agente causal de uma doença de planta por um microrganismo antagonista” (MEYER; MAZARO; DA SILVA, 2019, p. 21). Contudo, o conceito mais aceito pela comunidade é o de Cook e Baker (1983), para os quais o “controle biológico é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem”.

Os organismos envolvidos no controle biológico são indivíduos ou populações avirulentas ou hipovirulentas, denominado agente de controle biológico - BCA, inseridas nas espécies patogênicas (BETTIOL; MORANDI, 2009; JENSEN *et al.*, 2016; TRONSMO *et al.*, 2020). Esse método de controle baseia-se nas relações antagônicas que ocorrem entre diferentes populações de microrganismos presentes na natureza e que mantêm o equilíbrio ecológico entre essas comunidades em um dado hábitat (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016). Os fungos com potencial antagônico constituem os principais agentes microbianos utilizados para

essa finalidade, espécies de leveduras e do gênero *Trichoderma* são os mais relatados, e estudados no controle de fitopatógenos (AHMED; EL-FIKI, 2017; DRUZHININA *et al.*, 2011; MACHADO, *et al.* 2012; MEYER *et al.*, 2019; SWAIN; MUKHERJEE, 2020).

O conhecimento dos mecanismos de antagonismo é essencial no desenvolvimento de modelos racionais para a introdução de biocontroladores em agroecossistemas. As relações antagônicas com potencial uso no controle biológico de doenças de plantas são (1) competição de exploração por recursos como espaço físico, nutrientes, microelementos, oxigênio, água e luz (2) competição de interferência por espaço via antibiose onde o BCA inibe o patógeno por meio de efeitos de metabólitos secundários tóxicos; (3) parasitismo ou hiperparasitismo, onde o antagonista atua como predador e explora o patógeno como presa; (4) resistência induzida, onde ocorre uma interação indireta de um BCA via indução de mecanismos de defesa da planta contra patógenos invasores (GHORBANPOUR *et al.*, 2018; JENSEN; KARLSSON; LINDAHL, 2017; MEDEIROS *et al.*, 2018; MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019; SPADARO, 2016).

A competição é um mecanismo de ação de importância destacada devido ao alto poder dos BCA em colonizar os substratos utilizando uma diversidade de nutrientes e à vulnerabilidade de vários patógenos frente à falta de alguns desses nutrientes. Essa característica adaptativa para utilizar diversas fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio e ferro permite aos BCA uma acelerada multiplicação, ocupando os espaços onde há água, luz e mais nutrientes disponíveis (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

Na antibiose, mecanismo comparado com a ação de fungicidas, os compostos antimicrobianos, principalmente metabólitos secundários que incluem substâncias voláteis e não voláteis atuam diretamente sobre o patógeno, alterando a sua fisiologia ou crescimento através da alteração da permeabilidade de membrana plasmática e degradação celular (MEDEIROS *et al.*, 2018; MELLO, *et al.*, 2020, TARIQ *et al.*, 2017).

Quanto é observado um enfrentamento direto onde o BCA responde a estímulos químicos produzidos pelas hifas do patógenos e cresce em direção ao mesmo, tem-se o parasitismo. Em alguns casos o hiperparasita é capaz de enrolar-se em toda a extensão do patógeno, penetrar as células e digerir seu conteúdo (MACHADO, *et al.* 2012). Contudo, a penetração não é primordial para o enfrentamento, muitas vezes apenas o contato físico entre os microrganismos é suficiente para que enzimas sejam liberadas pelo hiperparasita cause desestabilidade estrutural da membrana e morte das células do patógeno (MEDEIROS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2022). A produção de enzimas líticas são características fundamentais dos BCA na prevenção do desenvolvimento de patógenos (XIE *et al.*, 2016). O BCA produz

diferentes enzimas líticas, como as quitinases, proteases, lipases e esterases (LANTEIGNE *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2023).

Nas plantas, fungos e bactérias podem desempenhar um importante papel desencadeando a indução de resistência. Com isso, podem fortalecer e estimular o sistema de defesa inato da planta contra ataques patogênicos subsequentes com ativação de resistência local ou sistêmica, agindo como um mecanismo de controle biológico indireto (MELLO *et al.*, 2020). A ativação das respostas de defesa das plantas se inicia pelo reconhecimento do agente indutor ou do patógeno. No caso do patógeno, o reconhecimento pode ser mediado por receptores de reconhecimento (PRRs) de padrões moleculares associados aos patógenos/ microrganismos (PAMPs/MAMPs) ou pela interação entre os genes de resistência (R) da planta e efetores do microrganismo. Após o reconhecimento, uma série de mudanças nos padrões transcricionais da célula vegetal ocorre, visando à defesa. Alguns dos mecanismos de defesa ativados podem envolver: produção de espécies reativas de oxigênio, ocasionando a explosão oxidativa na célula desafiada, constituindo o que se conhece como reação de hipersensibilidade (RH); ativação de genes de defesa; síntese de compostos tóxicos como as fitoalexinas; síntese de compostos capazes de promover mudanças estruturais na parede celular (DALLAGNOL; ARAÚJO FILHO, 2018).

Acredita-se que poucos organismos exerçam um único mecanismo antagônico. Assim, os antagonistas podem atuar através de um ou mais mecanismos, aumentando as chances de sucesso do controle biológico (MEDEIROS *et al.*, 2018). O uso prático de agentes de biocontrole requer métodos de aplicação e dosagens adequadas dos produtos formulados, a fim de garantir proteção da planta ao ataque dos fitopatógenos. Outro desafio para uso do controle biológico no campo é a resistência devido as mutações, transferência de genes ou imunização (MARIANO; SILVEIRA; GOMES, 2005).

4. PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS POR MICRORGANISMOS

A promoção de crescimento de plantas por microrganismos é um tema de pesquisa em constante evolução, as interações planta-microrganismo é objeto de vários estudos visando o desenvolvimento sustentável e a preservação do meio ambiente. Estudos têm mostrado que uma diversidade de microrganismos apresenta uma relação benéfica com as plantas, colonizando suas raízes e promovendo o crescimento do hospedeiro devido á ação de vários fatores, seja pela produção de hormônios vegetais, aminoácidos, absorção de nutrientes e até mesmo inibição de fitopatógenos (DIAS-FILHO; GURGEL, 2021; ETESAMI; GLICK, 2020; HAKIM *et al.*, 2021; LOPES; STENBERG *et al.*, 2021). Com isso, a inoculação de microrganismos

promotores de crescimento em culturas agrícolas pode aumentar a biomassa vegetal, melhorar a produtividade das culturas, estimular a respiração, melhorar a fotossíntese, aumentar a tolerância das plantas a estresses abióticos e minimizar o uso de fertilizantes químicos conferindo sistemas agrícolas mais sustentáveis e ecologicamente corretos (ABHILASH *et al.*, 2016; ASGHARI; KHADEMIAN; SEDAGHATI, 2020; SILVA *et al.*, 2022; ETESAMI; GLICK, 2020; MIMMO *et al.*, 2018).

Quanto aos mecanismos de ação que exercem efeitos positivos no crescimento das plantas tem-se a produção de fitohormônios, ou seja, ação bioestimulante, que por sua vez, influenciam em processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas em concentrações muito baixas como mensageiros químicos. O ácido indol-acético (AIA), fitohormônio geralmente investigado em testes de seleção de microrganismos promotores de crescimento em plantas (MPCP), é uma auxina comum e bem caracterizada que apresenta o triptofano como principal precursor de sua biossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013; UBIRACI *et al.*, 2017). A maioria dos microrganismos que habitam a rizosfera são capazes de sintetizar e liberar auxina. A auxina produzida por microrganismos aumenta a auxina na planta promovendo o aumento na absorção de nutrientes e água (OLEŃSKA *et al.*, 2020). Este hormônio desempenha um papel importante na regulação da divisão celular, crescimento de brotos, diferenciação de tecido vascular e no desenvolvimento de raízes, além de contribuir para processos como fotossíntese, biossíntese de metabólitos e resistência ao estresse (TAIZ; ZEIGER, 2013; MAHESHWARI; DHEEMAN; AGARWAL, 2015).

A capacidade do microrganismo em colonizar as raízes é o fator chave para sua interferência no crescimento e produtividade da planta (HERRERA-JIMÉNEZ *et al.*, 2018). Além da ação bioestimulante, os MPCP também apresentam o mecanismo de ação biofertilizante quando aumentam a disponibilidade de substâncias presentes no próprio ambiente para o desenvolvimento da planta, tais como a fixação biológica do nitrogênio, solubilização do fósforo e produção de sideróforos (LOPES; DIAS-FILHO; GURGEL, 2021; SILVIA; DOURADO, 2022). Algumas espécies de *Trichoderma* podem colonizar as raízes de plantas e aumentar a área total do sistema radicular levando a mudanças significativas no metabolismo das plantas. Assim, os MPCP permitem as plantas maior acesso aos minerais presentes no solo atuando positivamente na absorção de nutrientes pelas plantas, acarretando o crescimento vegetal (HAKIM *et al.*, 2021; RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Além de inúmeras funções dos MPCP na promoção direta do crescimento vegetal, esses microrganismos também atuam como agentes de biocontrole, promovendo o crescimento vegetal de forma indireta participando do manejo de doenças de plantas contribuindo para um

sistema de produção mais sustentável (MEDEIROS *et al.* 2018; SILVIA; DOURADO, 2022). Os mecanismos de ação dos MPCP carecem de muitos estudos, ainda não foi dominado as complexas interações ecológicas que ocorrem entre microrganismo, planta e solo (SILVIA; DOURADO, 2022).

5. ASPECTOS GERAIS DE *Trichoderma* spp. E SEU POTENCIAL DE USO NA AGRICULTURA

O gênero *Trichoderma* é amplamente estudado e conhecido por sua capacidade de promover o crescimento de plantas, agindo como um biocontrolador natural contra diversos patógenos do solo (MEYER; MAZARO; SILVA, 2019; MUKHOPADHYAY; KUMAR, 2020; TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022). De acordo com Mycobank (2023), *Trichoderma* Persoon (1794) pertence ao Reino Fungi; Filo *Ascomycota*; Ordem *Hypocreales*; Família *Hypocreaceae*; Gênero: *Hypocrea* (Teleomorfo) e *Trichoderma* (Anamorfo). O fungo apresenta crescimento rápido e produz comumente colônias com micélio branco, recobertas por massas de conídios de coloração esverdeadas, na maioria das espécies, fenótipo que permite o fácil reconhecimento tanto em placas de Petri como em substrato natural (CHAVERRI; SAMUELS, 2003; MEYER; MAZARO; SILVA, 2019) (Figura 1). Na fase assexuada, abrangem numerosas espécies que são formadas a partir do micélio vegetativo, conidióforos com um eixo central e ramificações laterais, que terminam em espirais divergentes de células conidiogênicas do tipo fiálide, com formato de garrafa ou alongadas, produzindo típicos conídios unicelulares; são largamente distribuídos em solos de regiões de clima temperado e tropical; são encontrados com prevalência em todos os tipos de solos cultiváveis; e muitas espécies são capazes de antagonizar fungos fitopatogênicos e estimular o crescimento de plantas (CHAVERRI; SAMUELS, 2003; MACHADO *et al.*, 2012; MEYER; MAZARO; SILVA, 2019; NIETO-JACOBO *et al.*, 2017).

Nos últimos anos ocorreu uma popularidade do biocontrole com um aumento considerável nas vendas de produtos biológicos, não somente entre os agricultores e diferentes segmentos da sociedade brasileira, mas inclusive entre os técnicos das companhias de pesticidas químicos. É ressaltado também, a valorização por parte das agências de fomento de pesquisa e desenvolvimento, bem como em diversas instituições de pesquisa e ensino o desenvolvimento de projetos com o objetivo de consolidar as formulações com agentes de biocontrole (MEYER; MAZARO; SILVA, 2019).

O gênero *Trichoderma* é considerado um dos principais fungos benéficos para a agricultura (ABDULLAH *et al.*, 2021; FERREIRA; MUSUMECI, 2021; WOO *et al.*, 2023). Os mecanismos do gênero *Trichoderma* na promoção de crescimento vegetal, em ausência de

fitopatógenos, ainda são pouco esclarecidos em comparação aos mecanismos de ação envolvendo o controle biológico (POMELLA; RIBEIRO, 2009). Várias espécies de *Trichoderma* possuem um arsenal de mecanismos de ação e produzem substâncias antimicrobianas que garantem um amplo espectro de atividade contra diferentes fitopatógenos, tornando-o valioso no controle biológico de doenças de plantas (GHORBANPOUR *et al.*, 2018). Podem interagir com os fungos fitopatogênicos de diversas maneiras, tais como antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação ou indução de defesa do hospedeiro (GHORBANPOUR *et al.*, 2018). Além disso, algumas espécies de *Trichoderma* possuem potencial no crescimento de plantas de forma geral, incluindo os efeitos na germinação de sementes, emergência e desenvolvimento de plântulas, e produção de grãos e frutos, pelo aumento da absorção de nutrientes pelas raízes, tolerância a estresses abióticos e produção de hormônios de crescimento, desta forma, reduzindo a necessidade de adubação (TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022). Ressaltando, em sua colonização de plantas, nas raízes ou como endofítico, o gênero *Trichoderma* evoluiu a capacidade de se comunicar com a planta e produzir inúmeros benefícios multifacetados para seu hospedeiro (WOO *et al.*, 2023; TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022).

A exploração da capacidade de *Trichoderma* spp. para atacar outros fungos tem permitido o desenvolvimento de numerosos agentes de controle biológico com demonstrada eficácia em distintos sistemas produtivos (FERREIRA; MUSUMECI, 2021). Nos últimos anos, os estudos que apontam que espécies de *Trichoderma* promovem o crescimento das plantas estão mais frequentes (GONZÁLEZ; FUENTES, 2017; JALALI; ZAFARI; SALARI, 2017). Tudo isto constitui o que pode ser chamado de “efeito *Trichoderma*” (TYŚKIEWICZ, *et al.* 2022). Alguns exemplos de estudos recentes relacionados ao uso de *Trichoderma* na agricultura como agente de biocontrole e promotor de crescimento de plantas estão listados na **Tabela 1**.

Portanto, é inquestionável que várias espécies de *Trichoderma* desempenha um papel crucial na agricultura como um biocontrolador natural e promotor de crescimento de plantas. Porém, para que o organismo desempenhe com excelência esses papéis é fundamental a seleção de espécies adaptadas e eficientes no patossistema a ser introduzido e estabelecer as melhores condições de uso. Diante à escassez de informações acerca do uso de um fungo antagonico a *F. solani* f. sp. *piperis*, agente causal da fusariose da pimenteira-do-reino, e promotor de crescimento de pimenteira-do-reino, isolados de *Trichoderma* apresentam uma base científica relevante para futuras investigações a respeito dos mecanismos de ação específica, produção de compostos de interesse biotecnológico, associações com produtos químicos e formulações, assim como aplicabilidade efetiva nos manejos fitossanitários, em diversos sistemas produtivos e sob diferentes condições ambientais.

Tabela 1. Estudos relacionados ao uso de *Trichoderma* na agricultura como agente de biocontrole e promotor de crescimento de plantas

Cultura estudada	Patógeno	Objetivo de estudo	Resultado	Referência
Alface	-	Promoção de crescimento	Incremento no número de folhas, biomassa e teor de clorofila total	(WONGLOM; ITO; SUNPAPAO, 2022)
Amendoim	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Controle biológico	Até 71,11% de inibição do crescimento do patógeno	(MARTÍNEZ-SALGADO <i>et al.</i> , 2021)
Banana	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	Controle biológico	Até 70 % de inibição do crescimento do patógeno	(BUBICI E KAUSHAL <i>et al.</i> , 2019)
Erva-mate	<i>Fusarium oxysporum</i>	Controle biológico	Testes com metabólitos voláteis apresentaram até 27,70% de inibição do patógeno	(QUEVEDO <i>et al.</i> , 2022)
Milho	<i>Fusarium graminearum</i>	Controle biológico/ Promoção de crescimento	Inibiu o crescimento de patógeno e aumentou a produção.	(ZHANG <i>et al.</i> , 2020)
Milho	<i>Magnaporthiopsis maydis</i>	Controle biológico	Forte atividade antagônica contra o patógeno	(DEGANI; DOR, 2021)
Pimenta malagueta	-	Promoção de crescimento	Interação benéfica entre raiz de pimenta- <i>Trichoderma</i> spp. induzindo a promoção do crescimento das plantas	(YADAV <i>et al.</i> , 2023)

Objetivou-se nesse estudo: (i) obter isolados de *Trichoderma* spp. de áreas com *Piper* spp. na Amazônia Oriental, (ii) selecionar isolados antagônicos a *F. solani* f. sp. *piperis* através de testes *in vitro*, (iii) avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em produzir enzimas líticas, (iv) determinar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. em reduzir a severidade da fusariose da pimenteira-do-reino, (v) determinar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. de produzir hormônio de crescimento vegetal e vi) investigar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. de promover crescimento em mudas de pimenteira-do-reino e avaliar seus efeitos nas respostas bioquímicas da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, N. S. *et al.* Harnessing *Trichoderma* in Agriculture for Productivity and Sustainability. **Agronomy**. v.11, 2559, 2021. DOI 10.3390/agronomy11122559.
- ABHILASH, P.C. *et al.* Plant growth-promoting microorganisms for environmental Sustainability. **Science & Society**. v. 34, n.11, p. 847-850, 2016.
- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários [online]: **MAPA**, 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 14 mai. 2023.
- AHMED, M. F. A.; EL-FIKI, I. A. I. Effect of biological control of root rot diseases of strawberry using *Trichoderma* spp. **Journal of Applied Sciences**. v. 7(3), p. 482-492, 2017.
- ALBUQUERQUE, F. C. *et al.* **Cultura da pimenta do reino na região amazônica**. Belém, PA: IPEAN, 1971. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/387134>. Acesso em: 19 de fev. 2022.
- ALBUQUERQUE, F.C.; DUARTE, M.L.R. Comportamento de cultivares de pimenta-do-reino em áreas de ocorrência de fusariose no Estado do Pará. Belém: **Embrapa CPATU**, 1991. 40p.
- ALBUQUERQUE, F.C.; FERRAZ, S. Características morfológicas e fisiológicas de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* e sua patogenicidade à pimenta-do-reino. **Experientice**, v. 22, n. 6, p. 133-151, 1976.
- ALIXANDRE, R. D. *et al.* Contextualização da cultura da pimenta-do-reino no Brasil. Em: **Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil**.v. 5 [s.l.] Editora Científica Digital, 2022. p. 130–147.
- ASGHARI, B.; KHADEMIAN, R.; SEDAGHATI, B. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) confer drought resistance and stimulate biosynthesis of secondary metabolites in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) under water shortage condition. **Sci. Hortic.** v. 263. 2020. DOI 10.1016/j.scienta.2019.109132.
- BARATA, L.M. *et al.* Secondary Metabolic Profile as a Tool for Distinction and Characterization of Cultivars of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Cultivated in Pará State, Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1–18, 2021.
- BARRIGA, R. H. M. P. **Pimenta-do-reino: origem e distribuição geográfica, caracteres botânicos e melhoramento genético**. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1982. 25p.
- BENÍTEZ, T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology**, Spain, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.
- BENCHIMOL, R.L.; SUTTON, J. C.; DIAS-FILHO, M. B. Potencialidade da casca de caranguejo na redução da incidência de fusariose e na promoção do crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. **Fitopatologia Brasileira**. v. 31, p. 180-184, 2006.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio-Ambiente, 2009.
- BUBICI G. *et al.* Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. v. 10:616, **Front Microbiol**. 2019. DOI 10.3389/fmicb.2019.00616.
- CARNEIRO JÚNIOR, J. F. C. *et al.* Análise de mercado da pimenta-do-reino no período 1990 a 2015. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 11, n. 6, p. 116-145, 2017.
- CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. **Studies in Mycology**. v. 48: p. 1-116, 2003.
- CHEN, Y.S.; DAYOD, M.; TAWAN, C.S. Phenetic analysis of cultivated black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. **International Journal of Agronomy**, v. 2018, 2018.11p. DOI 10.1155/2018/3894924.
- COLLINGE, D. B. *et al.* Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the

direction? **Plant Pathology**, v. 71, 2022; p.1024 -1047, 2022.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. (ed.). **The nature and practice of biological control of plant pathogen**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539 p.

COSTA, Y. K. S. *et al.* Cultivo de pimenta-do-reino. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 4, 2020.

D'ADDAZIO, V. **Crescimento micelial de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* e respostas de cultivares de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) ao estresse abiótico e biótico: biometria, fotossíntese, resistência e avaliação de produtos alternativos de controle da fusariose**. 2017. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

DALLAGNOL, L. J.; ARAUJO FILHO, J. V. Uma visão geral da resistência genética da planta a microrganismos. In: DALLAGNOL, L. J. (org.). **Resistência genética: de plantas a patógenos**. Ed. UFPel: Pelotas, 2018. p. 13-64.

DEGANI, O.; DOR, S. *Trichoderma* Biological control to protect sensitive maize hybrids against late wilt disease in the field. **J Fungi (Basel)**, v. 18, 7(4):315, 2021. DOI 10.3390/jof7040315.

DIAS, A. G. O. **Cultivo da Pimenta-do-reino**. 1ª ed. Rio Verde – GO: Sementes Vitória, 2014.

DRUZHININA, I.S. *et al.* *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p.749–759, 2011.

DUARTE M. L. R.; ALBUQUERQUE F.C. **Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino**. Embrapa Amazônia Oriental, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/importancia.htm>> Acesso em: 20 de fev. 2022.

DUARTE, M. L. R. **Doenças de plantas no Trópico Úmido brasileiro I**. Plantas industriais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p.296, 1999.

DUARTE, M. L. R. **Cultivo da Pimenteira-do-reino na Região Norte**. Belém, PA: 2004. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/402862/1/SP1Plantio.pdf>> Acesso em: 01 de mar. 2021.

DUARTE, M. L. R. *et al.* **A Cultura da Pimenta-do-Reino**. – 2. ed. rev. amp. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 73 p. (Coleção Plantar, 55). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/392085/a-cultura-da-pimenta-do-reino>. Acesso em: 20 de fev. 2022.

DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Doenças da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.507-516, 2005.

EDEL, V. *et al.* Populations of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations. **Phytopathology**, v. 84, p. 693-697, 1997.

ETESAMI, H.; GLICK, B. R. Halotolerant plant growth-promoting bacteria: prospects for alleviating salinity stress in plants. **Environ. Exp. Bot.** v. 178:104124, 2020. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.104124.

FAO. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**. FAOSTAT. Data. Production. Crops. 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 12 jun. 2022.

