

ANA LAURA CAMPOS AIRÃO

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CAFEEIROS POR *Aspergillus niger*: ESTUDO
DE MECANISMOS POR BIOMETRIA E FOTOGRAMETRIA**

MONTE CARMELO
MINAS GERAIS – BRASIL

2023

ANA LAURA CAMPOS AIRÃO

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CAFEIROS POR *Aspergillus niger*: ESTUDO
DE MECANISMOS POR BIOMETRIA E FOTOGRAMETRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências do Programa
de Pós-graduação em Agricultura e Informações
Geoespaciais para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Oliveira Mendes

Coorientador: Prof.^a Dr^a Gleice Aparecida de Assis

MONTE CARMELO
MINAS GERAIS – BRASIL

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A298
2023

Airão, Ana Laura Campos, 1995-
Promoção de crescimento de cafeeiros por *Aspergillus niger* [recurso eletrônico]: estudo de mecanismos por biometria e fotogrametria / Ana Laura Campos Airão. - 2023.

Orientador: Gilberto de Oliveira Mendes.
Coorientadora: Gleice Aparecida de Assis .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.224>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Agronomia. I. Mendes, Gilberto de Oliveira,1983-, (Orient.). II. , Gleice Aparecida de Assis ,1986-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais. IV. Título.

CDU: 631

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais
Rodovia LMG 746, Km 01, s/nº, Bloco 1AMC, Sala 1A202, Monte Carmelo-MG, CEP 38.500-000
Telefone: (34) 3810-1033 - ppgaig@iciag.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agricultura e Informações Geoespaciais				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	27/04/2023	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	10:30
Matrícula do Discente:	32112AIG001				
Nome do Discente:	Ana Laura Campos Airão				
Título do Trabalho:	Promoção de crescimento de cafeeiros por <i>Aspergillus niger</i> : estudo de mecanismos por biometria e fotogrametria				
Área de concentração:	Informações geoespaciais e tecnologias aplicadas à produção agrícola				
Linha de pesquisa:	Sistemas Integrados de Produção Vegetal				

Reuniu-se na Sala virtual Teams: [acesse.one/k8aIU](https://teams.microsoft.com/join/one/k8aIU) a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, assim composta: Dr. Bruno Sérgio Vieira (UFU), Dr. Carlos Marcelo Silveira Soares (NOOA Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda), Gilberto de Oliveira Mendes (UFU) – orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Gilberto de Oliveira Mendes, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADA COM LOUVOR

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida eachada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Gilberto de Oliveira Mendes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/04/2023, às 10:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Sergio Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/04/2023, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Marcelo Silveira Soares, Usuário Externo**, em 28/04/2023, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4454244** eo código CRC **406E3F76**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e Nossa Senhora por sempre olharem por mim e me proporcionarem força, saúde e persistência para enfrentar todos os obstáculos que deparei ao longo dessa jornada.

Aos meus pais Dario Airão Sobrinho e Helenice Esteves Campos e minha irmã Júlia Rodrigues e Campos por serem meu alicerce, minha base e minha fonte de inspiração. Em especial para o meu pai que me auxiliou na coleta de dados em campo, desde a primeira avaliação, muito obrigada.

Ao meu companheiro de vida, namorado e melhor amigo Bruno Amâncio da Cunha que me ajudou na coleta de dados em campo, laboratório, execução das análises e pelo incentivo, carinho, paciência e companheirismo, agradeço.

Ao meu orientador Dr. Gilberto de Oliveira Mendes pela paciência, empenho e incentivo em me orientar no planejamento e condução dos experimentos, a sua presença foi imprescindível para a realização dessa pesquisa, muito obrigada.

Aos professores Dr. Rodrigo Gallis, Dra. Gleice Aparecida de Assis e Dr. Edmar Isaias de Melo pelo auxílio na condução dos experimentos, processamento de imagens, sugestões e execução das análises.

Aos participantes do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, professores Dr. Bruno Sérgio Vieira e Dr. André Luiz Firmino, a discente Daniele Ruela Mendes e em especial ao técnico de laboratório Thúlio Mattos por todo auxílio na execução das análises, conversas, conselhos e amizade.

Aos meus colegas do grupo de Microbiologia Agrícola Jordana Stein, Larissa Rocha, Gabriela Anunciação, Jeniffer Amaro e Pedro pelas conversas, auxílio e conselhos e em especial a Izaura Fernandes minha companheira de pesquisa, que me auxiliou em várias coletas de dados a campo.

Aos participantes do grupo NECACER por todo auxílio na coleta de dados a campo.

Aos meus amigos Patrick Silva, Rafaela Goulart, João Paulo Borges e Letícia Arriero por todo auxílio na condução e coleta de dados dos experimentos de laboratório e campo e por todo apoio, conversas e companheirismo, vocês foram fundamentais para essa conquista.

Ao técnico Renan Zampirolli por toda disponibilidade e auxílio para a captação de imagens aéreas do experimento.

Ao produtor Gustavo Mundim por ter cedido a área para a realização do experimento e por todo auxílio na montagem e condução do experimento em campo.

A empresa NOOA pela parceria de pesquisa, e em especial ao profissional Carlos Marcelo Soares pela sua disponibilidade e contribuição para o desenvolvimento dessa pesquisa, muito obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento da minha bolsa contribuindo para a minha carreira acadêmica.

À Universidade Federal de Uberlândia - *campus* Monte Carmelo e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais, aos professores, técnicos e demais funcionários pela contribuição para a minha formação profissional e pessoal.

A todos que contribuíram direta e indiretamente na condução dessa pesquisa e fizeram parte do meu crescimento e amadurecimento nesse percurso.

A todos vocês o meu muito obrigado e minha imensa gratidão!

BIOGRAFIA

Ana Laura Campos Airão nasceu em 6 de março de 1995 na cidade de Patrocínio. Cresceu e viveu a maior parte da sua vida em Coromandel, Minas Gerais, Brasil com seus pais Helenice Esteves Campos e Dario Airão Sobrinho, irmã Júlia Rodrigues e Campos e avós maternos Ana Fernandes de Jesus e Cristiano Esteves Campos. Em 2015 ingressou na nona turma de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia – UFU *campus* Monte Carmelo e participou por um período de 2 anos e meio do grupo de pesquisa NECACER - Núcleo de Estudos em Cafeicultura do Cerrado, desenvolvendo projetos de iniciação científica na cultura do café, além de participar de diversos eventos como palestras, simpósios e cursos. Em 2021 ingressou na Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais da Universidade Federal de Uberlândia – UFU *campus* Monte Carmelo, sendo bolsista CNPq. Durante esse período conduziu experimentos com o fungo solubilizador de fosfato *Aspergillus niger*. Em 2022 ingressou no mercado de trabalho como Analista de Controle de Qualidade Jr. na empresa Valorem Agronegócios e em abril de 2023 foi contratada para atuar como Engenheira Agrônoma na Cooperativa dos Cafeicultores de Guaxupé – COOXUPÉ.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO GERAL	8
CAPÍTULO 1	9
RESUMO.....	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 Delineamento experimental	12
2.2 Avaliação de crescimento vegetativo e monitoramento por imagens	15
2.3 Análise estatística.....	16
2.4 Processamento de imagem	16
3 RESULTADOS	17
4 DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2	29
RESUMO.....	29
1 INTRODUÇÃO	30
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Microrganismos	31
2.2 Produção de sideróforos.....	31
2.3 Atividade da enzima fosfatase	33
2.4 Atividade da enzima ACC deaminase	34
2.5 Delineamento experimental e Procedimento analítico	35
3 RESULTADOS	37
4 DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	42