FERREIRA, F.V.; MUSUMECI, M.A. *Trichoderma* as biological control agent: Scope and prospects to improve efficacy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 90, 2021.

FILGUEIRAS, G. C. *et al.* Exploração da pimenta-do-reino como alternativa de sustentabilidade socioeconômica e ambiental no Estado do Pará. **VI Encontro Nacional da ANPPAS**, Belém, PA - Brasil, 2012. GBIF. **Global Biodiversity Information Facility**. Taxonomy *Piper* L. Disponível em: <<https://www.gbif.org/search?q=piper>>. Acesso em: 19 jan. 2023.

GHORBANPOUR, M. *et al.* Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. **Biological Control**. v. 117, p. 147-157, 2018. DOI 10.1016/j.biocontrol.2017.11.006.

GONZÁLEZ F. H; FUENTES, M. N. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. **Revista de Ciências Agrícolas**. v. 34, p.17-31, 2017. DOI 10.22267/rcia.173401.61.

GOMES FILHO, J. **Manejo da fusariose em pimenta-do-reino cv. Bragantina**. 2017. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2017.

HAKIM, S. *et al.* Rhizosphere engineering with plant growth-promoting microorganisms for agriculture and ecological sustainability. **Crop Biology and Sustainability**. v 5, 2021. DOI 10.3389/fsufs.2021.617157.

HE, D.-C. *et al.* Biological control of plant diseases: an evolutionary and eco-economic consideration. **Pathogens**, v. 10, p. 1-15, 2021.

HERRERA-JIMÉNEZ, E. *et al.* Comparative effects of two indole-producing *Trichoderma* strains and two exogenous phytohormones on the growth of *Zea mays* L., with or without tryptophan. **J. Soil Sci. Plant Nutr.** v.18, n.1, p. 188-201, 2018.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal (PAM)**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/pimenta-do-reino/br>>. Acesso em: 21 out. 2023.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**. Tabela 1613: área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes. [Rio de Janeiro, 2020]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>. Acesso em: 15 dez. 2021.

INDEX FUNGORUM. **Index Fungorum Registration Identifier 596950**. Disponível em: <<https://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=349447>> Acesso em: 10 jun. 2023.

JALALI, F.; ZAFARI, D.; SALARI, H. Volatile organic compounds of some *Trichoderma* spp. increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Fungal Ecology**. v. 29, p. 67-75, 2017. DOI 10.1016/j.funeco.2017.06.007.

JENSEN, D.F. *et al.* Biological control using microorganisms as an alternative to disease resistance. In: COLLINGE, D.B. (ed.) **Plant pathogen resistance biotechnology**. New York and London: Wiley Blackwell. 2016. p. 341–363.

JENSEN, D.F.; KARLSSON, M.; LINDAHL, B.D. Fungal–fungal interactions: from natural ecosystems to managed plant production, with emphasis on biological control of plant diseases. In: DIGHTON, J.; WHITE, J.F. (ed.) **The fungal Community: its organization and role in the ecosystem**. Boca Raton: CRC Press. 2017. p. 549–562.

LANTEIGNE, C. *et al.* Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 contributes to the biological control of bacterial canker of tomato. **Phytopathology**, v.102, p. 967–973, 2012.

LEITE, T. V. P.; BERTOTTI, D. L. Efeito dos inseticidas botânicos aplicados no manejo agroecológico de pragas na cultura do milho doce. **Agrus - Revista Brasileira de Agro- ambiente e Desenvolvimento Sustentável**, v. 1, n. 1, p. 12-20, 2020.

LEMOS *et al.* **Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no Estado do Pará**. 1ª ed. Brasília – DF: Embrapa, 2014.

LEMOS, O. F.; TREMACOLDI, C. R.; POLTRONIERI, M.C. **Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no Estado do Pará** (editores técnicos) – Brasília, DF: Embrapa, 2014. 52p.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 117, p. 518-534, 2018.

LOPES, M. J. S.; DIAS-FILHO, M. B.; GURGEL, E. S. C. Successful plant growth-promoting microbes:

inoculation methods and abiotic factors. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, 606454, p. 1-13, 2021.

LOURINHO, M.P. *et al.* Conjuntura da pimenta do reino no mercado nacional e na região Norte do Brasil. **Revista Enciclopédia Biofera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.10, n.18; p 1016-1031, 2014.

MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 35, p. 274-288, 2012. DOI 10.19084/rca.16182.

MAHESHWARI, D. K.; DHEEMAN, S.; AGARWAL, M. “Phytohormone-producing PGPR for sustainable agriculture. **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem**, v. 12, p. 159-182, 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-24654-3-7.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A. Controle biológico de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S.J., ANDRADE, E.G.T.D.; MENEZES, M. (ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife (Brasil): Imprensa Universitária da UFRPE, 2005, p. 303 - 322.

MARTÍNEZ-SALGADO, S. J. *et al.* Biological control of charcoal rot in peanut crop through strains of *Trichoderma* spp., in Puebla, Mexico. **Plants (Basel)**, v. 10 (12): 2630, 2021. DOI 10.3390/plants10122630. PMID: 34961101; PMCID: PMC8707606.

MARTINS, J. L. A.; LANDAU, E. C.; DA SILVA, G. A. Evolução da produção de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*, *Piperaceae*). In: LANDAU, E. C.; DA SILVA, G. A.; MOURA, L.; HIRSCH, A.; GUIMARAES, D. P. (ed.). **Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas**: produtos de origem vegetal. v. 2. Brasília: Embrapa, 2020. p. 1185-1212.

MATOS, A. P.; REINHARDT, D. H. Pineapple in Brazil: characteristics, research and perspectives. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 822, n. 1, p. 25-36, 2009.

MATOS, E. R.; DURRER, A.; ANDREOTE, F. D. Ecologia microbiana. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. (ed.). **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ. 2016. P. 37- 46.

MEDEIROS, *et al.* Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIN L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J. A. M. (ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. p. 261-274.

MELLO, S. C. M. *et al.* Controle de Doenças de Plantas. In: FONTES, E. M. G., VALADARES-INGLIS, M. C. (org.). **Controle Biológico de Pragas da Agricultura**. 1ed. Brasília: Embrapa, 2020. p. 291-325.

MELO, *et al.* Extração, identificação e estudo do potencial antimicrobiano do óleo essencial de pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), biomonitorado por *Artemia salina* Leach. **Holos**, v.1, 2021. DOI 10.15628/holos.2021.10663. MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (ed.). **Trichoderma: uso na agricultura**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 538 p.

MICHEREFF, S. J. Variabilidade de agentes fitopatogênicos. In: MICHEREFF, S. J. (ed.). **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 2001. p. 76 - 81.

MIMMO, T. *et al.* Nutrient availability in the rhizosphere: a review. **Acta Hort.** v. 1217, p. 13–28, 2018. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1217.2.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (ed.). **Trichoderma: uso na agricultura**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p.181-199.

MUKHOPADHYAY, R.; KUMAR, D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 30, 2020. DOI10.1186/s41938-020-00333-x.

MYCOBANK. 2023. **Fungal databases, nomenclature & species banks**. Disponível em: < <http://www.mycobank.org/>>. Acesso em fev. 2023.

NIETO-JACOBO, M.F. *et al.* Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Front. Plant Sci.** v.8, n.102. 2017. DOI 10.3389/fpls.2017.00102.

NILO, S. H. *et al.* Atividade nematocida in vitro e in planta de extratos de folhas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). **Colheita Prot.** v. 100, p. 1–7, 2017.

O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46 p. 293-304, 2017.

OLENSKA, E. *et al.* Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of the Total Environment**, v. 743, 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.140682.

OLIVEIRA, M. L. B. *et al.* O gênero *Piper* no Brasil: o estado da arte da pesquisa. **Biodiversidade**, Rondonópolis, v.19, n.3, p.198-210, 2020.

PAES, R. L.; CRUZ, B. E. V. Situação geográfica da produção pimenta do reino no Brasil. **Revista Comunicação Universitária**, Belém, v.1, n.1, p. 1-14, 2022.

POLTRONIERI, M. C. *et al.* **Estado da arte do melhoramento genético de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) na Embrapa Amazônia Oriental.** [coord.]. Belém. Embrapa Amazônia Oriental. 2020. 28p. (Documentos, 452).

POLTRONIERI, M. C.; LEMOS, O. F. Pimenta do reino: cultivares. **Boletim Técnico: Embrapa Amazônia Oriental**, 2014.

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. (ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 239-244.

QUEVEDO, A. C. *et al.* Ação antagonista *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum*. **Ciência Florestal**, v.32, n. 4, p. 2288-2303, 2022. DOI 10.5902/1980509868437.

REGO, L. S.; FERNANDES, P. O. Atividade funcional da pimenta vermelha (*Capsicum* sp.-*solanacea*) e pimenta-do-reino (*Piper nigrum*-*piperaceae*). **Revista da FAESE**, vol. 3, n. 3. p 33 - 41, 2019.

ROCHA, F. S. *et al.* Caracterização de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, produção de fitotoxina e incidência da fusariose no norte de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.1, p.67-72, 2016.

RODRIGUEZ, H. *et al.* Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v.91, p.552-555, 2004.

SAAD, A. M. *et al.* Biological control: An effective approach against nematodes using black pepper plants (*Piper nigrum* L.). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.29, ed. 4, p.2047-2055, 2022.

SAATH, K. C. O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Rev. Econ. Sociol. Rural**. Piracicaba-SP, v. 56 (2), p. 195-212, 2018. DOI 10.1590/1234-56781806-94790560201.

SCHERM, H.; YANG, X.B. Development of sudden death syndrome of soybean in relation to soil temperature and soil water matric potential. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, p. 642-649, 1996.

SCHNABEL, A. *et al.* Identification and characterization of piperine synthase from black pepper, *Piper nigrum* L. **Commun Biol**, v. 4, n.1, 2021.

SECUDINO, W. **Propagação vegetativa da pimenteira-do-reino: avaliação de cultivares, níveis de AIB e substratos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2012.

SILVA, A. P.; DOURADO, M. N. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas.

Iniciação Científica CESUMAR, v. 24, n. 1, 2022. DOI 10.17765/2176-9192.2022v24n1e10776.

SILVA, A. R. P. **Micobiot e incidência de aflatoxinas e ocratoxina A em pimenta preta (*Piper nigrum* L.) comercializada no Brasil**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2017.

SILVA, L. R. *et al.* **Trichoderma: suas interações e uma abordagem metodológica aplicada ao estudo de compostos orgânicos voláteis para o mofo-branco e promoção de crescimento de plantas**, **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 28, p. 163-183, 2022. DOI 10.31976/0104-038321v280007.

SIM, S. L. Origin, distribution and botany of pepper (*Piper nigrum* L.). In: **National Conference on Pepper in Malaysia**, Kuching, Sarawak (Malaysia), 16-17 Dec 1985. Universiti Pertanian Malaysia, 1986.

ŠIŠIĆ, A. *et al.* The ‘forma specialis’ issue in *Fusarium*: A case study in *Fusarium solani* f. sp. *Pisi*. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-17, 2018.

SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. Species concept, genetics, and pathogenicity in *Hypomyces solani*. **Phytopathology**, v. 44: p.338- 342. 1953.

SOARES, F.E. F. *et al.* Biological control 2.0: Use of nematophagous fungi enzymes for nematode control. **Journal of Natural Pesticide Researc**. v. 4, 2023. DOI 10.1016/j.napere.2023.100025.

SPADARO, D. D. S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends Food Science Technolgy**, Netherlands, v. 47, p. 39–49, 2016.

STENBERG, J.A. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, p. 665–676, 2021. DOI 0.1007/s10340-021-01354-7.

SWAIN, H., MUKHERJEE; A. K. Host-Pathogen-*Trichoderma* Interaction. In: SHARMA, A., SHARMA, P. (ed.). **Trichoderma**. Singapore: Rhizosphere Biology, 2020, p. 149-165. DOI 10.1007/978-981-15-3321-1-8.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. Ed., Trad. SANTARÉM, E. R. Porto Alegre: RS, Artmed, 2013. 953 p.

TAKOOREE, H. *et al.* A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v.59, 2019. DOI 10.1080/10408398.2019.1565489.

TARIQ, M. *et al.* Antagonistic features displayed by plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Review, **Journal of Plant Science and Phytopathology**, v. 1, p. 38-43, 2017.

TREMACOLDI, C.R. Doenças causadas por fungos. In: LEMOS, O.F.; TREMACOLDI, C.R.; POLTRONIERI, M.C. (ed.). **Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no Estado do Pará**. Brasília: Embrapa. 2014. p.28-34.

TREMACOLDI, C.R. **Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle**. Belém. Embrapa Amazônia Oriental. 2010. 23p. (Documentos, 367).

TRONSMO, A. *et al.* Biological control of plant diseases. In: TRONSMO, A. M.; COLLINGE, D. B.; DJURLE, A., MUNK, L.; YUEN, J.; TRONSMO, A. (ed.) **Plant pathology and plant diseases**. Wallingford: CABI. 2020. p. 289–306.

TSYKIEWICZ, R. *et al.* **Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth**. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, n. 4: 2329, 2022. DOI 10.3390/ijms23042329.

UBIRACI, G. P. L. *et al.* **Seleção em larga escala de bactérias produtoras do hormônio ácido indolacético (AIA), auxina associada à promoção de crescimento em plantas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2017. 12 p. (Documentos 218).

VALIN, H. *et al.* The future of food demand: understanding differences in global economic models.

Agricultural Economics. v. 45., p. 51-67, 2014. DOI 10.1111/agec.12089.

VAZ, A. B. **Caracterização biológica e filogenética do agente etiológico da fusariose da pimenta-do-reino no Brasil**. 2013. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

VEIGA, R. S.; MARCUCCI, M. C. Atividades terapêuticas da pimenta-vermelha (*Capsicum* sp. -*Solanaceae*) e pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.- *Piperaceae*). **Brazilian Journal of Natural Sciences**, 1. ed., v. 2, p. 3-8, 2018.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. Manejo da fusariose da pimenta-do-reino no estado do Espírito Santo. INCAPER, Vitória, 2004. 16p.

VIDAL, M. F. **Evolução do cultivo de pimenta-do-reino na área de atuação do BNB**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 5, 2020. 7 p. (Caderno Setorial ETENE, 146).

WONGLOM, P.; ITO, S.; SUNPAPAO, A. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). **Fungal Ecology**. v. 43: p. 1-10, 2020. DOI 10.1016/j.funeco.2019.100867.

WOO, S.L. *et al.* *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. **Nat Rev Microbiol**. v. 21(5), p. 312-326, 2023. DOI 10.1038/s41579-022-00819-5.

XIE, M. *et al.* PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **Nature Communications**, v. 7, p. 13280, 2016.

YADAV, M. *et al.* Plant growth promotion and differential expression of defense genes in chilli pepper against *Colletotrichum truncatum* induced by *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum*. **BMC Microbiol**. v. 23, 54, 2023. DOI 10.1186/s12866-023-02789-x.

ZHANG, F. *et al.* The application potential of *Trichoderma* T-soybean containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate for maize production. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 110, 2020. DOI 10.1016/j.pmpp.2020.101475.

CAPÍTULO II

Desempenho de *Trichoderma* spp. oriundos de áreas da Amazônia Oriental no controle da fusariose da pimenteira-do-reino

**Desempenho de *Trichoderma* spp. oriundos de áreas da Amazônia Oriental
no controle da fusariose da pimenteira-do-reino**

Jackeline Araújo Mota Siqueira^{1,3*}, Deyse Ribeiro Silvino de Jesus², Iwanne Lima
Coelho¹, Delson Laranjeira^{1*} Alessandra Keiko Nakosone²

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de
Medeiros, s/n, Dois irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil

² Empresa Brasileira de Pesquisa (EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL), Trav.
Dr. Enéas Pinheiro, s/nº, Marco, CEP: 66095-903, Belém -PA, Brasil

³ Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus de Capitão Poço, Rua
do Pau Amarelo, s/nº, Vila Nova, CEP: 68650-000, Capitão Poço-PA, Brasil

⁴ Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus sede, Avenida
Presidente Tancredo Neves, nº2501, Terra Firme, CEP: 66077-830, Belém-PA,
Brasil

*Autores correspondentes. Endereço de e-mail: jackelinearaujo86@hotmail.com (Jackeline
Araújo Mota Siqueira), delson.laranjeira@ufrpe.br (Delson Laranjeira)

RESUMO

Entre os principais problemas fitossanitários que comprometem a produtividade e a vida útil da pimenteira-do-reino, destaca-se a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* que é considerada a principal doença incidente na cultura. Por se tratar de um fungo habitante do solo, as medidas de manejo são laboriosas e, algumas delas ineficazes, sendo que o controle amplamente utilizado para *F. solani* f. sp. *piperis* ainda é a prevenção, uma vez que ainda não foram desenvolvidas nenhuma cultivar resistente ou tolerante ao fitopatógeno e não há regulamentação de defensivos agrícolas direcionados a esse patossistema. A este respeito, objetivou-se (i) obter isolados de *Trichoderma* spp. de áreas com *Piper* spp. na Amazônia Oriental, (ii) selecionar isolados antagonísticos a *F. solani* f. sp. *piperis* através de testes *in vitro*, (iii) avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em produzir enzimas líticas, (iv) determinar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. em reduzir a severidade da fusariose da pimenteira-do-reino. Um total de 80 isolados de *Trichoderma* spp. foi obtido e avaliado em testes de antagonismo *in vitro* contra o *F. solani* f. sp. *piperis*. Foi avaliado a inibição de crescimento micelial, índice e notas de velocidade de crescimento. Também foi verificada a capacidade dos isolados de *Trichoderma* spp. de produzir enzimas líticas. Foram selecionados oito isolados antagonísticos (T9, T18, T44, T62, T69, T76, T77 e T80) nos testes *in vitro* e avaliados quanto ao potencial de biocontrole sobre a fusariose em mudas pimenteira-do-reino. Mudas de pimenteira-do-reino foram primeiramente inoculadas com os isolados de *Trichoderma* spp. e posteriormente com *F. solani* f. sp. *piperis*. As mudas foram avaliadas por 30 dias através de medições semanais do diâmetro da lesão causada pelo patógeno para determinação da área abaixo da curva de progresso da doença – AACPD. Os resultados dos testes *in vitro* apresentaram médias de inibição micelial do *F. solani* f. sp. *piperis* de até 21,89% no teste de pareamento de culturas, 80% pela escala de notas de Bell e 61,81% no ensaio de compostos voláteis em relação ao tratamento controle. A maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. produziram pelo menos uma enzima lítica. Os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados reduziram significativamente os sintomas causados pelo patógeno em relação a testemunha, variando entre 27,30% e 77,80%. Os isolados T80 (77,80%), T18 (73,06%) e T44 (56,40%) apresentaram melhores resultados quando comparados com o produto comercial (44,56%). Conclui-se que os isolados selecionados obtidos de áreas com *Piper* spp. mostram um bom desempenho na inibição a *F. solani* f. sp. *piperis*, surgindo como nova alternativa para o uso desses microrganismos independentes ou integrado a outros manejos à fusariose da pimenteira-do-reino.

Palavras-chave: Biocontrole, *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, Nordeste Paraense, *Piper nigrum*

1 ABSTRACT

2 Among the main phytosanitary problems that compromise the productivity and lifespan of black
 3 pepper plants, fusariosis stands out, caused by the fungus *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, which
 4 is considered the main disease incident in the crop. As it is a soil-inhabiting fungus,
 5 management measures are laborious and some of them ineffective, with prevention still being
 6 widely used for controlling *F. solani* f. sp. *piperis*, as no resistant or tolerant cultivars to the
 7 phytopathogen have been developed, and there is no regulation of agricultural pesticides
 8 targeting this pathosystem. In this regard, the objectives were (i) to obtain isolates of
 9 *Trichoderma* spp. from areas with *Piper* spp. in the Eastern Amazon, (ii) to select isolates
 10 antagonistic to *F. solani* f. sp. *piperis* through in vitro tests, (iii) to evaluate the ability of
 11 *Trichoderma* spp. isolates to produce lytic enzymes, (iv) to determine the potential of
 12 *Trichoderma* spp. isolates to reduce the severity of fusariosis in black pepper plants. A total of
 13 80 isolates of *Trichoderma* spp. were obtained and evaluated in in vitro antagonism tests against
 14 *F. solani* f. sp. *piperis*. Inhibition of mycelial growth, growth index, and growth rate scores
 15 were evaluated. The ability of *Trichoderma* spp. isolates to produce lytic enzymes was also
 16 verified. Eight antagonistic isolates (T9, T18, T44, T62, T69, T76, T77, and T80) were selected
 17 in the in vitro tests and evaluated for biocontrol potential against fusariosis in black pepper
 18 seedlings. Black pepper seedlings were first inoculated with *Trichoderma* spp. isolates and then
 19 with *F. solani* f. sp. *piperis*. The seedlings were evaluated for 30 days through weekly
 20 measurements of the lesion diameter caused by the pathogen to determine the area under the
 21 disease progress curve (AUDPC). The results of the in vitro tests showed average inhibition of
 22 *F. solani* f. sp. *piperis* mycelial growth of up to 21.89% in the culture pairing test, 80% by the
 23 Bell rating scale, and 61.81% in the volatile compounds assay compared to the control
 24 treatment. Most *Trichoderma* spp. isolates produced at least one lytic enzyme. The selected
 25 *Trichoderma* spp. isolates significantly reduced symptoms caused by the pathogen compared
 26 to the control, ranging from 27.30% to 77.80%. Isolates T80 (77.80%), T18 (73.06%), and T44
 27 (56.40%) showed better results compared to the commercial product (44.56%). It is concluded
 28 that the selected isolates obtained from areas with *Piper* spp. show good performance in
 29 inhibiting *F. solani* f. sp. *piperis*, emerging as a new alternative for the use of these
 30 microorganisms independently or integrated with other management strategies for fusariosis in
 31 black pepper plants.

32
 33 **Keywords:** Biocontrol, *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, Pará Northeast, *Piper nigrum*

1. INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma especiaria de grande importância comercial, com uma história de exploração milenar, cultivada como commodity agrícola e com espaço garantido nas especulações financeiras em bolsas de valores (CARNEIRO JÚNIOR *et al.*, 2017). No Brasil, a produção de pimenta-do-reino está distribuída principalmente nos estados do Pará, maior produtor nacional até 2016, Espírito Santo, que em 2017 assumiu a liderança, tornando-se, pela primeira vez, o maior produtor de pimenta-do-reino do Brasil e Bahia na terceira posição na produção nacional (IBGE, 2022). No estado do Pará, a pipericultura é de maior destaque do agronegócio paraense, assumindo posição relevante na pauta de exportações agrícolas e na ocupação de mão-de-obra no meio rural (CARNEIRO JÚNIOR *et al.*, 2017).

A produção da pimenteira-do-reino, no Brasil, é limitada por problemas fitossanitários. A fusariose da pimenteira-do-reino, também conhecida como podridão-das-raízes, doença restrita ao Brasil, causada pelo fungo de solo *Fusarium solani* Mart. (Sacc.) f. sp. *piperis* Albuquerque é a principal doença da cultura, a qual reduz a vida útil de uma lavoura de 12 anos para cinco ou seis anos (CARNEIRO JÚNIOR *et al.*, 2017; LOURINHO *et al.*, 2014; TREMACOLDI, 2010). O sintoma característico da doença é o apodrecimento gradual das raízes da pimenteira e, posteriormente, do colo da planta ficando visível o escurecimento dos tecidos internos do caule. Com o sistema radicular comprometido e a obstrução dos vasos condutores da planta ocorre à murcha, queda das folhas e internódios (OLIVEIRA, 2012; TREMACOLDI, 2014).

Por se tratar de um fungo habitante do solo, as medidas de manejo do *F. solani* f. sp. *piperis* são laboriosas e, algumas delas ineficazes. O controle amplamente utilizado para a fusariose da pimenteira-do-reino ainda é a prevenção, uma vez que ainda não foram desenvolvidas cultivares resistentes ou tolerante ao fitopatógeno e não há regulamentação de defensivos agrícolas direcionados ao patossistema (AGROFIT, 2023; SILVA *et al.*, 2011; TREMACOLDI, 2010). Para superar esses obstáculos, surge a necessidade de explorar novas abordagens ou estratégias de manejo para fusariose da pimenteira-do-reino.

O controle biológico, através da utilização de microrganismos antagonistas, tem se estabelecido como uma estratégia potencial de controle de doenças de plantas em vários patossistemas (BETTIOL; MORANDI, 2009; O'BRIEN, 2017). Espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* são os antagonistas de fungos fitopatogênicos mais estudados (MEYER; MAZARO; SILVA, 2019). Vários mecanismos de ação, como produção de metabólitos voláteis e não-voláteis, competição por espaço e nutrientes, atividade enzimática hidrolítica e parasitismo (ASAD, 2022; BRITO *et al.*, 2014; MUKHOPADHYAY; KUMAR, 2020;

SOARES *et al.*, 2023) atuam no controle, bem como a produção de outras substâncias que melhoram o crescimento das plantas (PASCHOLATI; SOUZA; CARDOSO FILHO, 2019). Para atender a demanda de desenvolvimento de programas de controle biológico, a formação de coleções de culturas microbianas é fundamental por ser a primeira etapa do processo de seleção de antagonistas, ao abranger um estoque representativo de amostras de isolados e oportunidade de gerar informações economicamente que levem ao uso em maior escala desses microrganismos (MELLO, 2008).

Numerosos estudos relatam a aplicação bem-sucedida e eficiente do controle biológico em uma ampla gama de doenças causadas por fungos fitopatogênicos (ASAD, 2022). Por exemplo, várias espécies de *Trichoderma* são conhecidas há muito tempo como antagonistas ativos contra *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum acutatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* (ABBAS; JIANG; FU, 2017; CHAKRAPAN, 2019; ES-SOUFI *et al.*, 2020; FREEMAN *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2021; QUEVEDO *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2019).

Apesar da importância da pipericultura no cenário internacional e nacional, conhecimentos que garantam a produção sustentável e econômica da cultura ainda são exíguos (SILVA *et al.*, 2011). Contudo, o manejo da fusariose da pimenteira-do-reino carece de estudos, principalmente diante da biodiversidade inexplorada existente na Amazônia. Trabalhamos com a hipótese de que a introdução do controle biológico com *Trichoderma* o manejo da fusariose em pimenteira-do-reino pode reduzir os danos causados pela doença. Assim, este trabalho teve como objetivos: (i) obter isolados de *Trichoderma* spp. de áreas com *Piper* spp. na Amazônia Oriental, (ii) selecionar e identificar isolados antagônicos a *F. solani* f. sp. *piperis* através de testes *in vitro*, (iii) avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em produzir enzimas líticas e (iv) determinar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. em reduzir a severidade da fusariose da pimenteira-do-reino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos no Laboratório e em casa de vegetação, respectivamente, do Departamento de Fitopatologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária da Amazônia Oriental – EMBRAPA, latitude 1°26'30" S, longitude 48°26'44" W, Belém, Pará, Brasil, no período entre 2021 e 2023.

2.1. Obtenção e reativação do isolado de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

O isolado de *F. solani* f. sp. *piperis* utilizado nos ensaios, proveniente do Município de Baião, PA, foi obtido na coleção de trabalho do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa

Amazônia Oriental. Para reativação e confirmação da virulência do patógeno, o isolado de *F. solani* f. sp. *piperis* foi inoculado em mudas de pimenteira-do-reino do cultivar “Embrapa-Clonada” com aproximadamente 6 meses de idade.

2.2. Obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp.

2.2.1. Local e coleta de amostras

A área de coleta para obtenção de isolados de *Trichoderma* spp. abrangeu alguns dos principais municípios produtores de pimenta-do-reino do estado do Pará, com destaque para mesorregião do Nordeste Paraense, além da capital do Estado, Belém. Amostras de solo e raízes de *Piper* spp., de plantas aparentemente sadias, foram coletadas em 30 propriedades comerciais distribuídas nos municípios de Capitão Poço, Garrafão do Norte e Nova Esperança do Piriá e em uma área não comercial nas dependências da EMBRAPA Amazônia Oriental em Belém, respectivamente.

Foram realizados 20 pontos de coleta em cada propriedade comercial de pimenteira-do-reino e 30 pontos de coleta na área não comercial de pimenta longa. As coletas foram realizadas retirando amostras de solo e raízes na base de plantas sadias, à distância aproximada de 5 cm do colo e de 0-10 cm de profundidade. As amostras, acondicionadas em sacolas plásticas, foram identificadas e armazenadas à sombra, até o transporte ao laboratório.

*2.2.2. Isolamento e preservação dos isolados de *Trichoderma* spp.*

As amostras foram encaminhadas para o isolamento de *Trichoderma* spp. com o uso de meios de cultura semi-seletivos de Martin (MM) (10 g de dextrose + 0,5 g de sulfato de magnésio + 0,5 g de peptona + 0,5 g extrato de carne + 0,05 g rosa de bengala + 20 g de ágar + 0,3 g de cloranfenicol + 1000 mL de água destilada), previamente autoclavados a 120 °C e 1 atm por 20 minutos. Duas metodologias de isolamento indireto foram utilizadas, sendo uma a partir de diluição seriada de suspensão de solo e outra por plaqueamento direto de partículas de solo e raízes.

No primeiro método, de cada amostra, 10g de solo foram colocados em erlenmeyer de 250 mL com 90 g de água destilada e esterilizada, posteriormente agitados a 170 rpm por 40 minutos. Em seguida, a suspensão de solo foi submetida a diluições seriadas conforme Dhingra e Sinclair (1995) em série até 10^{-3} agitando-se os tubos de ensaio em vortex até suspensão completa das partículas. Foi realizado o plaqueamento, pipetando 1 mL da suspensão de solo diluída em placas, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, contendo meio de cultura. O segundo método foi por meio de plaqueamento direto de partículas de solo, onde 20 g de solo

de cada amostra foi lavado com água destilada utilizando peneira de 400 mesh e seco em papel filtro. Após esse procedimento, 4 fragmentos de solo, com auxílio de uma pinça, foram plaqueados em meio MM (adaptado de BRITO *et al.*, 2010). Fragmentos de raízes de cada amostra, após desinfecção superficial, também foram plaqueados, com auxílio de uma pinça, em meio de cultura (SANTAMARÍA; BAYMAN, 2005). As placas foram incubadas sob 25°C no escuro durante cinco dias. Após esse período, as placas que apresentaram micélio foram transferidas para meio BDA – Batata-Dextrose-Ágar (200g de infusão batata + 20 g de dextrose + 20 g de ágar + 0,3 g cloranfenicol + 1000 mL de água destilada) e incubados sob 25°C com fotofase de 12 horas.

As placas foram observadas diariamente e para colônias típicas de *Trichoderma* foram confeccionadas lâminas para exames das características morfológicas em microscópio óptico para identificação do fungo em nível de gênero conforme a chave analítica proposta por Samuels *et al.* (2009). As colônias confirmadas como sendo de *Trichoderma* spp. foram purificadas e as culturas monospóricas obtidas. As culturas puras formadas a partir de um único esporo foram transferidas individualmente para o meio BDA em tubos de ensaio e preservados, em triplicata, em óleo mineral e pelo método de Castellani (1939), com ADE (água deionizada e esterilizada) sob temperatura ambiente, permanecendo registrados e disponíveis para os testes subsequentes.

2.3. Seleção dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao potencial antagônico a *F. solani* f. sp. *piperis*

2.3.1. Pareamento de culturas

Foram obtidos 80 isolados de *Trichoderma* spp., os quais foram avaliados quanto ao seu desempenho antagônico pelo método de pareamento de colônias *in vitro*. Em placas de Petri (90 mm Ø), contendo o meio BDA, foram depositados paralelamente dois discos miceliais (6mm Ø): um com isolado de *Trichoderma* e outro com *F. solani* f. sp. *piperis*, ambos a aproximadamente 8 mm de distância em relação a borda da placa. Primeiramente foi depositado o patógeno e após 48h, devido o lento crescimento da colônia de *F. solani* f. sp. *piperis* em relação ao *Trichoderma*, o candidato a antagonista. No tratamento controle foi depositado, paralelamente, um discos fúngicos do isolado fitopatogênico e um disco apenas com BDA, totalizando 81 tratamentos com quatro repetições cada. As placas foram incubadas por sete dias a 28 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas e, a cada 48 horas, foram aferidos os raios de crescimento micelial do patógeno e do antagonista, com auxílio de um paquímetro digital. A partir dos valores aferidos foram calculados valores de porcentagem de inibição de crescimento

micelial – PIC = [(diâmetro da testemunha – diâmetro do tratamento / diâmetro da testemunha) / 100] (EDGINTON *et al.*, 1971) e o índice de velocidade de crescimento micelial – IVC = [(diâmetro final da colônia / número de dias de incubação) / 100] (OLIVEIRA, 1991).

Ao final do período de incubação das placas, o índice antagônico entre os isolados também foi avaliado qualitativamente através da escala de notas proposta por Bell *et al.* (1982), onde: o antagonista cresce por toda a placa de Petri (1); o antagonista cresce sobre 2/3 da placa (2); o antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa (3); o patógeno cresce sobre 2/3 da placa (4); o patógeno cresce por toda placa de Petri (5).

2.3.2. Ação de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

Para avaliar o efeito dos compostos voláteis (COVs) dos 80 isolados de *Trichoderma* spp. sobre o fitopatógeno *F. solani* f. sp. *piperis* foi utilizada a metodologia de placas dupla proposta por Dennis e Webster (1971). No centro da placa de Petri (90 mm Ø), contendo meio cultura solidificado, foi depositado um disco (6 mm Ø) de micélio de *Trichoderma*. Da mesma forma, no centro de outra placa de Petri, foi colocado um disco (6 mm Ø) de micélio do patógeno. As placas contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas formando uma atmosfera compartilhada e unidas com plástico Parafilm®, com a placa contendo o patógeno na posição superior. Como testemunha, foi sobreposta uma base contendo o patógeno e outra contendo apenas meio BDA, totalizando 81 tratamentos com quatro repetições cada. As placas foram transferidas para câmara de incubação sob as condições de temperatura e fotoperíodo controladas (dez dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 h).

Após a total colonização do meio de cultura no tratamento controle, foram realizadas medidas do diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro digital. Os valores médios de inibição do crescimento micelial foram calculados com o uso da fórmula: $I = (C - T) / C \times 100$, onde I representa a porcentagem de inibição, C os valores da medida de diâmetro das colônias do patógeno sem a presença do antagonista, e T os valores dos tratamentos com a presença do antagonista.

2.3.3. Caracterização quanto a produção de enzimas líticas por isolados de *Trichoderma* ssp.

A avaliação da produção de enzimas foi realizada qualitativamente em meios indicadores sólidos, para: (a) protease através de Smibert e Krieg (1981); (b) amilase por Lodder e Kreger -Van (1952), contendo 0,2% de amido solúvel Conn *et al.* (1957); (c) quitinase através da metodologia de Fleuri *et al.* (2009), com adaptações; (d) lipase de acordo com o meio

de Sierra (1957), acrescido de Tween 80; (e) esterase de acordo com o meio de Sierra (1957), acrescido de Tween 20.

Em cada meio específico, os isolados de *Trichoderma* spp., selecionado nos ensaios de pareamento e compostos voláteis, foram semeados pontualmente com auxílio de um palito de madeira estéril, em quadruplicata. Como testemunha um tratamento foi conduzido sem a deposição de *Trichoderma* nos meios enzimáticos avaliados.

As placas foram incubadas a 25 ± 3 °C e após 24 horas, observou-se diariamente a formação ou não de um halo translúcido para protease, amilase, quitinase, lipase e esterase, em volta das colônias fúngicas.

2.4. Potencial antagônico *in vivo* dos isolados de *Trichoderma* spp. selecionados

Os melhores isolados de *Trichoderma* spp., selecionados nos testes *in vitro*, foram avaliados em um experimento em casa de vegetação. O potencial biocontrolador dos isolados de *Trichoderma* spp. selecionados foi avaliado em mudas de pimenteira-do-reino inoculadas com o patógeno *F. solani* f. sp. *piperis* em casa de vegetação. O experimento foi em Bloco Inteiramente Casualizado (DBC), com nove tratamentos, sendo oito isolados de *Trichoderma* spp. com códigos T9, T18, T44, T62, T69, T76, T77, T80 e um tratamento controle (T0, sem a presença de *Trichoderma*), com cinco repetições.

2.4.1. Material Vegetal

As mudas utilizadas no experimento foram da cultivar “Embrapa/Clonada”, com aproximadamente quatro meses de idade, obtidas através de estaquia e provenientes do Viveiro ProMudas, Castanhal, Pará, Brasil.

Após o transplântio, as mudas foram cultivadas em vasos com capacidade para três litros contendo fibra de coco estéril e mantidas em casa de vegetação. As plantas foram mantidas por irrigação periódica (100 ml/dia), conforme sua necessidade hídrica, e foram irrigadas quinzenalmente com 100 mL de solução nutritiva do meio MS (MURASHIG; SKOOG, 1962).

2.4.2. Preparação das suspensões dos isolados selecionados de *Trichoderma*

Os isolados de *Trichoderma* spp. testados neste experimento (T9, T18, T44, T62, T69, T76, T77, T80) foram cultivados em meio BDA por sete dias. A partir das colônias dos fungos, foi preparada uma suspensão aquosa de esporos de 500 mL, com concentração de 1×10^7 esporo/mL para cada isolado. Um tratamento com produto comercial formulado à base de mix

de espécies de *Trichoderma* (Tribalance ®□, concentração 1×10^7 esporo/mL) utilizado por pipericultores da região foi adicionado ao experimento (controle positivo).

2.4.3. Instalação do experimento

Após 60 dias, quando as mudas de pimenteira-do-reino atingiram um crescimento médio de 30 cm de altura, as plantas foram inoculadas com suspensão de esporo dos isolados de *Trichoderma* por meio de irrigação em solo, sendo 100 mL de suspensão por vaso, no corte meia lua previamente realizado ao redor do colo da planta. Cada tratamento foi realizado separadamente, sendo o tratamento controle absoluto apenas com água destilada e esterilizada.

A inoculação do patógeno foi realizada no caule da planta com o fitopatógeno *F. solani* f. sp. *piperis*, após sete dias ao tratamento com *Trichoderma*, com auxílio de uma agulha infestada com a suspensão de esporos do patógeno (1×10^5 esporos ml^{-1}). Em seguida, foi aplicada gaze umedecida com água destilada esterilizada em volta da lesão como câmara úmida, por 48 horas, e mantidas em casa de vegetação.

As avaliações quantitativas foram efetuadas de sete em sete dias após a inoculação com o patógeno até a morte da primeira planta de qualquer tratamento. Foi avaliado o tamanho da lesão com auxílio de um paquímetro digital, para cálculo de área abaixo da curva de progresso da doença – AACPD, através da soma das médias das lesões com o intervalo de avaliações. Foi realizada uma avaliação descritiva de acordo com a escala de notas (**Tabela 1**) para avaliação da fusariose em *P. nigrum* descrita por Ventura (2010 apud D'ADDAZIO, 2017).

Tabela 1: Escala de notas para avaliação da fusariose em *Piper nigrum*, causada por *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

Nota	Descrição
1	Sem sintomas perceptíveis
2	Sintomas muito leves no ponto de inoculação (lesão <5 mm)
3	Algumas folhas cloróticas, lesões nos entrenós (5-15 mm)
4	Folhas com clorose (lesão 15-20 mm)
5	Plantas com sintoma de murcha e clorose (lesão 20-25 mm)
6	Clorose e murcha das folhas e ramos; pode ocorrer queda dos entrenós (lesão 25-30 mm)
7	Clorose, murcha e necrose limitada em cerca de 50% das folhas e queda dos entrenós (lesão 30-35 mm)
8	Sintomas severos ocorrem à queda dos entrenós (lesão >35 mm)

Continua.

- 9 Sintomas de desfolha severa, clorose e murcha em 75% das folhas ou mais. Planta morta

1 Fonte: VENTURA, 2010 apud D'ADDAZIO, 2017.

2 2.5. Análises estatísticas

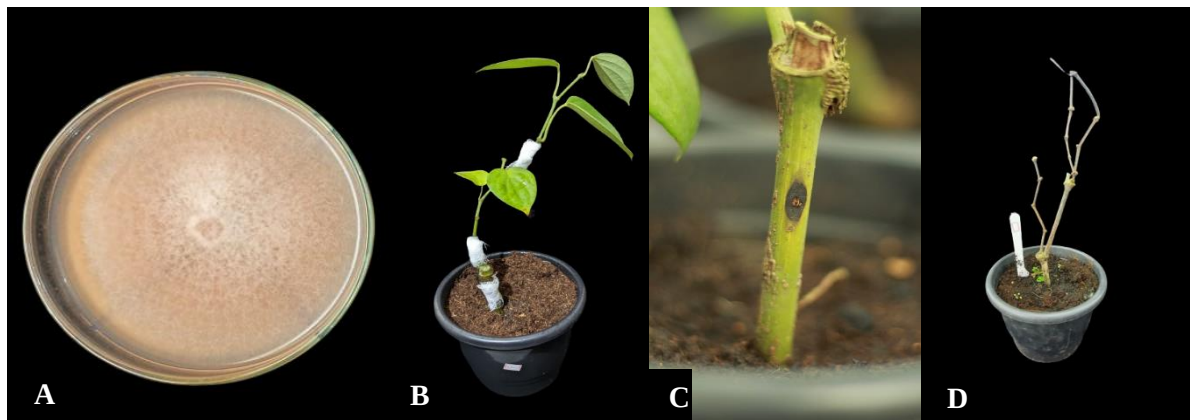
3
4 As comparações e determinações do potencial biocontrolador, entre isolados utilizados
5 nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, foram realizadas separadamente, por meio de análise de
6 variância - ANOVA. Para as análises significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), as médias foram
7 comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando programa estatístico
8 Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2014).

9 3. RESULTADOS

10 3.1. Reativação do isolado de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

11 O isolado de *F. solani* f. sp. *piperis* foi reativado e sua virulência comprovada após 7 dias
12 de incubação, através da observação dos sintomas no local onde foi realizado o ferimento e a
13 inoculação, apresentando lesões bem delimitadas de coloração marrom escuro, causando
14 posteriormente a morte das plantas (**Figura 1**).

15 **Figura 1:** Reativação da virulência do patógeno *F. solani* f. sp. *piperis* através de
16 inoculações em mudas de pimenteira-do-reino



29 (A) Cultura pura de *F. solani* f. sp. *piperis*; (B) inoculação do *F. solani* f. sp. *piperis* em mudas de pimenteira-
30 do-reino; (C) sintoma da fusariose: lesões bem delimitadas de coloração marrom escuro; (D) mudas mortas
31 pelo patógeno inoculado.

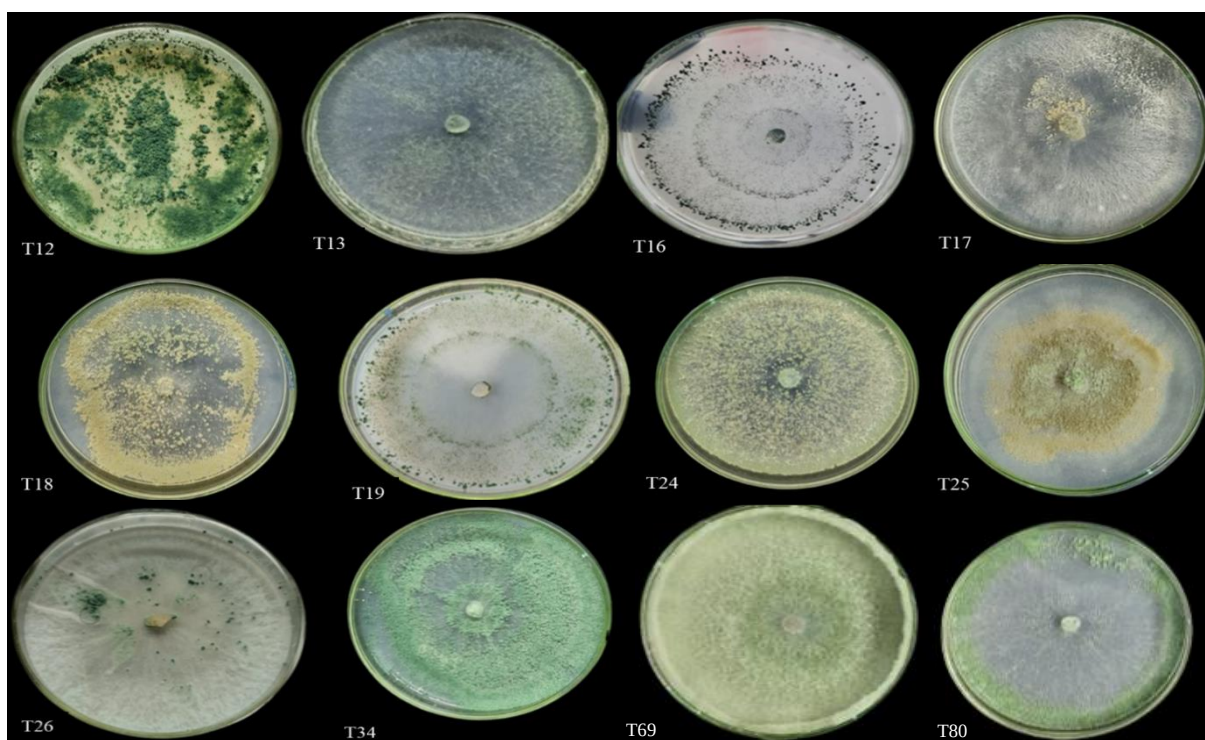
32 3.2. Obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp.