RESUMO

Aspergillus niger é considerado um fungo multifuncional por promover a liberação do fósforo (P) no solo através de processos como solubilização e mineralização, além de atuar na promoção de crescimento de plantas, se tornando candidato promissor para o desenvolvimento de biofertilizantes. Diante disso esse trabalho teve como objetivo determinar o potencial uso do *A. niger* no cafeeiro, avaliar sua habilidade como solubilizador de P no solo e verificar sua capacidade na produção de compostos orgânicos e enzimas que promovem o crescimento das plantas de cafeeiro. O *A. niger* foi inicialmente investigado quanto a sua capacidade de solubilizar P no solo bem como promover o crescimento de cafeeiros em condições de campo. Os resultados indicam que a inoculação da formulação do fungo na muda promoveu maior diâmetro de caule (mm), número de nós e comprimento do ramo plagiotrópico (cm), evidenciando a importância da muda inoculada com o fungo para o estabelecimento da cultura no campo. Paralelamente a avaliação desses parâmetros biométricos foi feito acompanhamento por imagens aéreas do crescimento e desenvolvimento das plantas utilizando a fotogrametria, mostrando que é possível fazer o monitoramento da lavoura através de índices vegetativos extraídos dessas imagens. Posteriormente, os isolados de *A. niger* FS1 e ATCC 1015 foram investigados quanto a atividades promotoras de crescimento como produção de enzimas fosfatase e ACC deaminase e presença de sideróforos. Os isolados apresentaram resultados satisfatórios quanto a produção de sideróforos sendo microrganismo promissor para o biocontrole indireto de fitopatógenos, além de apresentarem síntese da enzima fosfatase, atuando diretamente na reciclagem de P do solo, o tornando disponível para a planta. De modo geral, a aplicabilidade do *A. niger* em áreas agrícolas se torna vantajoso visto que seu uso pode resultar na redução de custos com fertilizantes e agrotóxicos, proporcionando aumento na produtividade e reduzindo impactos ambientais.

Palavras-chave: agricultura digital; biofertilizante; bioinsumo; inoculante; sensoriamento remoto.

ABSTRACT

Aspergillus niger is considered a multifunctional fungus for promoting the release of phosphorus (P) in the soil through processes such as solubilization and mineralization, in addition to promoting plant growth, making it a promising candidate for the development of biofertilizers. As a result, this work aimed to determine the potential use of *A. niger* in coffee plants, evaluate its ability to solubilize P in the soil and verify its ability to produce organic compounds and enzymes that promote plant growth. The *A. niger* was initially investigated for its ability to solubilize P in the soil as well as promote coffee plant growth. The results indicate that the inoculation of the fungus formulation in the seedling promoted greater growth and development of the productive parts of the plant, such as stem diameter (mm), number of nodes and length of the plagiotropic branch (cm), evidencing the importance of the seedling inoculated with the fungus for the establishment of the culture in the field. Aerial images were also employed to monitor the growth and development of the plant by using photogrammetry, showing that it is possible to monitor the crop through vegetative indices extracted from these images. Subsequently, the *A. niger* FS1 and ATCC 1015 isolated were investigated for growth-promoting activities such as the production of phosphatase and deaminase ACC enzymes and the presence of siderophores. The isolated showed satisfactory results regarding the presence of siderophores, being a promising microorganism for the indirect biocontrol of phytopathogens, in addition to presenting the synthesis of the phosphatase enzyme, acting directly in the recycling of P in the soil, making it available to the plant. In general, the applicability of *A. niger* in agricultural areas becomes advantageous since its use can result in the reduction of costs with chemical fertilizers and pesticides, providing an increase in productivity and reducing environmental impacts.

Keywords: digital agriculture; biofertilizer; bioinput; inoculant; remote sensing.

INTRODUÇÃO GERAL

A disponibilidade de nutrientes no solo afeta diretamente o crescimento, produtividade, tamanho e a qualidade dos grãos de café (MELKE; ITTANA, 2014). Os solos da região do Cerrado são altamente intemperizados, apresentando baixa disponibilidade natural de alguns nutrientes, dentre eles o fósforo (P) (LOPES; GUIMARÃES GUILHERME, 2016). Microrganismos promotores de crescimento de plantas (MPCP) exercem papel fundamental no ciclo natural do P, disponibilizando P a partir de minerais de baixa solubilidade ou de fontes orgânicas. Além disso, contribuem no crescimento das plantas por meio de vários mecanismos como o estímulo para a produção de alguns fitormônios, enzimas e a melhoria na obtenção de nutriente (KHAN; ZAIDI; AHMAD, 2014).

Visto a importância do nutriente P para o crescimento e desenvolvimento das plantas e o uso de microrganismos que promovem a solubilização desse nutriente, o primeiro capítulo desse trabalho propõe determinar a capacidade do fungo *Aspergillus niger* como promotor de crescimento do cafeeiro sob diferentes formas de inoculação e diferentes fontes de P. Esse capítulo também mostra que é possível a implantação de tecnologias na agricultura para promover o monitoramento do crescimento vegetativo das plantas por meio de imagens fotogramétricas.

Diante da multifuncionalidade comprovada do *A. niger* na solubilização de P (MENDES et al., 2017; KALAYU, 2019), desenvolvimento de inoculantes (ARAÚJO et al., 2020), biofertilizantes (MENDES et al., 2015) e promoção de crescimento de plantas (MUNDIM; MACIEL; MENDES, 2022; SILVA et al., 2022), o segundo capítulo visa avaliar a capacidade desse fungo quanto à produção de metabólitos que promovem o crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como na disponibilização de P no solo.

De modo geral, o objetivo desse trabalho foi determinar o potencial uso do *A. niger* na cultura do cafeeiro, avaliar sua habilidade como solubilizador de P no solo e verificar sua capacidade na produção de metabólitos que promovem o crescimento de plantas.

CAPÍTULO 1

Inoculação com *Aspergillus niger* e Adubação com Fontes de Fósforo no Cafeeiro: Avaliação por biometria e fotogrametria

RESUMO

Os microrganismos exercem papel fundamental no ciclo natural do fósforo (P), disponibilizando esse nutriente para a planta a partir de minerais de baixa solubilidade ou de fontes orgânicas. O *Aspergillus niger* é um fungo capaz de disponibilizar P por meio da produção de ácidos orgânicos e enzimas. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de cafeeiros sob diferentes fontes de fertilizantes fosfatados e formas de inoculação do fungo *A. niger*, bem como monitorar os parâmetros biométricos do cafeeiro por meio imagens fotogramétricas. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 3x5, sendo três formas de inoculação do fungo *A. niger*: não inoculado (Ni); muda inoculada (As) e inoculação pós-plantio (Ap) versus cinco fontes de adubação fosfatada: Fosfato Natural (RP); Superfosfato Triplo (TSP); Fosfato Natural + Superfosfato Triplo (RP+TSP); Termofosfato (TP) e sem P (LP). Foi realizado um voo no 27º mês após plantio, para verificar o crescimento vegetativo da lavoura por meio de imagens aéreas. Para a captura das imagens, foi utilizada a aeronave Drone Phantom 4 Pro Advanced. Para diferenciação dos tratamentos foi realizada uma comparação entre as médias utilizando o teste de Duncan ($p < 0,05$). A extração dos índices de vegetação foi feita por meio do processamento da ortoimagem utilizando o *software* R e o pacote R FieldImageR. A inoculação de *A. niger* nas mudas de cafeeiros se mostrou viável quanto ao desenvolvimento da planta, apresentando maior incremento nas características: número de nós faces norte e sul, comprimento de ramo faces norte e sul e diâmetro de caule (10,88; 10,88; 22,75 cm mês⁻¹; 23,13 cm mês⁻¹ e 27,19 mm mês⁻¹), respectivamente. Os modelos de predição gerados para os índices vegetativos Green Leaf Index (GLI), Normalized Green Red Difference Index (NGRID) e Visible Atmospherically Resistant Index (VARI) apresentaram correlação moderada para os parâmetros altura de planta (0,51; 0,55 e 0,54), diâmetro de copa (0,53; 0,59 e 0,56) e número de ramos plagiotrópicos (0,56; 0,55 e 0,47) e correlação forte para diâmetro de caule (0,69; 0,71 e 0,68).

Palavras-chave: *Coffea arabica*; índices vegetativos; solubilização.

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das principais bebidas consumidas mundialmente, tornando-se a *commoditie* agrícola mais comercializada no mundo. O Brasil ocupa posição de destaque quando se refere à produção e exportação de café, sendo o maior produtor e exportador dessa cultura no mundo. Essa atividade impulsionou grande avanço no cenário nacional, principalmente no sistema socioeconômico, contribuindo diretamente para seu desenvolvimento. Nos dois primeiros meses do ano cafeeiro de 2022/23 as exportações brasileiras de café em grão verde obtiveram um acréscimo de 15,6%, totalizando 7,11 milhões de sacas exportadas mundialmente (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ - OIC, 2022).

A busca por novas tecnologias que visam aumentar a eficiência dos fertilizantes nos solos tem se tornando cada vez mais frequente. O aspecto nutricional é indispensável para o desenvolvimento fisiológico e metabólico da planta, potencializando a produtividade e qualidade da cultura (DA GAMA et al., 2017). Porém, quando mal manejado pode ser fator limitante ao rendimento final de produção das culturas.

Os solos brasileiros apresentam baixa disponibilidade de fósforo (P) (COUTINHO; FELIX; YANO-MELO, 2012), decorrente da alta fixação do P com as partículas coloidais do solo. Diante disso, a utilização de técnicas que visam o aumento da eficiência de P no solo, se torna imprescindível (KALAYU, 2019). A aplicação de fertilizantes fosfatados para complementação de P no solo, tem se tornado uma possibilidade (KALAYU, 2019). Porém, o uso constante de fertilizantes fosfatados levou ao acúmulo de P fixado no solo, compondo uma reserva, o “legado de P”, a ser explorada na agricultura por meio de técnicas para sua disponibilização para as plantas (PAVINATO et al., 2020).

A utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato se torna alternativa promissora para reverter tal processo (CHALFOUN et al., 2019), pois realizam papel fundamental na liberação e suprimento de P às plantas, por meio de processos como acidificação, quelação e reações de troca iônica (COUTINHO; FELIX; YANO-MELO, 2012). Dentre os gêneros de microrganismos, *Aspergillus* e *Penicillium* se mostraram altamente eficientes na solubilização de P (CHALFOUN et al., 2019). *Aspergillus niger* é um fungo capaz

de disponibilizar P por meio da produção de ácidos orgânicos e enzimas (ANDERSEN et al., 2011).

Inovações tecnológicas advindas da fotogrametria e do sensoriamento remoto vem se destacando no setor agrícola, por propiciar a utilização de técnicas, possibilitando assim estimar características agronômicas por meio de uma mensuração acurada e periódica das plantas ou de parte delas, como altura, diâmetro de copa e dimensões foliares, possibilitando o monitoramento do seu desenvolvimento vegetativo (RIOS et al., 2018). Para isso foram desenvolvidos modelos que correlacionam os índices vegetativos com características agronômicas, sendo extremamente vantajosos devido à sua simplicidade, agilidade e praticidade. Esses modelos fornecem, de forma precisa, as medidas a serem processadas e analisadas em avaliações de cultivo no campo, além de promover atenuação nos custos de produção (GARCÍA-BERNÁ et al., 2020).

Decorrente da baixa disponibilidade do P para as plantas nos solos do Cerrado e das adversidades encontradas pelos produtores rurais para torná-lo disponível, o uso de microrganismos como *A. niger* se torna uma alternativa interessante, já que estudos comprovaram sua eficiência como promotor de crescimento de plantas, bem como solubilizador de fosfatos minerais (ARAÚJO et al., 2020; KALAYU, 2019; LUBNA et al., 2018; MENDES et al., 2015; MENDES et al., 2017). Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de cafeeiros sob diferentes fontes de fertilizantes fosfatados e formas de inoculação do fungo *A. niger*, bem como monitorar os parâmetros biométricos do cafeeiro por meio imagens fotogramétricas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em campo na Fazenda Jataí 2, município de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil (18°50'18,5''S, 47°23'10, 8''W e altitude 940 metros) (Figura 1). O plantio da lavoura de *Coffea arabica* foi realizado em dezembro de 2020, em sequeiro, com a cultivar IPR 100 e espaçamento de plantio de 3,8 m entre linhas e 0,60 m entre plantas, totalizando 4.386 plantas ha⁻¹. Em março de 2022 foi instalado sistema de irrigação via gotejamento, com espaçamento entre os gotejadores de 0,6 m e vazão de 1,6 L h⁻¹.