33 Foram obtidos 80 isolados de *Trichoderma* spp. (**Tabela 2**), com grande variedade
34 morfológica entre as colônias (**Figura 2**), sendo 53 isolados provenientes de amostras de solo
35 e 27 provenientes de raízes de *Piper* spp. Os isolados estão descritos com códigos de T1 a T80,
36 conforme a ordem de isolamento.

Tabela 2. Local de coleta, material de isolamento e número de acessos de *Trichoderma* spp. isolados em áreas com *Piper* na Amazônia Oriental

Acessos de <i>Trichoderma</i>	Local de Coleta	Material de Isolamento
T1 à T53	Capitão Poço/PA Latitude S02°25'08" / Longitude W48°09'08"	Raiz <i>Piper nigrum</i> ; Solo
T54 à T71	Garrafão do Norte/PA Latitude S01°56'03" / Longitude W47°03'09"	Raiz <i>P. nigrum</i> ; Solo
T72 à T78	Nova Esperança do Piriá/PA Latitude S02°16'04" / Longitude W46°58'03"	Raiz <i>P. nigrum</i> ; Solo
T79 à T80	Belém/PA Latitude S01°26'30" / Longitude W48°26'44"	Raiz <i>Piper tuberculatum</i> ; Solo

Figura 2: Diversidade na aparência de colônia de diferentes isolados de *Trichoderma* spp.* em BDA



* Na sequência tem-se os isolados T12, T13, T16, T17, T18, T19, T24, T25, T26, T34, T69 e T80.

Os isolados foram rotineiramente cultivados em meio BDA, sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e preservados pelo método de conservação em água destilada estéril, método Castellani, e em óleo mineral estéril (COSTA *et al.*, 2020). Os isolados obtidos foram depositados na Coleção de Fungos de Solo – CFS do laboratório de Fungos de Solo da Universidade Federal Rural do Pernambuco – LAFSOL/UFRPE e na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

3.3. Seleção dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao seu potencial antagônico sobre *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

3.3.1. Pareamento de culturas

O desempenho dos isolados de *Trichoderma* spp. avaliados contra *F. solani* f. sp. *piperis* encontram-se na **tabela 3**. Os resultados mostram que apenas seis isolados de *Trichoderma* spp., dos 80 avaliados, não expressaram capacidade antagônica sobre a inibição micelial do patógeno (PIC) quando comparados ao tratamento controle. Os demais desempenharam porcentagens de inibição que variavam entre aproximadamente 2-7% (35 isolados) e 8-22% (39 isolados). Assim, segundo as médias do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), apenas as médias do grupo 3 obtiveram resultados não significativos, semelhantemente aos IVCM do tratamento controle. As médias dentro de um mesmo grupo não diferem entre si (**Tabela 3**).

Tabela 3. Avaliação *in vitro* da atividade antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. contra *F. solani* f. sp. *piperis*

Grupos	Tratamento/Código dos Isolados	IVCM ²		% PIC ¹
1	T62, T69, T77, T44, T76, T18, T60, T80, T10, T09, T21, T17, T54, T27, T63, T70, T26, T20, T11, T43, T02, T49, T36, T29, T14, T22, T67, T42, T64, T61, T15, T58, T73, T07, T16, T31, T74, T30, T78	37,39 - 44,55	a ³	21,89 - 7,96
2	T01, T12, T37, T32, T47, T33, T53, T46, T65, T06, T59, T57, T66, T24, T25, T71, T23, T38, T03, T79, T72, T08, T34, T28, T45, T52, T48, T04, T40, T41, T19, T51, T05, T75, T50	44,66 - 47,17	b	6,71 - 1,56
3	T56, T39, Controle, T55, T35, T68, T13	47,87 - 51,01	c	---
CV% ⁴ 6,45				

¹ PIC: Inibição de Crescimento Micelial (mm^2) = [(diâmetro da testemunha – diâmetro do tratamento / diâmetro da testemunha) / 100]; ² IVCM: Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (mm^2) = [(diâmetro final da colônia / número de dias de incubação) / 100]. ³ Médias do mesmo grupo, na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Médias com diferentes letras na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. ⁴ Coeficiente de Variação.

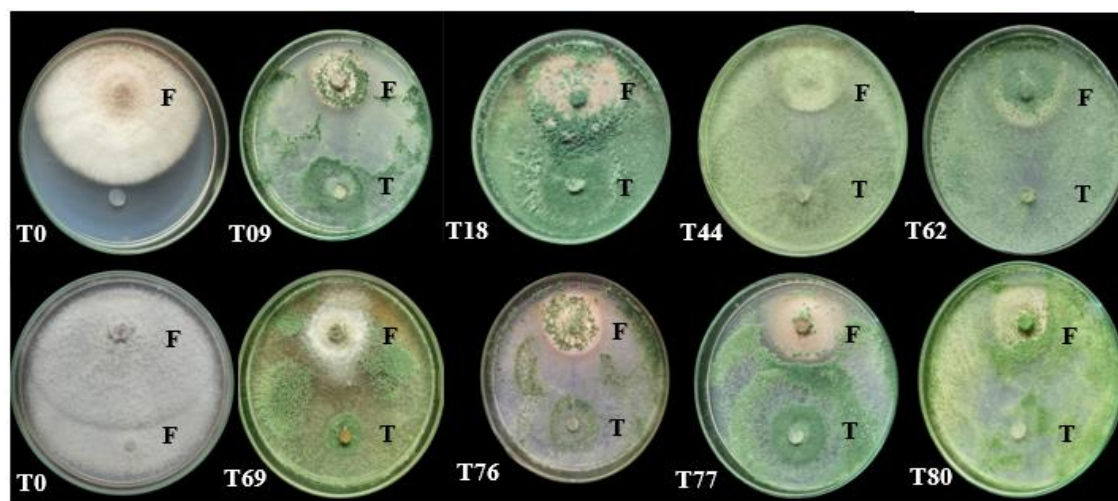
Com base na escala de Bell *et al.* (1982) observou-se que da totalidade dos isolados de *Trichoderma* spp. avaliados contra o *F. solani* f. sp. *piperis* (**Tabela 4**), quatro cresceram até a metade da placa de Petri (isolados do grupo 3), obtendo cerca de 40% de antagonismo, nove isolados cresceram sobre 2/3 da placa (isolados do grupo 2), conseguindo 60% de antagonismo, e 67 isolados (isolados do grupo 1) conseguiram se desenvolver por toda a placa, com melhores resultados, compreendendo cerca de 80% de antagonismo. A **Figura 3** apresenta a atividade antifúngica dos melhores isolados de *Trichoderma* spp., selecionados nos testes *in vitro*, sobre *F. solani* f. sp. *piperis*.

Tabela 4: Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo a *F. solani* f. sp. *piperis* segundo as escalas de Bell (1982)

Grupos	Tratamento/Código dos Isolados	Notas Bell (1982) *
1	T01, T02, T03, T04, T05, T06, T07, T08, T09, T10, T11, T14, T15, T16, T17, T18, T20, T21, T22, T25, T26, T27, T28, T29, T30, T31, T32, T33, T36, T37, T38, T40, T41, T42, T43, T44, T45, T46, T47, T48, T49, T52, T53, T54, T57, T58, T59, T60, T61, T62, T63, T64, T65, T66, T67, T68, T69, T70, T71, T72, T73, T74, T76, T77, T78, T79, T80	1 a ¹
2	T12, T19, T23, T24, T34, T50, T51, T56, T75	2 b
3	T13, T35, T39, T55	3 c
4	Controle	4 d
CV% ² 5,19		

* Nota 1: o antagonista cresce por toda a placa de Petri; Nota 2: o antagonista cresce sobre 2/3 da placa; Nota 3: o antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa; Nota 4: o patógeno cresce sobre 2/3 da placa. ¹ Médias do mesmo grupo, na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Médias com diferentes letras na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. ² Coeficiente de Variação.

Figura 3. Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *F. solani* f. sp. *piperis* através do teste de culturas pareadas, em meio BDA, após 7 dias de cultivo



(T0) Controle. (T) Indica a posição do isolado de *Trichoderma* spp. (F) Indica a posição do *F. solani* f. sp. *piperis*.

3.3.2. Ação de metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp.

Pelo teste de antibiose, observou-se ação dos metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. (**Figura 4**). Os isolados de 11 grupos (grupos de 1-11) foram estatisticamente eficientes segundo as médias dos IVCM e, conseqüentemente, na porcentagem da redução do crescimento micelial de *F. solani* f. sp. *piperis*, quando comparados ao tratamento controle, com melhores resultados observados para os tratamentos T17, T09, T43 e T69 (**Tabela 5**).

Tabela 5: Inibição do crescimento micelial de *F. solani* f. sp. *piperis* por *Trichoderma* spp. por meio de metabólitos voláteis

Grupo	Isolados	IVCM ²	% PIC ¹
1	T17, T09, T43, T69	30,55 - 32,02 a ³	61,81 - 59,98
2	T77, T62, T80, T44, T07	33,96 - 34,45 b	57,55 - 56,94
3	T11, T70, T31, T18, T76, T64	36,51 - 38,57 c	54,36 - 51,79
4	T03, T15, T37, T02, T10, T49, T01, T08, T14, T29, T42, T54	40,91 - 45,55 d	48,86 - 43,06
5	T16, T06, T63, T58, T04, T46, T36, T25, T57, T28, T30, T40	52,62 - 57,82 e	34,23 - 27,73
6	T21, T26, T65, T27, T38, T52, T73, T05, T24, T66, T45, T48, T53	62,28 - 66,92 f	22,15 - 16,35
7	T41, T78, T12, T71, T74, T20, T59	68,57 - 70,65 g	14,29 - 11,69
8	T79, T61, T22, T47, T72, T50	71,64 - 72,27 h	10,45 - 9,66

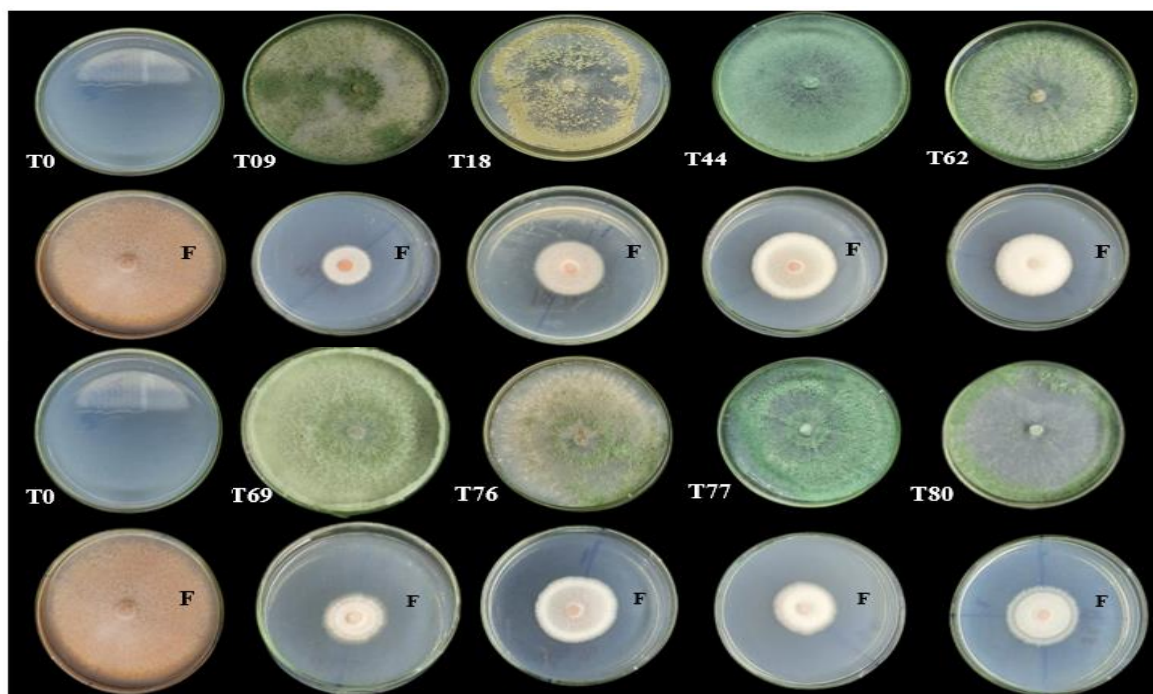
Continua.

Continua.

9	T67, T19, T23, T51, T60	73,99 - 74,61	i	7,51 - 6,74
10	T32, T34, T39, T68	75,76 - 76,30	j	5,30 - 4,63
11	T75, T56, T33, T55	77,20 - 79,99	l	3,50 - 2,51
12	T35, T13, Controle	79,51 - 80	m	0,61 - 0,00
		CV%⁴	7,48	

¹ **PIC:** Inibição de Crescimento Micelial (mm^2) = $[(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}) / \text{diâmetro da testemunha}] / 100$; ² **IVCM:** Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (mm^2) = $[(\text{diâmetro final da colônia} / \text{número de dias de incubação}) / 100]$. ³ Médias do mesmo grupo, na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Médias com diferentes letras na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. ⁴ Coeficiente de Variação.

Figura 4. Efeito de metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp. contra *F. solani* f. sp. *piperis*



3.4. Caracterização enzimática dos isolados de *Trichoderma* spp. em meios sólidos

Para o experimento de avaliação qualitativa envolvendo a capacidade de produção enzimática em meios sólidos (**Tabela 6**), observou-se que, dos 80 isolados, 31 não produziram nenhum tipo de enzima avaliada (protease, amilase, quitinase, lipase e esterase). Em contrapartida, 49 isolados produziram ao menos um tipo de enzima, entre eles, 14 isolados de *Trichoderma* spp. (T1, T9, T16, T18, T21, T30, T43, T44, T53, T62, T69, T76, T80 e T83) se destacaram pela produção de maior diversidade dessas enzimas. A enzima quitinase não foi produzida por nenhum dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nesse estudo.

1 **Tabela 6.** Produção enzimática de *Trichoderma* spp. isoladas de áreas com *Piper*, em meios sólidos

Trat ^z	Enzimas*					Trat ^z	Enzimas*					Trat ^z	Enzimas*					Trat ^z	Enzimas*				
	Pr	Am	Qu	Li	Es		Pr	Am	Qu	Li	Es		Pr	Am	Qu	Li	Es		Pr	Am	Qu	Li	Es
C ^x	-	-	-	-	-	T21	+	+	-	-	+	T42	-	-	-	+	+	T63	+	-	-	-	+
T1	+	-	-	+	+	T22	+	-	-	+	-	T43	+	+	-	-	+	T64	+	+	-	-	-
T2	-	-	-	+	+	T23	-	-	-	-	-	T44	+	+	-	-	+	T65	-	-	-	-	-
T3	-	+	-	+	-	T24	-	-	-	-	-	T45	+	-	-	-	-	T66	-	-	-	-	-
T4	-	-	-	-	-	T25	-	-	-	-	-	T46	-	-	-	-	-	T67	+	-	-	-	-
T5	+	+	-	-	-	T26	+	-	-	-	-	T47	-	-	-	-	-	T68	+	-	-	-	-
T6	-	-	-	-	-	T27	+	+	-	-	-	T48	-	-	-	-	-	T69	+	+	-	-	+
T7	+	+	-	-	-	T28	-	-	-	-	-	T49	-	+	-	-	-	T70	+	-	-	-	-
T8	+	-	-	-	+	T29	+	-	-	-	-	T50	-	-	-	-	-	T71	-	-	-	-	-
T9	+	+	-	+	+	T30	+	-	-	+	+	T51	-	-	-	-	-	T72	-	-	-	-	-
T10	-	-	-	-	-	T31	+	-	-	-	+	T52	-	-	-	-	-	T73	+	-	-	-	-
T11	+	+	-	-	-	T32	-	-	-	-	+	T53	+	-	-	+	+	T74	+	+	-	-	-
T12	-	-	-	-	-	T33	-	-	-	+	+	T54	-	-	-	+	+	T75	-	-	-	-	-
T13	-	-	-	-	-	T34	-	-	-	-	-	T55	-	-	-	-	-	T76	+	+	-	+	-
T14	+	+	-	-	-	T35	-	-	-	-	-	T56	-	-	-	-	-	T77	+	+	-	+	+
T15	-	+	-	-	-	T36	+	+	-	-	-	T57	-	-	-	-	-	T78	-	-	-	-	-
T16	+	-	-	+	+	T37	+	-	-	-	-	T58	-	-	-	+	+	T79	-	-	-	-	-
T17	+	-	-	-	-	T38	-	+	-	-	-	T59	+	-	-	-	-	T80	+	-	-	+	+
T18	+	+	-	+	+	T39	-	-	-	-	-	T60	+	+	-	-	-						
T19	-	-	-	-	-	T40	-	-	-	-	-	T61	-	-	-	-	-						
T20	+	+	-	-	-	T41	-	-	-	+	+	T62	+	+	-	+	+						

2 ^zTrat: Tratamentos; ^xC: Controle; * Enzimas: (Pr) protease; (Am) amilase; (Qu) quitinase; (Li) lipase; (Es) esterase; ¹Fenótipo positivo, caracterizado pela formação
3 de halo inibidor (+); Fenótipo negativo, sem produção de halo (-); *Trichoderma* spp. em destaque, negrito, representam isolados de maior expressão enzimática.

Levando em consideração o desempenho antagônico *in vitro* dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *F. solani* f. sp. *piperis*, segundo os resultados conjuntos de IVC, PIC, Notas de Bell e sua capacidade de produzir maior diversidade de enzimas líticas, foram selecionados oito isolados de *Trichoderma* spp. para os demais testes experimentais em casa de vegetação.

3.5. Potencial antagônico *in vivo* dos isolados selecionados

Os isolados selecionados de *Trichoderma* spp. T09, T18, T44, T62, T69, T76, T77, T80 foram avaliados *in vivo* em mudas de pimenteira-do-reino contra *F. solani* f. sp. *piperis*. Todos os isolados mostraram respostas positivas significativas contra os isolados patogênicos testados. Segundo os valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) as melhores respostas de biocontrole foram observadas em mudas inoculadas com os isolados T80 e T18, já que os resultados mostram que esses isolados de *Trichoderma* apresentaram alto desempenho, variando entre 73 e 78% de inibição da lesão, em contraste com o controle com produto comercial formulado (TPF) Tribalance® (mix de espécies de *Trichoderma*) que proporcionou aproximadamente 45% de inibição, quando comparados com o tratamento controle (T0) que recebeu apenas água (Tabela 7, Figura 5).

Tabela 7. Avaliação da atividade antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. contra o agente da fusariose *F. solani* f. sp. *piperis* em mudas de pimenteira-do-reino

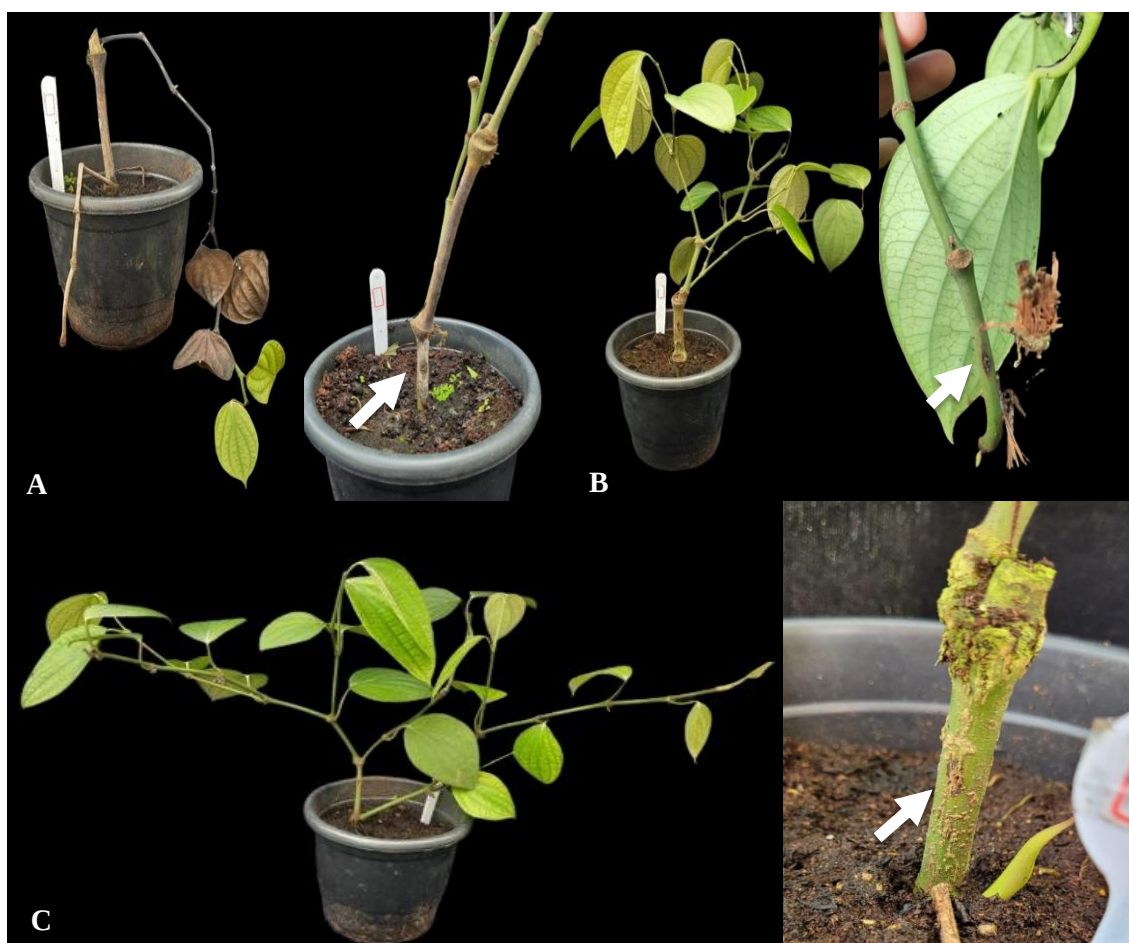
Tratamentos	AACPD*	%Controle
T80	198,89 a ¹	77,80
T18	241,32 a	73,06
T44	390,66 b	56,40
T69	490,6 c	45,24
TPF	496,72 c	44,56
T09	582,8 d	34,95
T76	619,89 d	30,81
T62	634,99 d	29,12
T77	651,34 d	27,30
Controle	895,91 e	0,00
CV (%)	17,89	

* Área abaixo da curva de progresso da doença ¹ Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott knott.