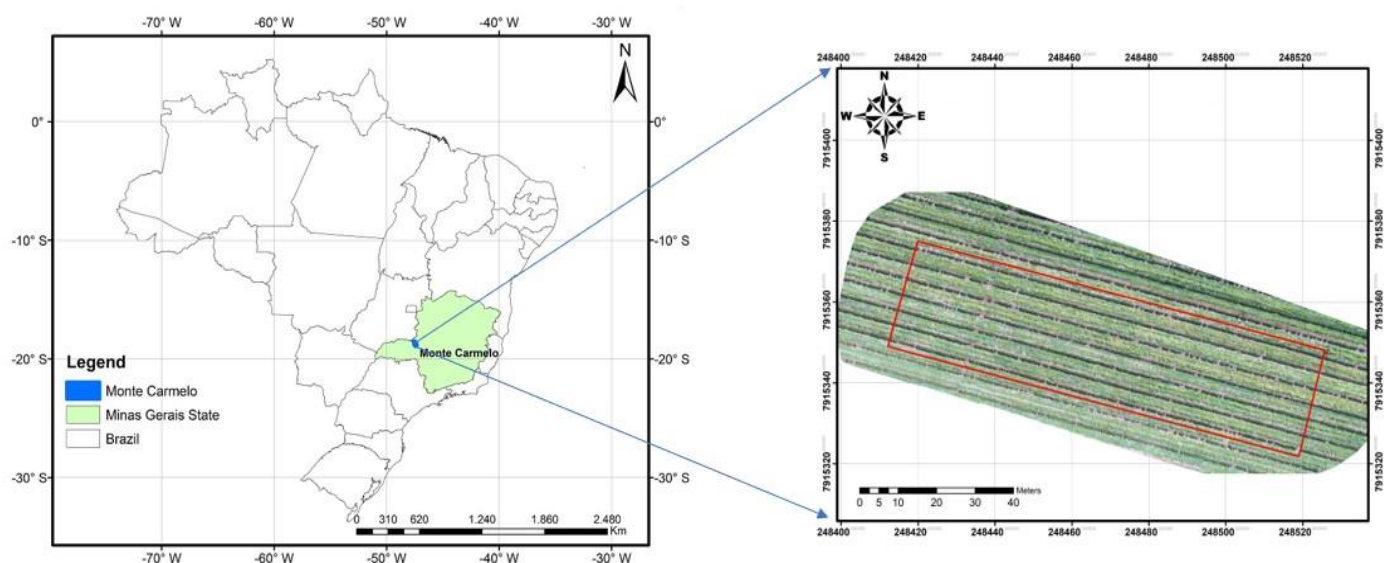


FIGURA 1. Mapa de localização da área experimental.

2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 3x5. O primeiro fator foi constituído de três formas de inoculação: não inoculado (Ni); muda inoculada (80 a 90 dias após a semeadura) com adição de 2 grânulos da formulação de *A. niger* na concentração de $\sim 2 \times 10^6$ conídios planta⁻¹ (As) (ARAÚJO et al., 2020) e inoculação pós-plantio, com adição de 10 grânulos (0,071 g grânulo⁻¹) contendo *A. niger*, na concentração de 2×10^6 conídios cova⁻¹ (cova de 64 L) (Ap). O segundo fator foi constituído por adubações com quatro fontes de P. A dose recomendada foi de 80 g de P₂O₅ cova⁻¹, sendo assim foi realizada a adubação com 1.166 kg ha⁻¹ de Fosfato Natural (9% de P₂O₅) (RP); 763 kg ha⁻¹ de Superfosfato Triplo (41% de P₂O₅) (TSP); 877 kg ha⁻¹ de Fosfato Natural + 189 kg ha⁻¹ de Superfosfato Triplo (RP+TSP); 2.005 kg ha⁻¹ de Termofosfato (16% de P₂O₅) (TP) e sem P (LP). As doses foram aplicadas de forma homogênea no sulco de plantio, em novembro de 2020 de acordo com análise de solo e recomendação para a cultura (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999) e a inoculação do fungo foi feita 77 dias após o plantio. A adição dos grânulos foi feita ao lado da muda e da planta através de uma abertura no substrato e no solo respectivamente. Os tratamentos estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Descrição dos tratamentos.

Tratamento	Inoculação	Adubação fosfatada
NiLP	Não inoculado	Sem P
NiRP	Não inoculado	FN
NiTSP	Não inoculado	TSP
NiRP+TSP	Não inoculado	FN + TSP
NiTP	Não inoculado	Termofosfato
AsLP	Mudas inoculadas	Sem P
AsRP	Mudas inoculadas	FN
AsTSP	Mudas inoculadas	TSP
AsRP+TSP	Mudas inoculadas	FN + TSP
AsTP	Mudas inoculadas	Termofosfato
ApLP	Inoculação pós-plantio	Sem P
ApRP	Inoculação pós-plantio	FN
ApTSP	Inoculação pós-plantio	TSP
ApRP+TSP	Inoculação pós-plantio	FN + TSP
ApTP	Inoculação pós-plantio	Termofosfato

FN: Fosfato Natural Reativo, TSP: Superfosfato Triplo, FN + TSP: 50% da dose de P para fonte.

Cada parcela foi composta por 12 plantas. Diante da diversidade de características presentes dentro da mesma parcela experimental, foi usado como critério de avaliação 4 plantas homogêneas (parcela útil). Foi instalada uma linha de bordadura entre cada bloco para que não ocorresse interferência entre os tratamentos. Cada tratamento possuiu 4 repetições, totalizando 60 parcelas (Figura 2).

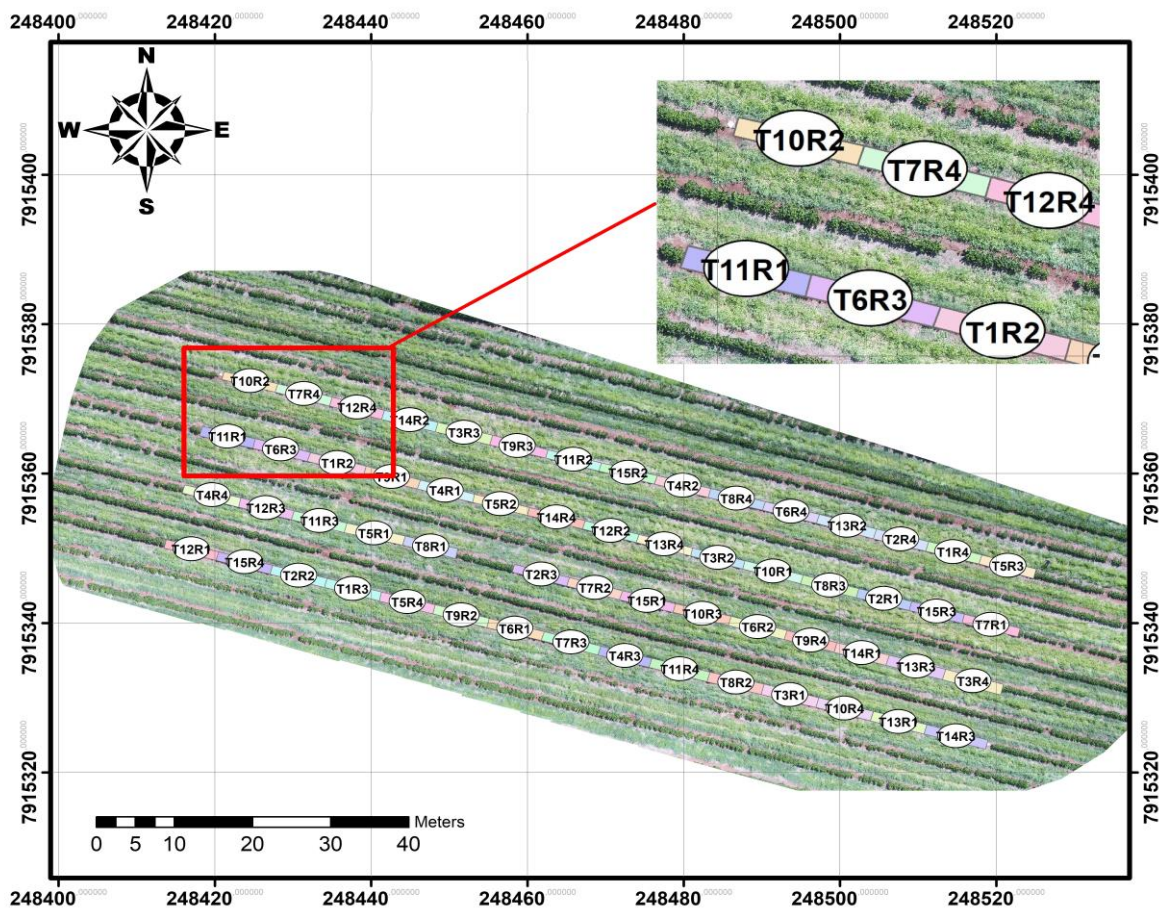


FIGURA 2. Croqui da área experimental e distribuição dos tratamentos em campo: T1: NiLP; T2: NiRP; T3: NiTSP; T4: NiRP+TSP; T5: NiTP; T6: AsLP; T7: AsRP; T8: AsTSP; T9: AsRP+TSP; T10: AsTP; T11: ApLP; T12: ApRP; T13: ApTSP; T14: ApRP+TSP e T15: ApTP.

Em agosto de 2020, antes da implantação do experimento, foram coletadas amostras de solo na profundidade de 0-20 cm para análise química e posterior recomendação de adubação. Os resultados foram os seguintes: P total = 253 mg dm⁻³; P Mehlich = 0,9 mg dm⁻³; P rem = 6,5 mg dm⁻³; K = 0,25 cmolc dm⁻³; Ca = 1,3 cmolc dm⁻³; Mg = 0,8 cmolc dm⁻³; Al³⁺ = 0,1 cmolc dm⁻³; H + Al = 3 cmolc dm⁻³; SB = 2,3 cmolc dm⁻³; T = 5,3 cmolc dm⁻³; V% = 43; m% = 4; S-SO₄⁻² = 9 mg dm⁻³; Zn = 0,6 mg dm⁻³; Fe = 23 mg dm⁻³; Mn = 1,9 mg dm⁻³; Cu = 1,7 mg dm⁻³ e B = 0,2 mg dm⁻³. Foi realizada correção da acidez pré-plantio com 3 t ha⁻¹ de calcário com 85% de Poder Relativo de Neutralização Total (PRNT) em área total. A adubação no sulco de plantio foi realizada na dose de 8 L m⁻¹ com uma mistura de palha de café e esterco bovino, sendo 50% de cada. Foram feitas 3 adubações de cobertura utilizando sulfato de amônio (20%

de N e 23% de SO_4^{2-}) na dose de 10 g planta^{-1} . O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho, com 65,4% de argila.

2.2 Avaliação de crescimento vegetativo e monitoramento por imagens

As avaliações de crescimento das plantas de cafeeiro foram realizadas bimestralmente, a partir de junho de 2021 a outubro de 2022. Foram avaliadas as seguintes características: altura de planta (medida do colo até o ponto de inserção da gema terminal com auxílio de uma régua, em centímetros); diâmetro de copa (medido com uma régua, tomando-se como padrão de medida os dois ramos no sentido das entrelinhas que apresentavam o maior comprimento, em centímetros); diâmetro de caule (medido com o auxílio de um paquímetro digital a 1 cm do colo da planta, em milímetro); número de nós por ramo plagiotrópico (contagem de nós em um ramo plagiotrópico localizado no terço médio da planta, nos dois lados da projeção da copa); comprimento de ramos plagiotrópicos (medida do ramo plagiotrópico localizado no terço médio da planta, desde sua inserção no ramo ortotrópico até sua extremidade, com o auxílio de uma régua em centímetros) e número de ramos plagiotrópicos (contagem de ramos produtivos que se originam do ramo ortotrópico). Após análise gráfica dos dados coletados foi observado que em dois períodos específicos houve maior desenvolvimento das plantas, por isso as análises estatísticas foram realizadas nos mesmos. As avaliações das características (número de nós por ramo plagiotrópico, comprimento de ramos plagiotrópicos e número de ramos plagiotrópicos) foi iniciada a partir de fevereiro de 2022, visto que antes desse período a planta estava muito pequena, impossibilitando a avaliação dessas características biométricas.

Quando as plantas já apresentavam bom desenvolvimento, foi realizado um voo no 27º mês após o plantio, para verificar o crescimento vegetativo da lavoura por meio de imagens aéreas. Para a captura das imagens, foi utilizada a aeronave Drone Phantom 4 Pro Advanced, com auxílio dos *softwares* DJI Go e DroneDeploy para planejamento e execução dos voos. A aeronave possui uma câmera de 20 megapixels que coleta imagens das bandas RGB (Red, Green e Blue). O voo foi realizado às 12 h e a 30 m de altura, com sobreposição longitudinal e sobreposição lateral de 80%.

2.3 Análise estatística

As análises estatísticas dos parâmetros biométricos foram realizadas por meio da utilização do *software* Genes (versão 2015.5.0). Para diferenciação dos tratamentos foi realizada comparação entre as médias utilizando o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

2.4 Processamento de imagem

As imagens obtidas foram processadas no *software* de fotogrametria Pix4Dmapper, para geração do ortomosaico. Para a delimitação da área experimental, bem como a demarcação dos tratamentos distribuídos na área, foi utilizado o *software* de geoprocessamento QGIS 3.26.1. Para a delimitação da área experimental, no *software*, foi criada uma camada raster e posteriormente uma camada shapefile (.shp), com codificação UTF-8 e geometria poligonal. As quatro extremidades da área experimental (início e fim do bloco 1 e bloco 4) foram utilizadas como ponto de apoio para sua demarcação. A delimitação das parcelas experimentais seguiu o mesmo procedimento citado para cada parcela, sendo conduzida por meio das coordenadas geográficas da primeira e última planta de cada parcela, marcando seu início e fim respectivamente. Os blocos foram posicionados e demonstrados em ordem crescente da esquerda para a direita.

A extração dos índices de vegetação, foi feita por meio do processamento da ortoimagem utilizando o *software* R (versão 4.1.1) e o pacote R FieldImageR (MATIAS; CARAZA-HARTER; ENDELMAN, 2020). Para realizar a extração dos índices utilizando este pacote é necessário juntamente com a ortofoto, as parcelas dos experimentos delimitados no formato shapefile (.shp), ambos georreferenciados no sistema de coordenadas geográficas. Posteriormente foram gerados os histogramas dos índices de vegetação relacionados às bandas RGB (Tabela 2).

TABELA 2. Índices de vegetação e suas respectivas equações.

Índices	Equação/Método	Referência
Overall Hue Index (HUE)	$\text{atan}(2*(B-G-R)/30,5*(G-R))$	(ESCADAFAL; BELGHITH; BEM, 1994)
Normalized Green Red Difference Index (NGRDI)	$(G-R)/(G+R)$	(TUCKER, 1979)
Green Leaf Index (GLI)	$(2*G-R-B)/(2*G+R+B)$	(LOUHAICHI; BORMAN; JOHNSON, 2001)
Soil Color Index (SCI)	$(R-G)/(R+G)$	(MATHIEU et al., 1998)
Brightness Index (BI)	$\sqrt{((R^2+G^2+B^2)/3)}$	(RICHARDSON; WIEGAND, 1977)
Visible Atmospherically Resistant Index (VARI)	$(G-R)/(G+R-B)$	(GITELSON et al., 2002)
Blue Green Pigment Index (BGI)	B/G	(ZARCO-TEJADA; RUEDA; USTIN, 2003)
Primary Colors Hue Index (HI)	$(2*R-G-B)/(G-B)$	(ESCADAFAL; BELGHITH; BEM, 1994)
Spectral Slope Saturation Index (SI)	$(R-B)/(R+B)$	(ESCADAFAL; BELGHITH; BEM, 1994)

Com os dados de parâmetros biométricos relacionados aos índices de vegetação, foi gerada uma matriz de correlação de Pearson ao nível de 5% de probabilidade. A matriz foi construída a partir do programa R e o pacote estatístico R Hmisc (HARRELL JR; DUPONT, 2021). Esse coeficiente de correlação apresenta intervalo de valores entre -1 e +1 e tem como objetivo verificar o grau de correlação entre duas variáveis, através da predição de sua intensidade. Quanto mais próximo dos extremos (+1 e -1) as variáveis são diretamente correlacionadas e inversamente correlacionadas, respectivamente, e quanto mais próximo do centro de intervalo (0) mais fraca é a correlação linear (JOHNSON; WICHERN, 2007).