Segundo a avaliação descritiva com a escala de notas para os sintomas da fusariose, o tratamento controle (sem *Trichoderma* spp.) apresentou plantas com sintomas de desfolha severa, clorose e murcha das folhas, além de plantas mortas (nota 9). Os tratamentos com inoculação de *Trichoderma* spp. apresentaram sintomas menos severos com notas variando de 2 a 7. Os tratamentos T9, T62, T76 e T77 apresentaram plantas com sintoma de clorose e

algumas repetições com queda dos entrenós e lesões maiores que 35 mm (nota 6, nota 7). Os sintomas das plantas dos tratamentos TPF e T69 apresentaram sintomas clorose (nota 4, nota 5) e as dos tratamentos T18, T80 sintomas muito leves no ponto de inoculação com lesões bem pouco desenvolvidas (nota 2, nota3).

Figura 5. Lesão em mudas de pimenteira-do-reino: severidade da fusariose após 30 dias da inoculação com *F. solani* f. sp. *piperis* em mudas previamente tratadas com *Trichoderma* spp. endofíticos (T18) em *P. nigrum* e nativos da rizosfera de áreas com *P. tuberculatum* (T80) na Amazônia Oriental



(A) Controle, sem a presença de *Trichoderma* spp. (B) Tratamento com *Trichoderma* T80 (C) Tratamento com *Trichoderma* T18. Setas: ponto de inoculação com *F. solani* f. sp. *piperis*.

4. DISCUSSÃO

Diversos estudos comprovam a eficácia de isolados de *Trichoderma* spp. contra uma ampla variedade de fitopatógenos habitantes do solo (ALVARADO-MARCHENA; RIVERA-MÉNDEZ, 2016; CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2018; KUMAR; SHARMA, 2016; NAGAMANI *et al.*, 2017; O'BRIEN, 2017; QUEVEDO *et al.*, 2022; SRIVASTAVA *et al.*, 2016), embora a maioria dos agentes utilizados no biocontrole de doenças de plantas apresentem certo grau de

especialização. No entanto, a eficácia do controle pode variar, dependendo do isolado e de sua adaptação às condições específicas, tanto bióticas quanto abióticas, dentro e entre as diferentes espécies de *Trichoderma* (DENNIS; WEBSTER, 1971; LOUZADA *et al.*, 2009; SHAH; AFIYA, 2019).

Os fungos *Trichoderma* spp. usam vários mecanismos complexos como competição por espaço e nutrientes, síntese de antibióticos e produção de enzimas degradantes da parede celular contra patógenos fúngicos, que geralmente interagem completamente no fenômeno do biocontrole (GHORBANPOUR *et al.*, 2018). A combinação de diversos mecanismos antagônicos em um microrganismo pode caracterizá-lo como um biocontrolador eficaz, capaz de exercer uma influência negativa sobre os fitopatógenos (SOOD *et al.*, 2020; TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022). O estudo *in vitro* corrobora com essas afirmações quando destaca isolados de *Trichoderma* spp. com percentual de inibição do patógeno *F. solani* f. sp. *piperis* de até 22% pelo teste de culturas pareadas, até 80% segundo a escala de nota de Bell (1982), até 62% por meio de compostos orgânicos voláteis e com 61% dos isolados produzindo ao menos um tipo de enzima. Com isso, os isolados que acumularam mecanismos antagônicos como competição, parasitismo e antibiose *in vitro* foram selecionados para teste de biocontrole *in vivo*.

Pesquisas anteriores utilizando a técnica de pareamento de culturas para avaliar a ação antagonista *in vitro* de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* spp. também destacaram a redução no crescimento micelial do patógeno. Krahm (2017) verificou que isolados de *Fusarium* spp. apresentaram redução no crescimento micelial variando de 18,84 mm a 29,92 mm. Os resultados de Filizola *et al.* (2019) também avigoram os resultados desse estudo, onde os autores verificaram isolados de *Trichoderma* spp. que reduziram para 50% o crescimento de *Fusarium* spp. Outro estudo, utilizando a mesma técnica para avaliar a ação antagonista do fungo *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium oxysporum*, mostra percentual de inibição que variou de 13,06% a 14,24% (QUEVEDO *et al.*, 2022). A efetividade da utilização de *Trichoderma* spp. como antagonista pode ter ocorrido por diferentes mecanismos, como antibiose e competição.

A competição por espaço pode induzir o desenvolvimento de mecanismos parasitários pelo *Trichoderma* spp. acelerando seu crescimento frente ao fitopatógeno (BRITO; MILLER; STADNIK, 2010). Essa afirmativa justifica os resultados segundo a escala de notas de Bell (1982) onde 84% dos isolados de *Trichoderma* spp. ocuparam 100% da placa, recebendo nota igual a 1,0. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os observados por outros autores que verificaram isolados de *Trichoderma* spp. chegando a ocupar 100% da placa e recebendo nota igual a 1,0 (AOYAGI; DOI, 2021; CHAGAS JÚNIOR *et al.*, 2018).

Fortalecendo nossos resultados, estudo afirma taxas de crescimento de *Trichoderma* spp. aproximadamente quatro vezes maiores do que a taxa de crescimento dos isolados de *Fusarium* após um período de 72 h de avaliação (FILIZOLA *et al.*, 2019).

Os compostos voláteis, por serem hidrofóbicos, evaporam prontamente em temperatura ambiente, conseguindo atravessar facilmente as membranas celulares e sendo liberados no ar ou no solo na ausência de uma barreira de difusão (HUNG; LEE; BENNETT, 2013; SILVA *et al.*, 2022). A atividade dos compostos voláteis de *Trichoderma* spp. contra *F. solani* f. sp. *piperis* demonstrou ser eficaz na maioria dos tratamentos. No presente experimento, o isolado de *F. solani* f. sp. *piperis* alcançou uma inibição de até 62% nos resultados mais promissores, evidenciando que os isolados antagonistas exercem uma ação direta na supressão do patógeno através dos metabólitos voláteis. Esses achados estão em consonância com a hipótese proposta por Dennis e Webster (1971), os quais afirmaram que as espécies do gênero *Trichoderma* são proficientes na produção de metabólitos voláteis com capacidade de inibir o crescimento de diversos microrganismos em meio de cultura. A eficácia desses compostos voláteis liberados por culturas de *Trichoderma* contra fitopatógenos varia conforme o isolado e o patossistema (LAZAZZARRA, *et al.* 2021).

Foi observado que 49 isolados desempenharam efetividade na liberação de enzimas extracelulares como protease, amilase, lipase e esterase. Essas enzimas quebram as estruturas dos fungos parasitados, e são características comuns de micoparasitismo em muitos agentes de biocontrole (FLEURI; SATO, 2005; LORITO *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2010). Os fungos do gênero *Trichoderma* alimentam-se através de suas hifas, que secretam enzimas hidrolíticas, permitindo assim romper a parede celular do hospedeiro, e são consideradas de importância determinante na habilidade antagonista desse fungo (AIT-LAHSEN *et al.*, 2001; MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019; PRETSCHER *et al.*, 2018; THANE *et al.*, 2000).

Na maioria dos casos, os agentes de biocontrole são identificados através da triagem de organismos presentes na rizosfera ou na população endofítica com o objetivo de verificar a capacidade de inibição do crescimento do patógeno alvo em condições *in vitro*. Os que demonstram essa capacidade são então submetidos a uma avaliação mais detalhada, pois os mecanismos antagônicos desempenhados pelos agentes biocontroladores só podem ser plenamente evidenciados quando presentes em sistemas naturais (COLLINGE *et al.*, 2022; O'BRIEN, 2017).

No ensaio *in vivo*, as repostas inibitórias sobre os sintomas da fusariose em mudas de pimenteira-do-reino tratadas com isolados selecionados de *Trichoderma* spp. são categóricas e corroboram para a compreensão das atividades biocontroladoras exercidas pelos isolados

antagônicos. Os resultados revelaram que os isolados de *Trichoderma* spp. podem exibir capacidade variável de redução da severidade dos sintomas da fusariose na pimenteira-do-reino, destacando os isolados T80 e T18 como os mais eficazes agentes de controle biológico. Essa eficácia está relacionada a atividade de defesa que exercem, a produção de substâncias inibitórias e a estrutura física dos mesmos, conforme observado por Chagas Júnior *et al.* (2018). Os resultados assinalados nesse trabalho estendem novas expectativas atreladas ao manejo da fusariose da pimenteira-do-reino. Organismos potencialmente biocontroladores com características antagônicas desejáveis representam uma alternativa promissora e aplicável, seguro ao ambiente e eficiente para a cultura.

O presente estudo também confirma a importância de identificar novos agentes de biocontrole nativos da região e do patossistema alvo. Os resultados mostram que três isolados nativos apresentaram maiores respostas inibitórias dos sintomas da fusariose em mudas de pimenteira-do-reino do que quando inoculadas com produto comercial a base de mix de *Trichoderma* spp. comparadas ao controle absoluto. Esse comportamento pode ser explicado pelo maior poder de adaptação dos isolados testados às condições bióticas e abióticas locais (AFIYA, 2019; DENNIS; WEBSTER, 1971; NASCIMENTO *et al.*, 2022). SILVA *et al.* (2015) estudando espécies de *Trichoderma* spp. nativas e não nativas concluíram que isolados não nativos apresentaram redução na viabilidade de biocontrole de fungo habitante do solo quando comparado aos isolados nativos e apontaram a importância de optar, sempre que possível, por isolados nativos oriundos de áreas onde foi constatada a presença da doença em questão.

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicaram que os isolados selecionados de *Trichoderma* spp., obtidos de áreas com *Piper* spp., inibiram eficientemente *F. solani* f. sp. *piperis* *in vitro*, e reduziram a severidade da fusariose da pimenteira-do-reino *in vivo*. Este trabalho oportuniza o surgimento de novas pesquisas, visando a elucidação dos fatores que atuam sobre a eficácia nesse sistema de biocontrole como a caracterização de perfis químicos dos compostos antifúngicos, eficiência em campo e possíveis formulações, possibilitando uma utilização mais abrangente e eficaz destes agente nativos de biocontrole.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.; JIANG, D.; FU, Y. *Trichoderma* spp. as antagonist of *Rhizoctonia solani*. **J Plant Pathol Microbiol.** v. 8, 2017. DOI: 10.4172/2157- 7471.1000402.
- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários [online]: **MAPA**, 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 14 mai. 2023.
- AIT-LAHSEN, H. *et al.* An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Applied Environmental Microbiology.** v.67, n.12, p.5833–5839, 2001.
- ALVARADO-MARCHENA, L.; RIVERA-MÉNDEZ, W. Molecular identification of *Trichoderma* spp. in garlic and onion fields and in vitro antagonism trials on *Sclerotium cepivorum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.** v. 40, p. 1-9, 2016. DOI 10.1590/18069657rbcs20150454.
- AOYAGI, L. N.; DOI, S. M. O. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, Curitiba, v.4, n.3, p. 3234-3239, 2021.
- ASAD, S. A. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review. **Ecological Complexity.** v. 49, 2022. DOI 10.1016/j.ecocom.2021.100978.
- BELL, D. K. *et al.* In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Ecology and Epidemiology**, Järfälla, v. 72, n. 4, p. 379 - 382, 1982.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio-Ambiente, 2009.
- BRITO, F.S.; MILLER, P.R.M.; STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 5, p. 43 53, 2010.
- BRITO, J. P. *et al.* Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 600, 2014.
- CARNEIRO JÚNIOR, J. F. C. *et al.* Análise de mercado da pimenta-do-reino no período 1990 a 2015. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 11, n. 6, p. 116-145, 2017.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.
- CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. *Agri-environmental sciences*, v. 4, n. 2, p. 9-15, 2018.
- CHAKRAPANI, K. *et al.* In vitro evaluation of antagonistic potential of native *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* causing sheath blight of rice in Manipur. **International Journal of Chemical Studies.** v. 7(1), p. 2207-2210, 2019.
- COLLINGE, D. B. *et al.* Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction? **Plant Pathology**, v. 71, 2022; p.1024 -1047, 2022.
- CONN, H. *et al.* Staining methods. In: **Manual of Microbiological Methods**. NK, USA: Society of American Bacteriologists. 1957. p. 10-36.
- COSTA, L. P. Experimentação de diferentes métodos para conservação de coletâneas fúngicas. **Revista Brasileira Militar de Ciências.** v. 6, n. 16, 2020. DOI 10.36414/rbmc.v6i16.62.
- D'ADDAZIO, V. **Crescimento micelial de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* e respostas de cultivares de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) ao estresse abiótico e biótico: biometria, fotossíntese, resistência e avaliação de produtos alternativos de controle da fusariose**. 2017. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) -

Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

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

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton, CRC Press, 1995. 434p
EDGINGTON, L. V. *et al.* Fungitoxic spectrum of bendizidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42-44, 1971.

ES-SOUFI, R. *et al.* Biocontrol Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Bc2 and *Trichoderma harzianum* TR against Strawberry Anthracnose under Laboratory and Field Conditions. **Agricultural Sciences**. v.11, p. 260-277, 2020. DOI 10.4236/as.2020.113017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FILIZOLA, P. R. B. *et al.* Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains. **Microb Cell Fact**. v.18, n. 89, 2019. DOI 10.1186/s12934-019-1108-y.

FLEURI, L. F. *et al.* Elucidação parcial da estrutura de aminogluconooligossacarídeos (AGO's) produzidos enzimaticamente. Polímeros: **Ciência e Tecnologia**, v. 19, p. 111-116, 2009.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Production, purification, cloning and application of lytic enzymes. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FREEMAN, S. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 110, p. 361-370, 2004.

GHORBANPOUR, M. *et al.* Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. **Biological Control**. v. 117, p. 147-157, 2018. DOI 10.1016/j.biocontrol.2017.11.006.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. **Fungal Ecology**. v. 6, p. 19-26, 2013. DOI 10.1016/j.funeco.2012.09.005.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal (PAM)**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/pimenta-do-reino/br>>. Acesso em: 21 out. 2023.

Ji, S. *et al.* *Trichoderma* biofertilizer (mixTroTha) mediates *Malus sieversii* resistance to *Alternaria alternata*. **Biological Control**. v. 156, 2021. DOI 10.1016/j.biocontrol.2021.104539.

KRAHN, J. R. T. **Microbiota do solo em três sistemas de cultivo de citros e patogenicidade de *Fusarium* spp.** 2017. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

KUMAR, M.A.; SHARMA, P. Morphological characterization of biocontrol isolates of *Trichoderma* to study the correlation between morphological characters and biocontrol efficacy. **Int. Lett. Nat. Sci.** v 55, p. 57-67, 2016.

LAZAZZARA, V. *et al.* *Trichoderma* spp. volatile organic compounds protect grapevine plants by activating defense-related processes Against downy mildew. **Physiologia Plantarum**. v.172: p.1950-1965, 2021. DOI 10.1111/ppl.13406.

LODDER, J.; KREGER-VAN, R.I.J. The yeasts-a taxonomic study, **The yeasts-a taxonomic study**. v.31. p. 36-50, 1952.

LOURINHO, M.P. *et al.* Conjuntura da pimenta do reino no mercado nacional e na região Norte do Brasil. **Revista Enciclopédia Biofera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.10, n.18; p 1016-1031, 2014.

LOUZADA, G. A. S. *et al.* Potencial antagonico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotrop**. v. 9 n. 3, 2009. DOI 10.1590/S1676-06032009000300014.

- MELLO, S. C. M. 2008. Recursos genéticos de microrganismos. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. (ed.). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucional e políticas**. v. 2. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2008.700 p.
- MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (ed.). **Trichoderma: uso na agricultura**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 538 p.
- MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R., *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J.C. (ed.) **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília: Embrapa. 2019. p. 181 - 199.
- MUKHOPADHYAY, R.; KUMAR, D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 30, 2020. DOI10.1186/s41938-020-00333-x.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.
- NAGAMANI, P. *et al.* Effect of volatile and no volatile compounds of *Trichoderma* spp. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 6, p. 1486-1491, 2017. DOI 10.11648/j.ajls.s.2014020602.12.
- NASCIMENTO, *et al.* *Trichoderma*: biological control efficiency and perspectives for the Brazilian Midwest states and Tocantins. **Brazilian Journal of Biology**. v. 82, 2022. DOI 0.1590/1519-6984.260161.
- O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46 p. 293-304, 2017.
- OLIVEIRA, C. S. **Controle da fusariose da pimenta-do-reino com aplicação de *Trichoderma harzianum***. 2012. 41 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical). Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, São Mateus – ES. 2012.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras/MG. 1991.
- PASCHOLATI, S. F.; SOUZA, V. H. M.; CARDOSO FILHO, J. A. Indução de resistência por *Trichoderma*. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. (ed.). **Trichoderma: uso na agricultura**. Embrapa Soja: Brasília, Brasil, v.1. 2019. p. 235-254.
- PRETSCHER, J. *et al.* Yeasts from different habitats and their potential as biocontrol agents. **Fermentation**. v. 4, n.2, 2018. DOI 10.3390/fermentation4020031.
- QUEVEDO, A. C. *et al.* Ação antagonista *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum*. **Ciência Florestal**, v.32, n. 4, p. 2288-2303, 2022. DOI 10.5902/1980509868437.
- SAMUELS, G. J. *et al.* **Trichoderma online, systematic mycology and microbiology**. 2009. Disponível em: </taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm > Acesso em: 10 jun. 2022.
- SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**. v.50, p.1-8, 2005.
- SHAH, M. M.; AFIYA, H. Introductory Chapter: Identification and Isolation of *Trichoderma* spp. Their Significance in Agriculture, Human Health, Industrial and Environmental Application. In: SHAH, M. M.; AFIYA, H.(ed.) **Trichoderma: The Most Widely Used Fungicide**. IntechOpen. 2019.12 p.
- SIERRA, G.A. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. Antonine van Leeuwenhoeck, **Dordrecht**, v. 28, p. 15-22, 1957.
- SILVA, G. B. P. *et al.* Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Rev. Caatinga**. Mossoró, v. 28, n. 4, p. 33 – 42, 2015. DOI 10.1590/1983-

21252015v28n404rc.

SILVA, L. R. *et al.* *Trichoderma*: suas interações e uma abordagem metodológica aplicada ao estudo de compostos orgânicos voláteis para o mofo-branco e promoção de crescimento de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 28, p. 163-183, 2022. DOI 10.31976/0104-038321v280007.

SILVA, S.O.; NETO, A.P.D.; SILVA, M.B. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 1, n. 1, p. 88-92, 2011.

SMIBERT, R.M; KRIEG, N. R. General characterization. **American Society of Microbiology**. v.30, p. 409-443, 1981.

SOARES, F. E. F. *et al.* Biological control 2.0: Use of nematophagous fungi enzymes for nematode Control. **Journal of Natural Pesticide Research**. v.4, 2023. DOI 10.1016/j.napere.2023.100025.

SOOD, M. *et al.* *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. **Plants**. v. 9, n. 762, 25p, 2020. DOI 10.3390/plants9060762.

SRIVASTAVA, M. *et al.* *Trichoderma* a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 310-316, 2016. DOI 10.5897/AJAR2015.9568.

THRANE, C. *et al.* Substrate colonization, strains competition, enzyme production in vitro, and biocontrole of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. Isolates P1 and T3. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p. 215-20, 2000.

TREMACOLDI, C.R. Doenças causadas por fungos. In: LEMOS, O. F.; TREMACOLDI, C. R.; POLTRONIERI, M. C. (ed.). **Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no Estado do Pará**. Brasília: Embrapa. 2014. p.28-34.

TREMACOLDI, C.R. **Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle** Belém. Embrapa Amazônia Oriental. 2010. 23p. (Documentos, 367).

TYŚKIEWICZ, R. *et al.* *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. **Int. J. Mol. Sci.** v.23, n.4, 2022. DOI 10.3390/ijms23042329.

WANG, S. *et al.* Combined application of *Trichoderma harzianum* SH2303 and difenoconazole propiconazolein controlling Southern corn leaf blight disease caused by *Cochliobolus heterostrophus* in maize. **Journal of Integrative Agriculture**. v. 18, n. 9, p. 2063–2071, 2019. DOI 10.1016/S2095 3119(19)62603-1.

CAPÍTULO III

Isolados de *Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em mudas de pimenteira-do-reino na Amazônia Oriental

Isolados de *Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em mudas de pimenteira-do-reino na Amazônia Oriental

Jackeline Araújo Mota Siqueira^{1,3*}, Deyse Ribeiro Silvino de Jesus², Tamirys Marcelina da Silva⁴, Lilian Rodrigues Silva⁴, Carolina Melo da Silva³, Iwanne Lima Coelho¹, Delson Laranjeira^{1*}, Alessandra Keiko Nakosone^{2*}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil

² Empresa Brasileira de Pesquisa (EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL), Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/nº, Marco, CEP: 66095-903, Belém -PA, Brasil

³ Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus de Capitão Poço, Rua do Pau Amarelo, s/nº, Vila Nova, CEP: 68650-000, Capitão Poço-PA, Brasil

⁴ Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus sede, Avenida Presidente Tancredo Neves, nº2501, Terra Firme, CEP: 66077-830, Belém-PA, Brasil

*Autores correspondentes. Endereço de e-mail: jackelinearaujo86@hotmail.com (Jackeline Araújo Mota Siqueira), delson.laranjeira@ufrpe.br (Delson Laranjeira)

RESUMO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), cultura de exploração milenar, é a especiaria de maior importância comercial e consumo no mundo, cultivada como commodity agrícola e, com espaço garantido nas especulações financeiras em bolsas de valores. No Brasil, a produção de pimenta-do-reino está distribuída nas regiões sudeste, norte e nordeste destacando os estados do Espírito Santo, Pará e Bahia como os principais produtores. Dentre as estratégias de enraizamento e produção de mudas, a aplicação de hormônios, fungicidas e fertilizantes minerais tem sido tradicionalmente recomendada. Porém, a eficiência biológica e econômica desse manejo é limitada, podendo causar, ainda, prejuízos ao ambiente. O emprego de promotores de crescimento de plantas para incrementar a biomassa vegetal e a produção agrícola, diminuir custos de manejo e impulsionar o desenvolvimento de práticas agrícolas sustentáveis emerge como uma das estratégias mais cruciais da atualidade. Espécies do gênero *Trichoderma* são reconhecidamente capazes de promover crescimento de plantas levando a mudanças significativas no metabolismo vegetal. O estudo teve como objetivos (i) determinar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. de produzir hormônio de crescimento vegetal e (ii) investigar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em promover crescimento de mudas de pimenteira-do-reino e (iii) avaliar seus efeitos nas respostas bioquímicas da planta. Um total de 80 isolados do gênero *Trichoderma* obtidos de raízes e solos da rizosfera de *Piper* spp. na Amazônia Oriental foram testados *in vitro* quanto a capacidade de produzir ácido indolacético-AIA pelo método colorimétrico. Os representantes dos melhores resultados do teste *in vitro* (T03, T05, T07, T08, T13, T15, T21, T42, T45, T56, T63) foram investigados quanto aos seus efeitos no crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. Foram avaliados o número de folha (NF), número de entrenós (NEN), altura das mudas (ALP), comprimento da raiz (COMPR), diâmetro do colo (DC), massa fresca e seca da parte aérea (MFPA/MSPA) e da raiz (MFR/MSR). Os efeitos da inoculação com *Trichoderma* spp. às respostas bioquímicas nas mudas foi avaliado por análises da redutase do nitrato, amônio, aminoácidos solúveis totais, carboidratos solúveis totais e sacarose das amostras do material vegetal folha e raiz. Foram observados 12 grupos de isolados de *Trichoderma* spp. com concentrações de AIA significativamente maiores (T03 e T21 maior que 15 µg mL⁻¹AIA) do que a concentração da testemunha (0,92 µg mL⁻¹AIA). Alguns isolados de *Trichoderma* spp. proporcionaram crescimento das mudas de pimenteira-do-reino quando comparados ao tratamento controle, 60 dias após o transplântio. O estudo mostrou respostas bioquímicas significativas nas mudas de pimenteira-do-reino, quanto às atividades relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, indicando um bom estado metabólico regulador da planta na presença de *Trichoderma* spp. O isolado T21, proveniente de áreas com *P. nigrum* da mesorregião Nordeste Paraense, foi selecionado como o mais eficiente nas respostas de crescimento das mudas de pimenteira-do-reino, com incrementos de 64,6% na ALP, 39,2% no COMPR, 75,4% no DC, 51,73% na MFR e 64,4% na MSR. Esse isolado pode ser um possível promotor de crescimento para a cultura apresentando propriedades importantes como produção de fitormônios, possível produção de compostos orgânicos voláteis e atuação no metabolismo de assimilação de nitrogênio. As evidências fornecidas nesse estudo apoiam fortemente a possibilidade de usar *Trichoderma* spp. como promotor de crescimento seguro, ecologicamente correto e eficaz para a cultura da pimenteira-do-reino.

Palavras-chave: biomassa, bioinoculante, fitohormônios, *Piper nigrum* L.

ABSTRACT

Black pepper (*Piper nigrum* L.), a crop with millennia of exploitation, is the most commercially important spice and consumed worldwide, cultivated as an agricultural commodity and with a guaranteed place in financial speculation on stock exchanges. In Brazil, black pepper production is distributed in the Southeast, North, and Northeast regions, with the states of Espírito Santo, Pará, and Bahia standing out as the main producers. Among the strategies for rooting and seedling production, the application of hormones, fungicides, and mineral fertilizers has traditionally been recommended. However, the biological and economic efficiency of this management is limited and can still cause environmental damage. The use of plant growth promoters to increase plant biomass and agricultural production, reduce management costs, and promote the development of sustainable agricultural practices emerges as one of the most crucial strategies today. Species of the genus *Trichoderma* are known to be capable of promoting plant growth, leading to significant changes in plant metabolism. The study aimed to (i) determine the ability of *Trichoderma* spp. isolates to produce plant growth hormones, (ii) investigate the ability of *Trichoderma* spp. isolates to promote the growth of black pepper seedlings, and (iii) evaluate their effects on plant biochemical responses. A total of 80 isolates of the genus *Trichoderma* obtained from roots and rhizosphere soils of *Piper* spp. in the Eastern Amazon were tested in vitro for their ability to produce indoleacetic acid (IAA) using the colorimetric method. Representatives of the best results from the in vitro test (T03, T05, T07, T08, T13, T15, T21, T42, T45, T56, T63) were investigated for their effects on the growth of black pepper seedlings. Leaf number (LN), internode number (IN), plant height (PH), root length (RL), stem diameter (SD), fresh and dry mass of the aerial part (FMAP/DMAP) and root (FMR/DMR) were evaluated. The effects of *Trichoderma* spp. inoculation on biochemical responses in the seedlings were assessed by analyzing nitrate reductase, ammonium, total soluble amino acids, total soluble carbohydrates, and sucrose in leaf and root samples. Twelve groups of *Trichoderma* spp. isolates were observed with significantly higher concentrations of IAA (T03 and T21 greater than 15 µg mL⁻¹ IAA) than the control concentration (0.92 µg mL⁻¹ IAA). Some *Trichoderma* spp. isolates promoted the growth of black pepper seedlings compared to the control treatment 60 days after transplanting. The study showed significant biochemical responses in black pepper seedlings regarding activities related to nitrogen metabolism, indicating a good metabolic regulatory state of the plant in the presence of *Trichoderma* spp. Isolate T21, originating from areas with *P. nigrum* in the Northeastern Pará mesoregion, was selected as the most efficient in promoting the growth of black pepper seedlings, with increases of 64.6% in PH, 39.2% in RL, 75.4% in SD, 51.73% in FMR, and 64.4% in DMR. This isolate may be a potential growth promoter for the crop, presenting important properties such as phytohormone production, possible production of volatile organic compounds, and involvement in nitrogen assimilation metabolism. The evidence provided in this study strongly supports the possibility of using *Trichoderma* spp. as a safe, environmentally friendly, and effective growth promoter for black pepper cultivation.

Keywords: biomass, bioinoculant, phytohormones, *Piper nigrum* L.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Piper*, o maior da família *Piperaceae*, é dominado pela espécie *Piper nigrum* L., conhecida como pimenta preta ou pimenta-do-reino. Pimenta-do-reino é uma especiaria amplamente apreciada ao longo da história humana (ALBUQUERQUE *et al.*, 1971; DUARTE, 2006; OLIVEIRA, M. *et al.*, 2020). A cultura adquiriu tamanha importância no mercado global que se tornou uma commodity agrícola, devido à sua alta demanda mundial e aos preços elevados que, em determinadas safras, são pagos aos produtores (CARNEIRO JÚNIOR *et al.*, 2017). O Brasil apresenta destaque mundial como segundo maior produtor e exportador de pimenta-do-reino, detendo, junto com o Vietnã e Indonésia, 65% do mercado global do produto (FAO, 2020; PAES E CRUZ, 2022; VIDAL, 2020). No ano de 2022, produziu 128 mil toneladas da especiaria em uma área de 41 mil ha, com um rendimento médio de 3.107 Kg/ha, movimentando quase 2 bilhões de reais no agronegócio brasileiro (IBGE, 2022).

A produção de mudas de *P. nigrum* voltada para fins comerciais ocorre por meio da propagação por estacas semilenhosas com três a cinco nós. Essa prática tem sido aconselhada e amplamente utilizada devido à sua capacidade de gerar pimenteiras-do-reino com características desejáveis, como boa formação, produção precoce, uniformidade e alto rendimento (COSTA, 2020; DUARTE, 1999; GOMES FILHO, 2017; SECUDINO, 2012). Contudo, é importante observar que o enraizamento e a formação de mudas podem ser desafiadores sem a intervenção de hormônios exógenos e o uso constante de fungicidas e fertilizantes minerais que elevam os custos de produção e desfavorecem o ambiente. Sem esse manejo é esperado um crescimento inicial lento, menor vigor e altas mortalidades que diminuem a produção de mudas em viveiros e dificultam a expansão dos plantios comerciais (BARROSO *et al.*, 2000; OLIVEIRA, V., 2020; SERRANO, *et al.*, 2012).

Diante desse desafio, são necessárias novas abordagens ecológicas para aprimorar a produção de mudas de pimenteira-do-reino com maior vigor e mínimo impacto ambiental associado. A seleção e o emprego de microrganismos promotores de crescimento de plantas para incrementar a biomassa vegetal e a produção agrícola, diminuir custos de manejo e impulsionar o desenvolvimento de práticas agrícolas sustentáveis emerge como uma das estratégias mais cruciais na atualidade (BARGAZ *et al.*, 2018; CHAGAS *et al.*, 2017; JASIM, *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2012; PASCUTTI; SILVESTRE; ORTIZ, 2024).

Fungos do gênero *Trichoderma* são uns dos principais microrganismos de importância para o aumento do crescimento vegetal (CHAGAS *et al.*, 2017; QUEIROZ; OLIVEIRA, 2023; TYŚKIEWICZ *et al.* 2022). Várias espécies de *Trichoderma* são reconhecidamente capazes de promover crescimento de plantas com aumento do teor de clorofila nas folhas, teor de sacarose,

1 produção de hormônio vegetal, solubilização de nutrientes entre outros, que estão diretamente
2 relacionados com produção de biomassa vegetal. Sánchez-Montesinos *et al.* (2020), estudando
3 o papel de *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* como promotor de crescimento de plantas
4 em horticultura, mostraram que a irrigação com esporos do fungo no substrato aumenta a
5 qualidade das mudas de tomate e pimenta. No trabalho de Souza *et al.* (2012), 54 isolados de
6 *Trichoderma* spp. causaram aumentos significativos na produção de matéria seca das plantas
7 de feijão, com incremento de até 57,81%. Ozdemir *et al.* (2016) mostraram que a aplicação *T.*
8 *harzianum* em plantas de alface promove maior teor de clorofila nas folhas, pigmento
9 fotossintético que está relacionado diretamente com a produção de biomassa vegetal. Sousa *et*
10 *al.* (2018) relataram aumento de 54% na matéria seca e um incremento de 35% de parte aérea
11 e raiz, ao avaliarem o crescimento de arroz com o uso de *T. asperellum* combinado com silício.
12 Os mecanismos de ação dos microrganismos promotores de crescimento carecem de muitos
13 estudos, ainda não foi dominado as complexas interações ecológicas que ocorrem entre
14 microrganismo, planta e solo (SILVIA; DOURADO, 2022; TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022). No
15 entanto, é compreendido que isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos e da rizosfera de áreas
16 da cultura que se quer promover o crescimento podem apresentar maior sucesso nas complexas
17 interações fungo-planta (SHAH; AFIYA, 2019; JACQUES *et al.*, 2021; NASCIMENTO *et al.*,
18 2022; SILVA *et al.*, 2015).

19 Apesar do elevado número de trabalhos avaliando o fungo *Trichoderma* spp. na
20 promoção de crescimento de plantas, o efeito de isolados endofíticos e da rizosfera de *Piper*
21 spp., adaptados as condições edafoclimáticas na Amazônia Oriental, ainda não foram
22 investigados. Trabalhamos com a hipótese que o tratamento com *Trichoderma* spp. pode
23 promover o crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. Assim, este trabalho teve como
24 objetivo: (i) avaliar e selecionar isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos e da rizosfera de
25 *Piper* spp. na Amazônia Oriental, quanto a capacidade de produzir hormônio de crescimento
26 vegetal, (ii) avaliar o efeito desses isolados nativos quanto a capacidade de promover
27 crescimento de mudas de pimenteira-do-reino e, (iii) investigar o efeito dessa interação nas
28 repostas bioquímicas das plantas.

29 2. MATERIAIS E MÉTODOS

30 2.1. Local do experimento

31 O ensaio foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia, casa de vegetação da Embrapa
32 Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil (1°26'30" S, 48°26'44" W), e no Laboratório de
33 Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores da Amazônia (EBPS) da Universidade
34 Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil (01 ° 27'21 " S, 48 ° 30'16 " W) no

período de outubro de 2022 a julho de 2023.

2.2. Material vegetal

As mudas de pimenteira-do-reino utilizadas no experimento foram da cultivar “Embrapa/Clonada”, com aproximadamente quatro meses de idade, obtidas através de estaquia e provenientes do Viveiro ProMudas, Castanhal, Pará, Brasil.

2.3. Material biológico

Foram utilizados isolados de *Trichoderma* spp. da coleção obtida pela parceria da EMBRAPA Amazônia Oriental e Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os isolados foram obtidos a partir de amostras de solo e raízes de áreas cultivadas com pimenteira-do-reino, visualmente saudáveis, na mesorregião do Nordeste Paraense (SIQUEIRA *et al*, 2023, não publicado). Os fungos foram mantidos em placa de Petri contendo o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

2.4. Avaliação da capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em sintetizar ácido indolacético (AIA)

Um total de 80 isolados de *Trichoderma* spp., com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), foram avaliados quanto à capacidade de sintetizar *in vitro* AIA pelo método quantitativo colorimétrico (GORDON; WEBER, 1951). Para avaliação da produção de AIA, os isolados de *Trichoderma* spp. foram previamente cultivados em meio de cultura BDA, onde discos ($\varnothing = 6,0$ mm) da cultura monospórica foram transferidos para placas de Petri. As placas foram incubadas a 25°C em B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand), com fotoperíodo de 12h, por 7 dias. A partir destas colônias foram retirados discos ($\varnothing = 6,0$ mm) contendo micélio do fungo e repicados em paratubos falcon de 50 mL contendo 25 mL de meio Batata-Dextrose (BD) na presença de 100 mg L⁻¹ de triptofano.

Após seis dias de crescimento sob um agitador rotatório (130 rpm) a 26 ± 2 °C, a massa fúngica foi separada por centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Para a análise colorimétrica de AIA foram utilizados uma parte do reagente de Salkowski [FeCl₃ 0,5 mol L⁻¹ + HClO₄ (35%)] e duas partes do sobrenadante obtido de cada isolado.

Foi realizada a comprovação qualitativa da presença de AIA e a quantificação do fitormônio. Para tanto, após 30 minutos de reação à temperatura de 28 °C no escuro, foi observado uma coloração rosa e posteriormente a quantificação foi realizada em espectrofotômetro em 530 nm. As concentrações, em µg mL⁻¹ foram calculadas a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas da forma sintética do hormônio (0 a 100 µg mL⁻¹), cujas leituras foram a base para calcular a concentração de AIA nas amostras.

2.5. Avaliação dos efeitos de isolados selecionados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento e sobre aspectos bioquímicos de mudas de pimenteira-do-reino

Os isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram melhores resultados para produção de AIA foram submetidos ao ensaio *in vivo* para avaliação de eficiência sobre o crescimento e sobre aspectos bioquímicos de mudas de pimenteira-do-reino. O experimento foi conduzido em Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com 12 tratamentos, sendo 11 isolados de *Trichoderma* spp. (T3, T5, T7, T8, T13, T15, T21, T42, T45, T56, T63) mais o tratamento controle (T0), com 5 blocos/repetições totalizando 60 parcelas.

As mudas de pimenteira-do-reino foram acondicionadas em casa de vegetação, padronizadas com três folhas e inoculadas com os isolados selecionados. Para a inoculação, as mudas de pimenteira-do-reino foram lavadas em água limpa corrente e suas raízes podadas com tesoura e inoculadas, por tratamento, através de imersão em suspensão de esporos dos isolados (após sete dias de crescimento em BDA) em água destilada e autoclavada por duas vezes a 1×10^7 conídios mL^{-1} por 30 minutos em temperatura ambiente (500 ml de suspensão para cada tratamento). Plantas do tratamento controle foram imersas em água destilada estéril. Em seguida, as mudas foram plantadas em vasos com três kg de capacidade, contendo fibra de coco estéril e 100 mL de suspensão de esporo de cada isolado, na mesma concentração anterior, foram adicionados no substrato de seus respectivos tratamentos. Durante a condução do experimento, as plantas foram irrigadas quinzenalmente com 100 mL de solução nutritiva do meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962).

2.5.1. Avaliações Biométricas

Foram realizadas duas avaliações, uma no dia do transplantio e outra aos 60 dias após o transplantio. Os parâmetros avaliados, em ordem de avaliação, para compor o resultado do experimento, foram: altura da planta (ALP cm); número de folhas (NF); número de entrenós (NEN); diâmetro do caule (DC cm); comprimento da raiz (CR mm); massa seca da parte aérea - caule e folhas (MSPA g) e massa seca da raiz (MSR g). Para as variáveis ALP e DC, os dados considerados como resultado foi a diferença entre as duas avaliações.

Para separar a parte aérea da parte radicular cortou-se o caule das plantas, deixando dois cm visíveis e palpáveis acima do solo para auxiliar na posterior remoção das raízes. Para remoção das raízes, o solo foi transferido para um vaso com maior amplitude visando facilitar o destorroamento conferindo uma remoção com perdas irrisórias. Após o destorroamento, as raízes foram lavadas em peneiras granulométricas com o intuito de remover o restante de solo ainda aderido as raízes.

O parâmetro ALP (cm) foi medido com auxílio de uma régua métrica considerando a distância do solo ao ápice da planta. Para avaliar o NF (und) e o NEN (und), todas as folhas, exceto as três folhas iniciais, e os entrenós foram contabilizadas. O DC (mm) foi medido com auxílio de um paquímetro digital, considerando o segmento entre o primeiro e segundo entre nó acima do solo. Para determinar a MFPA (g) foi realizada a pesagem da parte área fresca da planta em balança de precisão. O CR (mm) foi avaliado medindo todo o comprimento da raiz com auxílio de um paquímetro digital. Todas as raízes foram destacadas do caule para determinação da MFR (g) por meio de pesagem em balança de precisão.

Após essa etapa, a parte aérea da planta (acima do solo) e as raízes destacadas foram colocadas separadamente em sacos de papel kraft identificados e acondicionados em estufa de circulação forçada a 60°C até atingirem massa seca constante (72 horas) para posteriormente obter os resultados da massa seca da parte aérea (MSPA) (g) e massa seca da raiz MSR (g) por meio de pesagem em balança de precisão.

2.5.2. Avaliações Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores da Amazônia (EBPS) da UFRA. Foram determinados tanto da parte aérea quanto das raízes por análises colorimétricas a concentração de: Atividade da Enzima Redutase do Nitrato (RNO^{3-}) (HAGEMAN; HUCKLESBY, 1971); Amônio Livre (NH^{4+}) (WEATHERBURN, 1967); Aminoácidos Solúveis Totais (PEOPLES *et al.*, 1989); Carboidratos Solúveis Totais (DUBOIS *et al.*, 1956) e Sacarose (VAN HANDEL, 1968).

2.6. Análises dos dados

Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade. Para os dados que não seguiram uma distribuição normal foi realizado teste estatístico não-paramétrico. Assim, para verificar as evidências de diferenças estatísticas dos efeitos dos tratamentos sobre os isolados foi executado o Teste de Friedman, em que se consideraram os blocos do experimento, e o Teste Wilcoxon para a análise de comparações múltiplas entre as medianas dos tratamentos a 5% de probabilidade (DICKHAUS, 2018). As análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no ambiente R (R CORE TEAM, 2021), utilizando-se os pacotes rstatix (KASSAMBARA, 2021), PMCMRplus (POHLERT, 2022) e reshape (WICKHAM, 2007).

3. RESULTADOS

3.1. Capacidade dos isolados de *Trichoderma* spp. em sintetizar ácido indol-acético (AIA)

Todos os isolados de *Trichoderma* utilizados no presente experimento apresentaram capacidade de sintetizar ácido indol acético (AIA) nos meios de cultura BD suplementado com L-triptofano (**Tabela 1**). Os isolados enquadrados no mesmo grupo não diferem significativamente entre si. Os isolados do grupo 1 (T53, T38, T41, T37, T68, T34, T09, T52, T59, T33, T18, T51, T44, T19, T65) apresentaram níveis muito baixos de produção de AIA e não diferiram significativamente do tratamento controle. Por outro lado, observou-se diferença significativa em relação à média de produção de AIA pelos isolados de *Trichoderma* dos demais grupos (grupo 2 ao grupo 13) em relação ao grupo 1. O aumento na produção de AIA foi verificado na ordem crescente dos grupos, onde observou-se médias superiores a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do hormônio produzidos pelos isolados de *Trichoderma* dos grupos 10,11,12 e 13. O isolado T03 apresentou produção de AIA com uma média de $24,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (**Tabela 1**).

Tabela 1. Produção de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por *Trichoderma* spp. em meio BD na presença de L-triptofano¹

Grupos	Código dos Isolados	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	CONTROLE, T53, T38,T41,T37,T68, T34,T09,T52,T59,T33,T18,T51,T44,T19,T65	0, 878567 - 1,318000 a
2	T39, T32,T36,T02,T40,T12,T23	1,450567 - 1,647300 b
3	T47,T05,T62,T27,T71,T26,T01,T57,T25,T67, T73,T06,T74,T70,T20,T75,T64,T77,T16, T30,T78,T31,T79,T29	1,782000 - 2,354700 c
4	T69,T14,T60,T72,T11,T43,T10,T46,T13	2,464800 - 2,795233 d
5	T50,T80,T61,T66,T54,T24,T22,T58,T35,T45, T17,T49	2, 927400 - 3,708733 e
6	T76,T48,T04,T56	4,129233 - 4,704700 f
7	T42	5,877667 g
8	T08	7,692000 h
9	T28,T63	9,501967- 9,725433 i
10	T55,T07	10,800667- 10,868867 j
11	T15	12,868233 k
12	T21	18,503067 l

Continua.

13	T03	24,387933	m
C.V% ² = 9,63			

¹Médias do mesmo grupo, na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Médias com diferentes letras na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% probabilidade. ²Coeficiente de Variação.

3.2. Efeitos de isolados selecionados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento e sobre respostas bioquímicas de mudas de pimenteira-do-reino

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 2**, todos os parâmetros biométricos apresentaram diferença significativa, em pelo menos um tratamento, quando comparado com o tratamento controle (sem *Trichoderma* spp.), promovendo crescimento nas mudas de pimenteira-do-reino (**Figura 1**).

Para o número de folha (NF), os isolados de *Trichoderma* spp. do tratamento T5 e T8, apresentaram maiores médias (9 unidades, cada isolado/tratamento) e diferiram significativamente do tratamento controle (T0) que apresentou média = 5 unidades, apresentando incremento de 44,45%. Resultados semelhantes foram revelados para o número de entrenós (NEN), onde plantas inoculadas com o isolado do tratamento T5 foi significativamente maior em 50% em relação a não inoculada com *Trichoderma* (T0). Analisando o efeito dos isolados de *Trichoderma* spp. na altura da planta (ALP), os resultados revelam que houve efeito positivo nos tratamentos T21, T42 e T15, o qual promoveu um aumento na altura das mudas de pimenteira-do-reino de 64,6%, 63,8% e 62,8% em relação ao tratamento controle (T0), respectivamente. Para o parâmetro comprimento de raiz (COMPR), os resultados mostram maior comprimento de raiz nos tratamentos T21 (19,9 cm), T15 (18,5 cm), T7 (18,5 cm), T8 (18,3 cm), T05 (18,0 cm), T42 (17,6 cm), T63 (17,3 cm) e T03 (16,6 cm), os quais não diferiram entre si, mas suas médias de crescimento foram significativamente maiores quando comparadas com a média do tratamento sem inoculação do fungo (12,1 cm). Analisando o diâmetro do colo (DC) foi observado mudanças significativas no crescimento, em diâmetro, da haste central das mudas em sete tratamentos, com melhor resposta no T21 (1,4 cm) que apresentou um incremento de (71,43%) em relação ao tratamento controle (0,4 cm) (**Tabela 2**).