Com os dados de índices de vegetação que mais se correlacionaram com os parâmetros biométricos, foram gerados modelos de predição a partir do *software* Waikato Environment for Knowledge Analysis – WEKA, versão 3.9.5.

3 RESULTADOS

As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Não foi verificada diferença entre os tratamentos no período de avaliação aos 17 meses para a taxa de crescimento de diâmetro de copa (cm). Em relação à altura da planta, o tratamento NiRP+TSP

apresentou maior valor de taxa de crescimento em relação aos tratamentos NiTP, AsLP e AsTP obtendo crescimento de 3,34 cm ao mês, com um acréscimo médio de 0,325 cm (9,73%) em relação aos tratamentos NiTP e AsLP e um acréscimo médio de 0,46 cm (13,77%) em relação ao tratamento AsTP (Tabela 3).

Para a variável diâmetro de caule, os tratamentos NiRP+TSP, AsTSP e AsRP+TSP apresentaram taxa de crescimento mensal médio de 1,6 mm mês⁻¹. Esses tratamentos foram superiores ao tratamento ApTSP que obteve taxa de crescimento mensal de diâmetro de caule de 1,40 mm mês⁻¹. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 3).

TABELA 3. Taxa de crescimento mensal no período de jun/21 a out/22 das características biométricas do cafeeiro submetido a formas de inoculação de *Aspergillus niger* e fontes de P.

Tratamento	Altura da planta (cm mês ⁻¹)	Diâmetro de caule (mm mês ⁻¹)
NiLP	3,05 abc	1,44 ab
NiRP	3,19 ab	1,52 ab
NiTSP	3,28 ab	1,53 ab
NiRP+TSP	3,34 a	1,59 a
NiTP	3,00 bc	1,53 ab
AsLP	3,03 bc	1,50 ab
AsRP	3,13 abc	1,46 ab
AsTSP	3,16 abc	1,59 a
AsRP+TSP	3,11 abc	1,60 a
AsTP	2,88 c	1,57 ab
ApLP	3,28 ab	1,55 ab
ApRP	3,08 abc	1,5 ab
ApTSP	3,22 ab	1,40 b
ApRP+TSP	3,21 ab	1,48 ab
ApTP	3,17 abc	1,58 ab
CV (%)	10,90	8,40

Médias seguidas por letras distintas dentro de uma coluna diferem pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Ni (não inoculado); As (muda inoculada); Ap (inoculação pós-plantio); LP (sem P); RP (Fosfato Natural); TSP (Superfosfato Triplo); RP+TSP (Fosfato Natural + Superfosfato Triplo) e TP (Termofosfato).

Nas avaliações de fev/22 a out/22, as características biométricas comprimento de ramo plagiotrópico face norte (cm), comprimento de ramo plagiotrópico face sul (cm) e número de ramos plagiotrópicos não apresentaram diferença entre as médias pelo teste de Duncan ($p <$

0,05). Houve diferença entre os tratamentos para altura de planta (cm) onde o tratamento NiRP+TSP se mostrou superior ao tratamento AsTP, apresentando taxa de crescimento mensal 15,79% maior (0,6 cm mês⁻¹) (Tabela 4). Os demais tratamentos não demonstraram diferença. Para a característica diâmetro de caule (mm) os tratamentos NiRP+TSP, AsRP+TSP e AsTP apresentaram taxa de crescimento mensal médio de 2,06 mm mês⁻¹. Esses tratamentos foram superiores aos tratamentos ApTSP e ApRP+TSP que tiveram valores de taxa de crescimento mensal médio para essa característica de 1,8 mm mês⁻¹.

Em relação ao número de nós face sul, o tratamento AsLP foi superior ao AsRP apresentando uma taxa de crescimento de número de nós por mês de 1,36 e 1,12, respectivamente. Já para o número de nós face norte o tratamento AsRP+TSP apresentou um acréscimo médio de 0,225 (16,5%) no número de nós por mês em relação aos tratamentos NiTSP e ApRP (Tabela 4).

TABELA 4. Taxa de crescimento mensal no período de fev/22 a out/22 das características biométricas do cafeeiro submetido a formas de inoculação de *Aspergillus niger* e fontes de P.

Tratamento	Altura de planta (cm mês ⁻¹)	Diâmetro de caule (mm mês ⁻¹)	Nós face sul (unidades mês ⁻¹)	Nós face norte (unidades mês ⁻¹)
NiLP	3,30 ab	1,85 abc	1,34 ab	1,22 ab
NiRP	3,65 ab	1,90 abc	1,20 ab	1,18 ab
NiTSP	3,65 ab	1,85 abc	1,20 ab	1,14 b
NiRP+TSP	3,80 a	2,05 a	1,21 ab	1,28 ab
NiTP	3,20 ab	2,0 ab	1,18 ab	1,20 ab
AsLP	3,60 ab	2,03 ab	1,36 a	1,19 ab
AsRP	3,20 ab	1,90 abc	1,12 b	1,28 ab
AsTSP	3,70 ab	1,90 abc	1,22 ab	1,30 ab
AsRP+TSP	3,40 ab	2,08 a	1,31 ab	1,36 a
AsTP	3,20 b	2,05 a	1,23 ab	1,24 ab
ApLP	3,45 ab	1,90 abc	1,24 ab	1,27 ab
ApRP	3,18 ab	1,93 abc	1,14 ab	1,13 b
ApTSP	3,50 ab	1,73 c	1,13 ab	1,21 ab
ApRP+TSP	3,55 ab	1,78 bc	1,20 ab	1,17 ab
ApTP	3,22 ab	1,95 abc	1,17 ab	1,17 ab
CV (%)	10,90	8,40	11,09	10

Médias seguidas por letras distintas dentro de uma coluna diferem pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Ni (não inoculado); As (muda inoculada); Ap (inoculação pós-plantio); LP (sem P); RP (Fosfato Natural); TSP (Superfosfato Triplo); RP+TSP (Fosfato Natural + Superfosfato Triplo) e TP (Termofosfato).

Esses resultados demonstram que as variáveis altura de planta (cm) e diâmetro de caule (mm) no período de fev/22 a out/22 tiveram incremento mensal superior se comparado a todo o período de avaliação. Esse período coincide com a instalação da irrigação na área em março/22, o que reduziu o estresse hídrico e, provavelmente, favoreceu o crescimento da planta (Tabela 3; Tabela 4).

Realizando a análise descritiva de todas as parcelas do incremento total das variáveis no período da condução do experimento, observa-se pela variância que os tratamentos se diferiram pouco para as variáveis diâmetro de caule (mm), número de nós face norte, número de nós face sul, comprimento de ramo face norte (cm), comprimento de ramo face sul (cm) e número de ramos apresentando 0,939, 0,277, 0,307, 0,796, 1,615 e 0,897 de variância, respectivamente (Tabela 5).