A **Tabela 3** mostra diferença estatística com aumento de massa fresca da parte aérea (MFPA) nos tratamentos T42, T08, T21, T05 e T15 em relação ao tratamento controle, porém, não houve diferença estatística positiva para massa seca da parte aérea (MSPA). Os melhores resultados para massa fresca da raiz (MFR) foi observado nos tratamentos T21 e T03 que não diferiram estatisticamente entre si. A massa seca da raiz (MSR) apresentou um aumento de 64,4% no tratamento T21 em relação ao tratamento controle.

Tabela 2. Efeito dos isolados nativos de *Trichoderma* spp. no número de folha (NF), número de entrenós (NEN), altura da parte aérea (ALP), comprimento das raízes (COMPR) e diâmetro do coleto (DC) em mudas de pimenteira-do-reino após 60 dias de inoculação

Tratamentos	NF		Tratamentos	NEN	
T05	9	a ¹	T05	8	a ¹
T08	9	a	T21	7	b
T07	8	b	T08	6	b
T42	8	b	T42	6	c
T21	8	b	T07	6	c
T03	7	b	T03	5	c
T15	7	b	T15	5	c
T13	6	c	T13	5	c
T63	5	c	T63	5	d
T45	5	c	Controle	4	d
Controle	5	c	T45	4	d
T56	4	c	T56	4	d
CV (%) ² = 14,61			CV (%) ² = 16,52		
Tratamentos	ALP (cm)		Tratamentos	COMPR (cm)	
T21	29,4	a ¹	T21	19,9	a ¹
T42	28,8	a	T15	18,5	a
T15	28,0	a	T07	18,5	a
T08	18,2	b	T08	18,3	a
T03	18,2	b	T05	18,0	a
T05	17,8	b	T42	17,6	a
T07	16,8	b	T63	17,3	a
T63	15,0	b	T03	16,6	a
T45	14,2	b	T45	14,9	b
T56	11,8	c	T13	13,8	b
Controle	10,4	c	T56	12,9	b
T13	7,8	c	Controle	12,1	b
CV (%) ² = 23,11			CV (%) ² = 13,54		
Tratamentos	DC (cm)				
T21	1,4	a ¹			
T15	1,0	b			
T42	1,0	b			
T07	0,8	c			
T56	0,8	c			
T08	0,7	c			
T63	0,7	c			
T13	0,6	d			
T03	0,5	d			
T45	0,5	d			
T05	0,5	d			
Controle	0,4	d			
CV (%) ² = 14,21					

¹Médias com diferentes letras na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% probabilidade.

²Coeficiente de Variação.

Tabela 3. Efeito dos isolados nativos de *Trichoderma* spp. na massa fresca parte aérea (MFPA), massa seca parte aérea (MSPA), massa fresca raiz (MFR) e massa seca raiz (MSR) em mudas de pimenteira-do-reino após 60 dias de inoculação

Tratamentos MFPA (g)			Tratamentos MSPA (g)		
T42	32,3	a ¹	T08	3,5	a ¹
T08	30,2	a	T05	3,2	a
T21	30,1	a	T42	3,1	a
T05	29,3	a	T56	3,1	a
T15	27,9	a	T45	3,0	a
T07	24,4	b	T15	2,9	a
T03	24,0	b	T21	2,8	a
T63	23,9	b	T03	2,7	a
T45	23,1	b	T63	2,6	a
T56	21,8	b	T07	2,6	a
Controle	20,8	b	Controle	2,4	a
T13	14,1	c	T13	1,2	b
CV (%) ² = 17,54			CV (%) ² = 24,45		
Tratamentos MFR (g)			Tratamentos MSR (g)		
T21	8,7	a ¹	T21	0,59	a ¹
T03	7,6	a	T63	0,34	b
T05	6,8	b	T15	0,32	b
T08	6,7	b	T13	0,32	b
T07	6,4	b	T56	0,31	b
T15	6,3	b	T08	0,29	b
T42	5,6	c	T42	0,29	b
T63	5,2	c	T03	0,28	b
T56	4,7	c	T05	0,27	b
T45	4,5	c	T07	0,24	b
Controle	4,2	c	T45	0,23	b
T13	3,1	d	Controle	0,21	b
CV (%) ² = 16,65			CV (%) ² = 24,19		

¹ Médias com diferentes letras na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% probabilidade.

²Coeficiente de Variação.

Quanto às respostas bioquímicas (**Tabela 4**), a atividade da redutase do nitrato (RN) foi afetada significativamente pela inoculação de *Trichoderma* spp., tanto nas raízes (RNR) quanto nas folhas (RNF). Nas folhas, o menor valor (0,09 µmol NO-2 g-1 MF h) ocorreu com a inoculação do isolado T5, representando redução de 92% em comparação ao tratamento controle (1,15 µmol NO-2 g-1 MF h). Nas raízes, a redução atingiu o valor de 0,04 µmol NO-2 g-1 MF h nos tratamentos T5, T21 e T42 correspondendo decréscimo de 76% comparativamente ao tratamento controle (0,17 µmol NO-2 g-1 MF h-1).

A inoculação com isolados de *Trichoderma* spp. aumentou significativamente o amônio livre (AM) apenas nas folhas (AMF) e não evidenciou mudanças significativas nas raízes (AMR) (**Tabela 4**). Nas folhas, os tratamentos T5 (60,29 mmol de NH₄⁺ kg-1 de MS), T21 (61,74 mmol de NH₄⁺ kg-1 de MS) e T63 (62,7 mmol de NH₄⁺ kg-1 de MS) diferiram

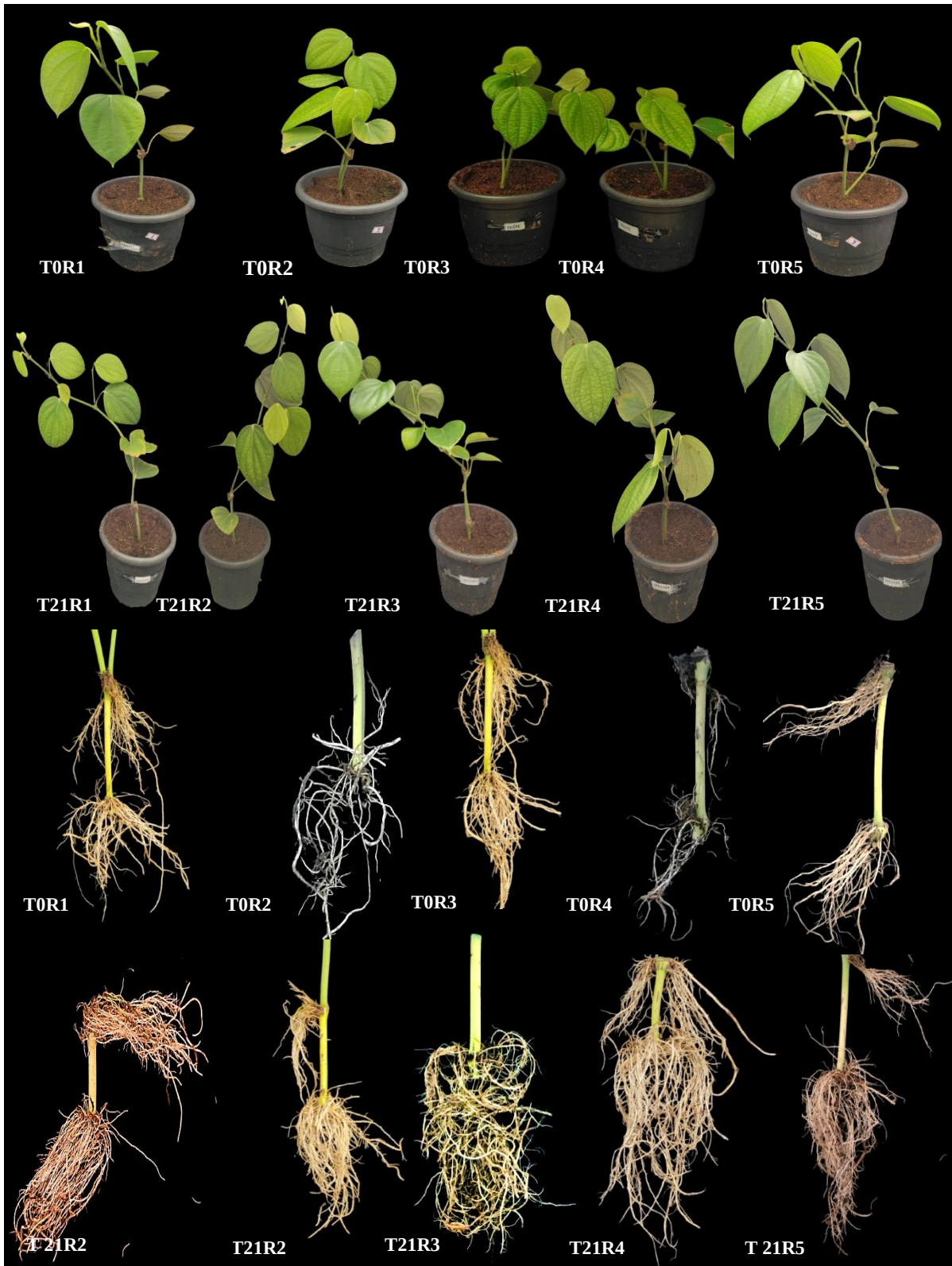
significativamente da testemunha apresentando um aumento na concentração da amônia de 85,69%, 86,03% e 86,24%, respectivamente em relação ao tratamento controle T0 (8,63 NH₄⁺ kg⁻¹ de MS).

A concentração de aminoácidos solúveis totais nas folhas apresentou um aumento significativo apenas no tratamento T56 (114,49 μmol de AA g⁻¹ de MS) em relação ao tratamento controle (21,71 μmol de AA g⁻¹ de MS) (**Tabela 4**). As concentrações de aminoácidos solúveis totais nas raízes (ASTR) das plantas inoculadas com *Trichoderma* spp. não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas a concentração do tratamento controle.

As concentrações de carboidratos solúveis totais nas plantas tratadas com *Trichoderma* spp. não apresentaram diferenças estatísticas nas folhas (CSTF). Nas raízes (CSTR) ocorreu uma diminuição na concentração de carboidratos com diferenças estatística no tratamento T56 (0,18 mmol Glu g⁻¹) comparado ao tratamento controle (0,42 mmol Glu g⁻¹) (**Tabela 4**).

As concentrações de sacarose nas plantas inoculadas com *Trichoderma* spp. aumentaram tanto nas raízes quanto nas folhas (**Tabela 4**). Nas folhas (SACF), esse aumento não foi estatisticamente significativo em relação ao tratamento sem inoculação de *Trichoderma* spp. Nas raízes (SACR), os valores apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento controle nos tratamentos T56 (230,33 mg sacarose g⁻¹ de MS), maior concentração observada representando 61,89% de aumento, e nos tratamentos T03 (1,57,3 mg sacarose g⁻¹ de MS), T08 (151,68 mg sacarose g⁻¹ de MS), T15 (148,87 mg sacarose g⁻¹ de MS) e T21 (152,52 mg sacarose g⁻¹ de MS).

Figura 1: Efeito do tratamento com isolado de *Trichoderma* spp. (T21) no crescimento de mudas, parte aérea e raiz, de pimenteira-do-reino



T0: tratamento controle que não recebeu nenhum isolado de *Trichoderma* spp.; T21: inoculação com *Trichoderma* spp. T21; R: repetições dos tratamentos.

Tabela 4: Respostas bioquímicas em mudas de pimenteira-do-reino após 60 dias de inoculação com isolados nativos de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	T0	T3	T5	T7	T8	T13	T15	T21	T42	T45	T56	T63
RNF¹ (μmol NO⁻² g⁻¹ MF h)												
Mediana	1,15 a*	0,16 bc	0,09 b	0,89 a	0,58 ac	0,56 abc	0,56 abc	0,16 bc	0,32 abc	0,5 abc	0,49 abc	0,11 bc
RNR² (μmol NO⁻² g⁻¹ MF h)												
Mediana	0,17 ab*	0,07 abc	0,04 c	0,18 b	0,08 abc	0,1 abc	0,05 abc	0,04 c	0,04 c	0,05 abc	0,07 abc	0,05 abc
AMF³ (mmol NH⁴⁺ kg⁻¹ de MS)												
Mediana	8,63 a*	35,71 abc	60,29 c	31,65 abc	10,78 a	15,01 ab	18,72 abc	61,74 bc	38,21 abc	32,6 abc	23,37 abc	62,7 bc
AMR⁴ (mmol NH⁴⁺ kg⁻¹ de MS)												
Mediana	8,97 ab*	2,42 a	3,19 a	2,67 a	3,11 a	5,61 ab	3,97 a	3,54 a	16,64 b	2,59 ab	5,26 ab	10,7 ab
ASTF⁵ (μmol de AA g⁻¹ de MS)												
Mediana	21,71 abc*	48,56 cd	35,53 abcd	45,4 bcd	25,27 abcd	15 a	14,21 ab	22,5 abcd	27,24 abcd	24,48 abcd	114,49 d	30,01 abcd
ASTR⁶ (μmol de AA g⁻¹ de MS)												
Mediana	7,5 abc*	8,29 abc	4,74 ac	9,08 abc	6,71 abc	16,19 ab	1,58 c	12,63 abc	15,92 ab	5,53 ac	35,14 b	5,13 ac

Continua.

Continua.

Tratamentos	T0	T3	T5	T7	T8	T13	T15	T21	T42	T45	T56	T63
CSTF⁷ (mmol Glu g⁻¹ de MS)												
Mediana	1,24 ab [*]	0,64 a	0,83 ab	0,87 ab	0,93 ab	0,7 a	1,49 b	0,84 ab	0,89 ab	0,67 a	0,83 ab	0,7 ab
CSTR⁸ (mmol Glu g⁻¹ de MS)												
Mediana	0,42 a [*]	0,21 ab	0,22 ab	0,27 ab	0,3 ab	0,21 ab	0,23 ab	0,32 ab	0,32 ab	0,24 ab	0,18 b	0,3 ab
SACF⁹ (mg sacarose g⁻¹ de MS)												
Mediana	207,86 a [*]	294,93 a	455,04 a	255,61 a	266,84 a	233,14 a	275,27 a	241,56 a	171,34 a	233,14 a	483,12 a	317,4 a
SACR¹⁰ (mg sacarose g⁻¹ de MS)												
Mediana	87,08 c [*]	157,3 b	88,37 c	87,88 c	151,68 b	115,16 c	148,87 b	152,52 b	103,93 c	115,16 c	230,33 a	137,63 c

¹ concentração da redutase do nitrato na folha, ² concentração da redutase do nitrato na raiz, ³ concentração de amônio na folha, ⁴ concentração de amônio na raiz, ⁵ concentração de aminoácidos solúveis totais na folha, ⁶ concentração de aminoácidos solúveis totais na raiz, ⁷ concentração de carboidratos solúveis totais na folha, ⁸ concentração de carboidratos solúveis totais na raiz, ⁹ concentração de sacarose na folha, ¹⁰ concentração de sacarose raiz. * Letras iguais indicam que não existe diferença significativa entre os tratamentos pelo Teste de Wilcoxon, a 5% de probabilidade. Medianas em negrito: Tratamentos com diferença estatística significativa.

4. DISCUSSÃO

A seleção e aplicação de agentes promotores de crescimento vegetal para incrementar a biomassa das plantas, reduzir os custos de manejo e impulsionar a adoção de práticas agrícolas sustentáveis surge como uma das estratégias mais cruciais da atualidade (BARGAZ *et al.*, 2018; CHAGAS *et al.*, 2017; JASIM, *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2012; PASCUTTI; SILVESTRE; ORTIZ, 2024). Diversas espécies de *Trichoderma* spp. são reconhecidas por sua capacidade de promover o crescimento de plantas, levando a mudanças significativas no metabolismo vegetal (CHAGAS *et al.*, 2017; GONZÁLEZ; FUENTES, 2017; QUEIROZ; OLIVEIRA, 2023; TYŚKIEWICZ *et al.* 2022). Apesar do elevado número de trabalhos avaliando o fungo *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de plantas, o efeito de isolados endofíticos e provenientes da rizosfera de *Piper* spp., adaptados às condições edafoclimáticas na Amazônia Oriental, ainda não foi investigado. A hipótese do estudo é que os isolados de *Trichoderma* spp. promovem efeitos positivos no crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. Adicionalmente foi explorado o efeito dos isolados selecionados nas respostas bioquímicas das mudas de pimenteira-do-reino.

Afirmando as hipóteses levantadas, observamos em testes *in vitro* que 12 grupos de isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram concentrações de AIA significativamente maiores que a concentração da testemunha. Quando representantes desses grupos de isolados T03, T05, T07, T08, T13, T15, T21, T42, T45, T56, T63 foram avaliados *in vivo* alguns se destacaram positivamente e estatisticamente no crescimento das mudas de pimenteira-do-reino nos parâmetros de número de folha, número de entrenós, altura das mudas, comprimento da raiz, diâmetro do colo, massa fresca da parte aérea e massa fresca e seca da raiz. As respostas bioquímicas apresentadas sugerem um bom estado metabólico da planta na presença de *Trichoderma* spp.

A seleção dos isolados para o teste *in vivo* pode ser alicerçada pelos estudos que caracterizam a síntese de fitohormônios como o fator estimulante mais importante em quase todas as fases de crescimento das plantas (CAI *et al.*, 2016; JAROSZUK-ŚCISEL *et al.*, 2019). Várias espécies de *Trichoderma* produzem fitohormônios do grupo das auxinas, especialmente o ácido indol-acético - AIA geralmente na presença de seu precursor, o L- triptofano (NIETO-JACOBO *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2017; TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022).

Alguns isolados de *Trichoderma* spp. desafiaram as hipóteses propostas, demonstrando resultados que não diferiram estatisticamente do tratamento controle. Esse achado reafirma que a promoção de crescimento de plantas não é uma característica universal de todos os isolados de *Trichoderma* spp. Pesquisas anteriores sugerem que os mecanismos e moléculas envolvidos

na promoção do crescimento das plantas por *Trichoderma* spp. são multivariáveis e são afetados pelas condições ambientais (NIETO-JACOBO *et al.*, 2017). Logo, a capacidade de promover o crescimento depende de vários fatores, incluindo a existência de isolados da mesma espécie que podem ou não promover o crescimento das plantas, ou, por exemplo, a cultura e/ou variedade a que a espécie é aplicada (STEWART; HILL, 2013; SÁNCHEZ-MONTESINOS *et al.*, 2020).

Quanto aos incrementos positivos no crescimento das mudas de pimenteira-do-reino apresentados por alguns tratamentos é possível especular que estejam relacionados à produção de hormônios, metabólitos secundários e maior eficiência no uso de alguns nutrientes (ESTRADA-RIVERA *et al.*, 2019; TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022). Pesquisas afirmam que numerosas espécies de *Trichoderma* spp. podem colonizar as raízes das plantas culminando em característica vantajosa para as plantas. Para garantir a característica de bom colonizador, o fungo presumivelmente desenvolveu estratégias eficazes de superar os mecanismos de defesa das plantas (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2016; NOGUEIRA-LOPEZ *et al.*, 2018).

Estudos anteriores alegam que o AIA sintetizado pelos microrganismos associados à raiz de plantas pode interferir no desenvolvimento vegetal, perturbando o equilíbrio da auxina nas plantas estimulando o alongamento radicular e formação de raízes laterais. Assim, a síntese de AIA pelos isolados pode ter modificado a arquitetura radicular, resultando em aumento da massa radicular e, conseqüentemente, uma área aumentada adequada para colonização microbiana e um sistema radicular maior para absorção de nutrientes pela planta (BADER *et al.*, 2020; CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009; JAROSZUK-ŚCISEL *et al.*, 2019; NIETO-JACOBO *et al.*, 2017). Contreras-Cornejo *et al.* (2009) sugeriram que *T. virens* e *T. atrovirida* sintetizam AIA que aumentam as raízes laterais em plantas de *Arabidopsis*. Gravel *et al.* (2007) apontam que *T. atrovirida* produziu AIA em condições *in vitro* após a adição de L-triptofano, sugerindo um possível mecanismo para aumentar o peso fresco dos brotos e raízes de tomate. Outros autores estudando plantas de tomate inoculadas com isolados de *Trichoderma* spp. produtores de AIA observaram um aumento do teor de clorofila, do comprimento da parte aérea, do peso fresco e seco da parte aérea e das raízes da planta (BADER *et al.*, 2020).

Outra hipótese é a atuação de compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *Trichoderma* spp. (GUO *et al.*, 2019; KADDES *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2021, 2022). Essas moléculas são conhecidamente importantes na promoção do crescimento de plantas, pois costumam servir como mediadores na interação entre organismos e plantas atuando na alteração de expressão de proteínas e atividades de enzimas específicas (NIETO-JACOBO *et al.*, 2017). Com base no conhecimento molecular do genoma de diversas espécies de *Trichoderma*,

1 pesquisas sugerem que o gênero possui uma abundância de genes responsáveis pela codificação
2 de enzimas relacionadas à produção de metabólitos secundários (LEE *et al.*, 2016;
3 MUKHERJEE *et al.*, 2012; SILVIA *et al.*, 2021, 2022; ZHI-LIN *et al.*, 2012). Lee *et al.* (2016)
4 descobriram que a exposição de *Arabidopsis thaliana* a COVs derivados de *Trichoderma*
5 resultou em aumentos de 31 a 56% na biomassa vegetal e de 82 a 89% no teor de clorofila, em
6 comparação com as plantas não expostas aos COVs de *Trichoderma*. Além disso, os
7 pesquisadores observaram que essas alterações, mediadas pelos COVs, são específicas de
8 espécie e dependentes da linhagem de *Trichoderma* utilizada. Outro estudo envolvendo COVs
9 de *Trichoderma* spp. sob o desenvolvimento de *A. thaliana* evidenciou que a presença de COVs
10 de *Trichoderma* induziu o crescimento das plantas, resultando em maior área foliar, mais raízes
11 laterais e plantas com tonalidade verde mais escuro (JALALI *et al.*, 2017).