Os tratamentos sem a inoculação do fungo apresentaram os valores mínimos em cinco das oito variáveis analisadas. O tratamento NiLP obteve os menores valores de diâmetro de copa (cm), comprimento de ramo face sul (cm) e número de ramos, o tratamento NiRP o menor valor em comprimento de ramo face norte (cm) e o tratamento NiTSP o valor mínimo em número de nós face norte. Já os tratamentos com a inoculação do *A. niger* na muda apresentaram os valores máximos de 5 variáveis analisadas. O tratamento AsLP apresentou os maiores valores de número de nós face sul e comprimento de ramo face norte e sul (cm). O tratamento AsTSP obteve o valor máximo entre os tratamentos para a característica diâmetro de caule (mm) e o tratamento AsRP+TSP o valor máximo para número de nós face norte (Tabela 5).

TABELA 5. Análise estatística descritiva para as variáveis biométricas de cafeeiro submetido a formas de inoculação de *Aspergillus niger* e fontes de P de diferentes tratamentos.

Variável	Média	Variância	Mínimo	Tratamento	Máximo	Tratamento
Altura (cm)	53,433	4,39	49,083	AsTP	56,813	NiRP+TSP
Diâmetro de copa (cm)	91,36	15,41	86	NiLP	100,63	ApLP
Diâmetro de caule (mm)	25,921	0,939	23,938	ApTSP	27,188	AsTSP
Nós face norte	9,769	0,277	9,063	NiTSP	10,875	AsRP+TSP
Nós face sul	9,735	0,307	9	AsRP	10,875	AsLP
Comp. face norte (cm)	21,079	0,796	19,5	NiRP	22,75	AsLP
Comp. face sul (cm)	20,115	1,615	18,167	NiLP	23,125	AsLP
Ramos	21,156	0,897	19,333	NiLP	22,75	NiTSP

Ni (não inoculado); As (muda inoculada); Ap (inoculação pós-plantio); LP (sem P); RP (Fosfato Natural); TSP (Superfosfato Triplo); RP+TSP (Fosfato Natural + Superfosfato Triplo) e TP (Termofosfato).

A matriz de correlação de Pearson foi gerada por meio dos valores extraídos dos índices vegetativos de cada parcela experimental para verificar a correlação dos parâmetros biométricos com os índices de vegetação. Assim, para se obter uma correlação mais intensa entre as variáveis, foram geradas 3 matrizes calculadas por meio do agrupamento dos tratamentos de acordo com as formas de inoculação: Não inoculado (NiLP, NiRP, NiTSP, NiRP+TSP e NiTP) (Figura 3); Muda inoculada (AsLP, AsRP, AsTSP, AsRP+TSP e AsTP) (Figura 4) e Inoculação pós-plantio (ApLP, ApRP, ApTSP, ApRP+TSP, ApTP). O agrupamento que obteve correlação linear fraca com os índices vegetativos GLI, NGRID e VARI foi o inoculado pós-plantio, obtendo valores próximos ao centro de intervalo para todos os parâmetros biométricos avaliados.

O agrupamento dos tratamentos não inoculados apresentou correlação negativa moderada com os índices GLI variando de (-0,38 a -0,55); NGRID (-0,38 a -0,59) e VARI (-0,41 a -0,56) respectivamente, mostrando correlação inversa entre as variáveis (Figura 3).

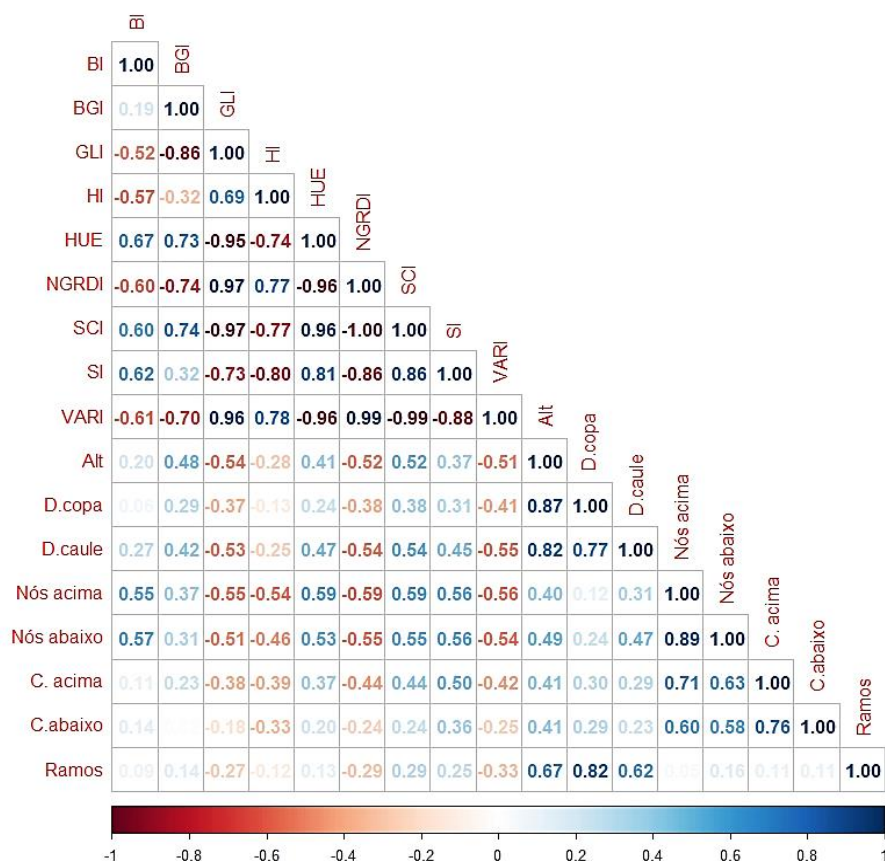


FIGURA 3. Matriz de correlação de Pearson para parâmetros biométricos da planta e índice de vegetação, nos tratamentos não inoculados pelo fungo. Correlações significativas pelo teste de

Pearson a 5% de probabilidade são exibidas em tons de azul (positivas) e vermelho (negativas). Alt – Altura de planta (cm); D. Copa – Diâmetro de copa (cm); D. Caule – Diâmetro de caule (mm); Nós acima e Nós abaixo – Número de nós do ramo plagiotrópico na face norte e sul da planta; C. acima e C. abaixo – Comprimento do ramo plagiotrópico na face norte e sul da planta (cm); Ramos – Número de ramos plagiotrópicos na planta; BI – índice de brilho; BGI – índice de pigmento verde e azul; GLI – índice de folha verde; HUE – índice geral de matiz; NGRDI – índice de diferença normalizada verde vermelho; SCI – índice de cor do solo; SI – índice de saturação de inclinação espectral e VARI – índice de resistência atmosférica visível.

O agrupamento que obteve correlação positiva e superior com os índices vegetativos GLI, NGRDI e VARI foi o muda inoculada. Os índices GLI, NGRDI e VARI apresentaram correlação moderada para os parâmetros altura de planta (0,51; 0,55 e 0,54), diâmetro de copa (0,53; 0,59 e 0,56) e número de ramos plagiotrópicos (0,56; 0,55 e 0,47) e correlação forte para o diâmetro de caule (0,69; 0,71 e 0,68) (Figura 4).