12 Essas alegações corroboram com as respostas positivas de alguns isolados de
13 *Trichoderma* spp. do presente trabalho quando estas características de promoção de crescimento
14 podem ser observadas no aumento da biomassa das mudas de pimenteira-do-reino em relação
15 ao tratamento testemunha sem inoculação (**Tabela 2, Tabela 3**). Outros estudos demonstraram
16 o efeito de isolados de *Trichoderma* spp. na biomassa vegetal com resultados reportados, dentre
17 outras culturas, para alface (OZDEMIR *et al.*, 2016; SILVIA *et al.*, 2021; WONGLOM; ITO;
18 SUNPAPAO, 2022), arroz (SOUSA *et al.*, 2018), feijão (CHAGAS *et al.*, 2016), milho
19 (ZHANG *et al.*, 2020), pimenta (SÁNCHEZ-MONTESINOS *et al.*, 2020; YADAV *et al.*,
20 2023), soja (CHAGAS JÚNIOR *et al.*, 2021, 2022), tomate (SÁNCHEZ-MONTESINOS *et al.*,
21 2020) onde houve o efeito positivo da inoculação de *Trichoderma* spp.

22 O nitrogênio (N) é fundamental para as plantas, pois é um componente essencial de
23 muitas biomoléculas, como clorofila, aminoácidos e diversas enzimas. Em muitos sistemas de
24 produção, a disponibilidade de nitrogênio é frequentemente um fator limitante, exercendo maior
25 influência sobre o crescimento das plantas do que qualquer outro nutriente (LEGHARI *et al.*,
26 2016). Como resposta a essa questão, muitas espécies de plantas evoluíram desenvolvendo
27 relações simbióticas mutuamente benéficas com microrganismos presentes no solo, que
28 garantem a entrada de nitrogênio para a planta (COURTY *et al.*, 2015).

29 Na tentativa de entender o comportamento bioquímico das mudas de pimenteira-do-
30 reino em resposta a inoculação com isolados de *Trichoderma* spp. avaliações bioquímicas
31 foram realizadas e os resultados apontaram alterações em algumas atividades relacionadas ao
32 metabolismo do nitrogênio. Estudos sobre o papel do *Trichoderma* na assimilação simbiótica
33 de nitrogênio, como um dos principais componentes de respostas positivas no crescimento
34 vegetal, ainda são escassos, mas foi relatado que *T. harzianum* favoreceu a absorção de

1 nitrogênio em ensaios de campo com milho (HARMAN, 2000).

2 Os resultados do presente estudo mostraram uma redução quantitativa nas
3 concentrações da redutase do nitrato (RN) nas folhas e raízes, porém, evidenciou um aumento
4 nas concentrações de amônio (AM) da parte aérea. A RN foi considerada a enzima chave na
5 regulação do metabolismo de Nitrogênio (N) na década de 70 (BEEVERS; HAGEMAN, 1969),
6 em razão que o nitrato absorvido pelas raízes deve ser reduzido a amônio antes de ser
7 incorporado em compostos orgânicos, seja no sistema radicular ou na parte aérea.
8 Posteriormente, trabalhos não evidenciaram aumento de crescimento e produtividade de plantas
9 com aumentos na atividade da RN (FAKOREDE; MOCK, 1978; EICHELBERG *et al.*, 1989).
10 Com isso, concluíram que a atividade da RN não era um critério indicativo de alta eficiência na
11 assimilação do N (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

12 Quanto ao AM, uma hipótese é o favorecimento no suprimento de AM pela manipulação
13 dos genes transportadores de AM, relacionado ao metabolismo do nitrogênio, por alguns
14 isolados de *Trichoderma* spp. melhorando a absorção e a metabolização do N no interior da
15 planta, assim como as taxas fotossintéticas (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2016). O AM precisa ser
16 totalmente metabolizado, pois sua acumulação na planta pode ser tóxica. Depois que o AM é
17 metabolizado nas raízes, os aminoácidos resultantes são transportados para as folhas. Nas
18 folhas, ocorre um processo de desaminação dos aminoácidos, liberando amônio (TAIZ;
19 ZEIGER, 2013). Esse fenômeno ajuda a explicar a alocação de AM nas folhas das mudas de
20 pimenteira-do-reino.

21 Provavelmente, devido a fase de pleno desenvolvimento das mudas foi utilizada a
22 maioria dos aminoácidos, assim como os carboidratos, para a síntese de clorofila, rubisco e
23 outras proteínas e, com isso, ocorreu um baixo nível de aminoácidos e carboidratos, assim, não
24 teve diferença estatística na maioria dos tratamentos. Consequentemente, ocorreu um aumento
25 nas concentrações de sacarose (BADR *et al.*, 2015; BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

26 Uma explicação para o aumento da concentração de sacarose nas raízes das mudas de
27 pimenteira-do-reino, seria a interferência de alguns isolados de *Trichoderma* spp. na síntese e
28 translocação desse composto, assim como a maior demanda de energia para o desenvolvimento
29 radicular. Em um estudo realizado por Lemes *et al.* (2016), foi observado que o crescimento
30 inicial *in vitro* de *Miltonia flavesceus* foi significativamente maior quando cultivada em meio
31 suplementado com sacarose. Além de promover o crescimento, a sacarose também pode
32 desempenhar um papel no ajuste osmótico, contribuindo para a regulação do fluxo interno de
33 água na planta e mantendo o potencial hídrico em níveis adequados (LEMES *et al.*, 2016).
34 Assim, altas concentrações de sacarose sugerem um bom estado metabólico regulador das

1 mudas de pimenteira-do-reino na presença de *Trichoderma* spp.

2 Embora seja desafiador alcançar grandes reduções no uso de fertilizantes químicos sem
3 comprometer a produção em muitos sistemas agrícolas, uma diminuição gradual acompanhada
4 pelo uso de bioestimulantes ou biofertilizantes pode ser uma ferramenta eficaz para otimizar o
5 uso de insumos químicos. Isso, por sua vez, pode ajudar a reduzir a poluição ambiental e a
6 contaminação de culturas alimentares (BARGAZ *et al*, 2018; PASCUTTI; SILVESTRE;
7 ORTIZ, 2024; SÁNCHEZ-MONTESINOS *et al.*, 2020).

8 Em conclusão, avaliando os resultados do presente estudo, o isolado T21, proveniente
9 de áreas com *P. nigrum* na Amazônia Oriental, foi selecionado como o mais eficiente nas
10 respostas de crescimento das mudas de pimenteira-do-reino, podendo ser um possível promotor
11 de crescimento para a cultura apresentando propriedades importantes como produção de
12 fitormônios, possível produção de compostos orgânicos voláteis e atuação no metabolismo de
13 assimilação de nitrogênio. As evidências fornecidas nesse estudo apoiam fortemente a
14 possibilidade de usar *Trichoderma* spp. como promotor de crescimento seguro, ecologicamente
15 correto e eficaz para a cultura da pimenteira-do-reino. Estudos futuros podem ser realizados
16 objetivando avaliar o efeito dos isolados no campo, abrangendo outras fases de desenvolvimento
17 da cultura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F. C. *et al.* **Cultura da pimenta do reino na região amazônica**. Belém, PA: IPEAN, 1971. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/387134>. Acesso em: 19 de fev. 2022.
- BADER, A. N. *et al.* Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Journal of King Saud University – Science**. v. 32, p.867-873, 2020.
- BADR, A. *et al.* Comprehensive analysis of in vitro to ex vitro transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v.122, p.491-508, 2015. DOI 10.1007/s11240-015-0786-3.
- BARGAZ, A. *et al.* Soil Microbial Resources for Improving Fertilizers Efficiency in an Integrated Plant Nutrient Management System. **Front. Microbiol.** v.9., 2018. DOI 10.3389/fmicb.2018.01606.
- BARROSO, D. G. *et al.* Qualidade de mudas de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. urophylla* produzidas em tubetes e em blocos prensados, com diferentes substratos. **Floresta e Ambiente**. v.7, p. 238-250, 2000.
- BEEVERS, L., HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.20, p.495-522, 1969.
- BREDEMEIER, C. MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Cienc. Rural**. v 30, n.2, 2000. DOI 10.1590/S0103-84782000000200029.
- CAI, W.-J.; *et al.* A rapid approach to investigate spatiotemporal distribution of phytohormones in rice. **Plant Methods**. v.12, 47, 2016. DOI 10.1186/s13007-016-0147-1.
- CARNEIRO JÚNIOR, J. F. C. *et al.* Análise de mercado da pimenta-do-reino no período 1990 a 2015. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. v. 11, n. 6, p. 116-145, 2017.
- CHAGAS JÚNIOR, A. F. *et al.* Eficiência de *Trichoplus* (*Trichoderma asperellum*) como promotor de crescimento vegetal em soja em campo no cerrado. **Research, Society and Development**. v. 11, 2022. DOI 10.33448/rsd-v11i5.27970.
- CHAGAS JÚNIOR, A. F. *et al.* Soybean productivity with *Trichoderma asperellum* seed treatment in different regions of the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.16, 2021. DOI 10.5039/agraria.v16i4a1171.
- CHAGAS, L. F. B. *et al.* Efficiency of *Trichoderma* spp. as a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo-SP, v. 38, n. 4, p. 1-11, 2016.
- CHAGAS, L. F. B. *et al.* *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A., *et al.* *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. **Plant Phys.** v.149, p. 1579-1592, 2009.
- CONTRERAS-CORNEJO, X. A. *et al.* Funções ecológicas de *Trichoderma* spp. e seus metabólitos secundários na rizosfera: Interações com plantas. **Microbiol. Ecol.** v. 92, p.1-17, 2016.
- COSTA, Y. K. S. *et al.* Cultivo de pimenta-do-reino. **Revista Agronomia Brasileira**. v. 4, 2020.
- COURTY, P. E. *et al.* A absorção e o transporte de nitrogênio inorgânico nas interações e o micróbio-raiz da planta beneficiável. **Crit. Rev. Planta Sci.** v.34, p.4–16. DOI 10.1080/07352689.2014.897897.
- DICKHAUS, T. **Theory of Nonparametric Tests**. 1. ed. Springer Nature Switzerland AG: Springer Cham, 2018.

DOMÍNGUEZ *et al.* Nitrogen Metabolism and Growth Enhancement in Tomato Plants Challenged with *Trichoderma harzianum* Expressing the *Aspergillus nidulans* Acetamidase amdS Gene. **Front. Microbiol.** v.7, 2016. DOI 10.3389/fmicb.2016.01182.

DUARTE, M. L. R. **Doenças de plantas no Trópico Úmido brasileiro I.** Plantas industriais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p.296, 1999.

DUARTE, M. L. R. *et al.* **A Cultura da Pimenta-do-Reino.** – 2. ed. rev. amp. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 73 p. (Coleção Plantar, 55). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/392085/a-cultura-da-pimenta-do-reino>. Acesso em: 20 de fev. 2022.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem** v.28, p.350-356, 1956. DOI 10.1021/ac60111a017.

EICHELBURG, K. D. *et al.* Divergent phenotypic recurrent selection for nitrate reductase in maize. I. Selection and correlated responses. **Crop Science**, Madison, v.29, p.1393-1397, 1989.

ESTRADA-RIVERA M. *et al.* *Trichoderma* Histone Deacetylase HDA-2 modulates multiple responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v.179, p.1343-1361, 2019. DOI 10.1104/pp.18.01092.

FAKOREDE, M.A.B., MOCK, J.J. Nitrate-reductase activity and grain yield of maize cultivar hybrids. **Crop Science**, Madison, v.18, p.680-682, 1978.

FAO. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.** FAOSTAT. Data. Production. Crops. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso em: 12 jun. 2022.

GOMES FILHO, J. **Manejo da fusariose em pimenta-do-reino cv. Bragantina.** 2017. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2017.

GONZÁLEZ F. H; FUENTES, M. N. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. **Revista de Ciências Agrícolas.** v. 34, p.17-31, 2017. DOI 10.22267/rcia.173401.61.

GORDON, S.A.; WEBER, P.R. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**. v.26, p.192-195, 1951.

GRAVEL, V. *et al.* Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biol. Biochem.** v.39, p. 1968-1977, 2007.

GUO, Y. *et al.* *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. **Frontiers in Microbiology**. v.10, p.1-15, 2019. DOI 10.3389/fmicb.2019.00891.

HAGEMAN, R.H.G; HUCKLESBY, D.P. Nitrate Reductase from Higher Plants. **Methods Enzimol** v.17, p.491-503, 1971. DOI 10.1016/S0076-6879(80)69026-0.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Dis.** v.84, p.377-393, 2000. DOI 10.1094/PDIS.2000.84.4.377.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal (PAM).** Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/pimenta-do-reino/br>. Acesso em: 21 out. 2023.

JACQUES, A. P. *et al.* Native isolates of *Trichoderma* spp. as a growth promoter in the initial phase of soybean culture. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.11, p. 108150-108166, 2021.

JALALI, F., *et al.* Volatile organic compounds of some *Trichoderma* spp. increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Fungal Ecology**. v.29, p.67-75, 2017.

JAROSZUK-ŚCISEL, J. *et al.* Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. **Int. J. Mol. Sci.** v.20, 4923, 2019. DOI 10.3390/ijms20194923.

- JASIM, B. *et al.* Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. **Plant Growth Regulation**. v. 71, p. 1–11, 2013.
- KADDES, A. *et al.* Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. **Molecules**. v.24, p.1-16, 2019. DOI10.3390%2Fmolecules24061065.
- KASSAMBARA, A. **rstatix: pipe-friendly framework for basic statistical tests**, 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=rstatix>>. Acesso em: 21 outubro. 2023.
- LEE, S. *et al.* Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. **Fungal Biology and Biotechnology**. v.3, p.1-14, 2016.
- LEGHARI, S. J. *et al.* Role of nitrogen for plant growth and development: A review. **Advances in Environmental Biology**, v. 10, n. 9, p. 209-219, 2016.
- LEMES, C.S. R. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavesce*ns. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.3, p.499-505, 2016.
- MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- MUKHERJEE, P. K. *et al.* Secondary metabolism in *Trichoderma* –a genomic perspective. **Microbiology**. v.158, p.35-45, 2012. DOI 10.1099/mic.0.053629-0.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, p. 473-497, 1962. DOI 10.1111/j.1399- 3054.1962.tb08052.x.
- NASCIMENTO, *et al.* *Trichoderma*: biological control efficiency and perspectives for the Brazilian Midwest states and Tocantins. **Brazilian Journal of Biology**. v. 82, 2022. DOI 0.1590/1519-6984.260161.
- NIETO-JACOBO, M. F *et al.* Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Front in Plant Science**.v.8, p.1-18, 2017. DOI 10.3389/fpls.2017.00102.
- NOGUEIRA-LOPEZ, G. *et al.* O secretoma apoplástico de *Trichoderma virens* durante a interação com as raízes do milho mostra uma inibição da defesa das plantas e despovoamento de proteínas secretadas de estresse oxidativo. **Plant Pathogen Interactions**. v. 9, 2018. DOI 10.3389/fpls.2018.00409.
- OLIVEIRA, M. L. B. *et al.* O gênero *Piper* no Brasil: o estado da arte da pesquisa. **Biodiversidade**. v.19, n 3, p. 198-210, 2020.
- OLIVEIRA, V. S. *et al.* Efeito da aplicação de ácido-indol-3-butírico no crescimento e qualidade de mudas de *Piper nigrum* L. cv. kottanadan propagadas vegetativamente. **Ifes Ciência**. v.6, n.2, p. 139-148, 2020. DOI 10.36524/ric.v6i2.393.
- OZDEMIR, Y. *et al.* Effects of selected bio-fungicide and fungicide treatments on shelf life and quality characteristics of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Food Quality**. v.39, p.25-53, 2016. DOI 10.1111/jfq.12174.
- PAES, R. L.; CRUZ, B. E. V. Situação geográfica da produção pimenta do reino no Brasil. **Revista Comunicação Universitária**, Belém, v.1, n.1, p. 1-14, 2022.
- PASCUTTI, M. C. D.; SILVESTRE, R. S. F.; ORTIZ, T.A. The role of microorganisms in sustainable agriculture: a review. **Esarrollo Local Sostenible**, Curitiba, v. 17, n.52, p.1-18, 2024. DOI 10.55905/rdelosv17.n52-001.
- PEOPLES, M. B. *et al.* Methods for Evaluating Nitrogen Fixation by Nodulated Legumes in the Field. **Australian Centre for International Agricultural Research**. v.1, p.1-76, 1989.
- POHLERT, T. **PMCMRplus: calculate pairwise multiple comparisons of mean rank sums extended**, 2022. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=PMCMRplus>>. Acesso em: 21 outubro. 2023.

QUEIROZ, A. T. S.; OLIVEIRA, B.C. Ação de microrganismos promotores do crescimento de plantas: uma revisão sistemática da literatura. **PsiPro Journal**. v.2, n.5, p.98-112, 2023.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, 2021. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 21 outubro. 2023.

SÁNCHEZ-MONTESINOS, B. *et al.* Role of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* as Plant-Growth Promoter in Horticulture. **Agronomy**. v.10, n.7, 2020. DOI 10.3390/agronomy10071004.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**. v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SECUDINO, W. **Propagação vegetativa da pimenteira-do-reino: avaliação de cultivares, níveis de AIB e substratos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2012.

SERRANO, L. A. L. *et al.* Produção de mudas de pimenteira-do-reino em substrato comercial fertilizado com adubo de liberação lenta. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 59, n.4, p. 512-517, 2012.

SHAH, M. M.; AFIYA, H. Introductory Chapter: Identification and Isolation of *Trichoderma* spp. Their Significance in Agriculture, Human Health, Industrial and Environmental Application. In: SHAH, M. M.; AFIYA, H.(ed.) **Trichoderma: The Most Widely Used Fungicide**. IntechOpen. 2019.12 p.

SILVA, A. P.; DOURADO, M. N. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas. **Iniciação Científica CESUMAR**. v. 24, n. 1, 2022. DOI 10.17765/2176-9192.2022v24n1e10776.

SILVA, G. B. P. *et al.* Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Rev. Caatinga**. Mossoró, v. 28, n. 4, p. 33 – 42, 2015. DOI 10.1590/1983-21252015v28n404rc.

SILVA, L. R. *et al.* *Trichoderma*: suas interações e uma abordagem metodológica aplicada ao estudo de compostos orgânicos voláteis para o mofo-branco e promoção de crescimento de plantas, **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 28, p. 163-183, 2022. DOI 10.31976/0104-038321v280007.

SILVA, L. R. *et al.* Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma azevedoi* promote the growth of lettuce plants and delay the symptoms of white mold. **Biological Control**.v.152, 2021. DOI 10.1016/j.biocontrol.2020.104447.

SINGH, S. *et al.* Importance of microorganisms in agriculture. **Climate and Environmental changes: Impact, Challenges and Solutions**. v.1, p. 93-117, 2017.

SOUSA, T. P. *et al.* Bioagents and silicon promoting fast early up-land rice growth. **Environmental Science and Pollution Research**. v.25, p.3657-3668, 2018. DOI 10.1007/s11356-017-0753-0.

SOUZA, P. E. A. *et al.* Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 47, p. 1589-1595, 2012. DOI 10.1590/S0100204X2012001100005.

STEWART, A.; HILL, R. Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. In: MUKHERJEE, P.K., HORWITZ, B.A. **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. Wallingford, CT, EUA, 2013; p. 415- 425.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. Ed., Trad. SANTARÉM, E. R. Porto Alegre: RS, Artmed, 2013. 953 p.

TYŚKIEWICZ, R. *et al.* *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. **Int. J. Mol. Sci**. v.23, n.4, 2022. DOI 10.3390/ijms23042329.

VAN HANDEL E. Direct Microdetermination of Sucrose. **Anal Biochem**. v.22, p.280-283, 1968. DOI 10.1016/0003-2697(68)90317-5.

VIDAL, M. F. **Evolução do cultivo de pimenta-do-reino na área de atuação do BNB**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 5, 2020. 7 p. (Caderno Setorial ETENE, 146).

WEATHERBURN, M.W. Phenol Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. **Anal Chem.** v. 39, p.971-974, 1967. DOI 10.1021/ac60252a045.

WICKHAM, H. Reshaping data with the reshape package. **Journal of Statistical Software.** v. 21, n. 12, p. 1–20, 2007.

WONGLOM, P.; ITO, S.; SUNPAPAO, A. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). **Fungal Ecology.** v. 43: p. 1-10, 2020. DOI 10.1016/j.funeco.2019.100867.

YADAV, M. *et al.* Plant growth promotion and differential expression of defense genes in chilli pepper against *Colletotrichum truncatum* induced by *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum*. **BMC Microbiol.** v. 23, 54, 2023. DOI 10.1186/s12866-023-02789-x.

ZHANG, F. *et al.* The application potential of *Trichoderma* T-soybean containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate for maize production. **Physiological and Molecular Plant Pathology.** v. 110, 2020. DOI 10.1016/j.pmpp.2020.101475.

ZHI-LIN, Y. *et al.* Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes. **Crit. Rev. Biotechnol.** v.32, p.363–373, 2012. DOI 10.3109/07388551.2011.651429.

CAPÍTULO IV

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- Os isolados de *Trichoderma* spp. T9, T18, T44, T62, T69, T76, T77 e T80 apresentaram um conjunto de mecanismos antagônicos *in vitro* como antibiose, competição e parasitismo que promoveram redução micelial do *F. solani* f. sp. *piperis* e evidente secreção de enzimas extracelulares líticas como protease, amilase, lipase e esterase.
- Todos os isolados de *Trichoderma* spp., endofíticos ou da rizosfera de *Piper* spp., selecionados nos testes *in vitro* reduziram eficientemente a severidade da fusariose em mudas de pimenteira-do-reino nas condições testadas, surgindo como nova alternativa para o uso desses microrganismos independente ou integrado a outros manejos da fusariose da pimenteira-do-reino.
- Três isolados de *Trichoderma* spp. (T80, T18 e T44) apresentaram melhor eficiência biocontroladora quando comparados com os resultados do tratamento com produto comercial formulado a base de mix de *Trichoderma* spp.
- Isolados do gênero *Trichoderma* spp. obtidos de raízes e solos da rizosfera de *Piper* spp. na Amazônia Oriental foram capazes de produzir hormônio de crescimento vegetal (ácido indolacético-AIA).
- Isolados, selecionados *in vitro* quanto a capacidade de produzir AIA, promoveram ganhos na parte aérea e radicular de mudas de pimenteira-do-reino. O isolado T21 apresentou um maior número de parâmetros positivos relacionado ao crescimento das mudas e mostrou-se como um promissor promotor de crescimento vegetal.
- O efeito da inoculação com *Trichoderma* spp. nas respostas bioquímicas nas mudas de pimenteira-do-reino apresentou alterações significativas no metabolismo das plantas.
- As evidências fornecidas nesse estudo apoiam fortemente a possibilidade de usar *Trichoderma* spp. obtidos de raízes e solos da rizosfera de *Piper* spp. na Amazônia Oriental como agente de biocontrole e promotor de crescimento seguro, ecologicamente correto e eficaz para a cultura da pimenteira-do-reino.