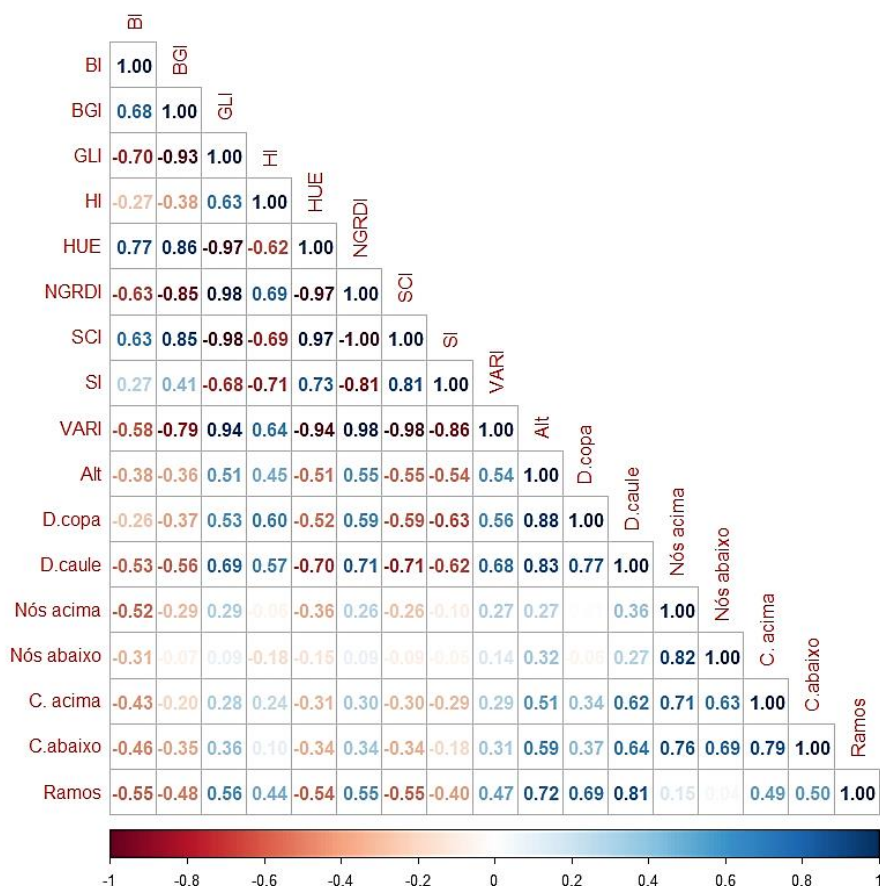


FIGURA 4. Matriz de correlação de Pearson para parâmetros biométricos da planta e índice de vegetação, nos tratamentos mudas inoculadas. Correlações significativas pelo teste de Pearson a 5% de probabilidade são exibidas em tons de azul (positivas) e vermelho (negativas). Alt –

Altura de planta (cm); D. Copa – Diâmetro de copa (cm); D. Caule – Diâmetro de caule (mm); Nós acima e Nós abaixo – Número de nós do ramo plagiotrópico na face norte e sul da planta; C. acima e C. abaixo – Comprimento do ramo plagiotrópico na face norte e sul da planta (cm); Ramos – Número de ramos plagiotrópicos na planta; BI – índice de brilho; BGI – índice de pigmento verde e azul; GLI – índice de folha verde; HUE – índice geral de matiz; NGRDI – índice de diferença normalizada verde vermelho; SCI – índice de cor do solo; SI – índice de saturação de inclinação espectral e VARI – índice de resistência atmosférica visível.

A partir desses resultados de correlação foi possível gerar modelos de regressão linear para prever altura de plantas (cm), diâmetro de copa (cm) e diâmetro de caule (mm). Os índices NGRDI e VARI que tiveram correlação moderada a forte com os parâmetros foram utilizados para criação dos modelos. A raiz do erro médio quadrático demonstra que o valor predito a partir da equação gerada teve uma diferença média de 5,47 cm; 10,67 cm e 2,41 mm para mais ou menos do valor coletado em campo para os parâmetros altura de planta, diâmetro de copa e diâmetro de caule respectivamente (Tabela 6).

TABELA 6. Modelos de regressão linear para predição de altura de plantas, diâmetro de copa e diâmetro de caule de cafeeiros inoculados na muda com *Aspergillus niger*, gerados a partir dos índices de vegetação NGRDI e VARI.

Índice	Parâmetros	Equação de regressão	RMSE	RMSE%
VARI	Altura	$Y = 31,05 \times \text{VARI} + 68,07$	5,47	7,6
NGRDI	D.copa (cm)	$Y = 123,13 \times \text{NGRDI} + 73,22$	10,67	13,06
NGRDI	D.caule (mm)	$Y = 37,97 \times \text{NGRDI} + 19,88$	2,41	10,84

RMSE = Raiz do Erro Quadrático Médio.

As equações geradas indicam que todos os três modelos de regressão gerados a partir dos índices tem potencial para serem utilizados para predizerem os valores de altura, diâmetro de copa e diâmetro de caule do cafeeiro. Esses valores indicam uma confiabilidade em torno de 92, 86 e 89% respectivamente, para predição da variável em todas as equações.

4 DISCUSSÃO

A combinação das fontes de P Fosfato Natural (FN) + Superfosfato triplo (TSP) foi a que mais contribuiu para o desenvolvimento dos parâmetros biométricos altura de plantas (cm)

e diâmetro de caule (mm) em relação às demais fontes de P testadas. O fungo *A. niger* contribuiu para o desenvolvimento das características biométricas diâmetro de caule (mm), números de nós e comprimento de ramos plagiotrópicos (cm) e por isso apresenta potencial uso como inoculante. A inoculação de *A. niger* na muda se mostrou viável quanto ao desenvolvimento das plantas. O modelo de predição gerado por meio dos índices de vegetação NGRID e VARI pode ser utilizado para estimar características biométricas do cafeeiro.

A disponibilidade de nutrientes para as plantas é considerada fator imprescindível no seu crescimento e desenvolvimento. A adubação combinada de FN + TSP foi bastante promissora apresentando maior taxa de crescimento referente à altura de plantas (cm) e diâmetro de caule (mm), se comparado aos demais tratamentos testados.

De modo geral, a inoculação do fungo na muda apresentou resultados promissores na promoção de crescimento das plantas de cafeeiro, apresentando bom desempenho na taxa de crescimento das características biométricas com alto grau de correlação com a produtividade (número de nós e comprimento de ramos plagiotrópicos (cm)), assim como de diâmetro de caule (mm). Já existem trabalhos comprovando a eficiência do fungo em produção de mudas de cafeeiro onde os parâmetros importantes para o estabelecimento da muda como diâmetro de caule, número de folhas, tamanho de raiz e tamanho da muda foram superiores quando o fungo foi utilizado (ARAÚJO et al., 2020). Com isso, o uso das mudas já inoculadas se torna promissor para o estabelecimento da cultura no campo, proporcionando melhor desenvolvimento da planta e maior tolerância a influência de fatores bióticos e abióticos.

Por se tratar de uma cultura perene, o cafeeiro passa por vários ciclos vegetativos e produtivos durante seu período no campo. Com isso é necessária a realização de avaliações temporais para se obter resultados concretos sobre o uso do *A. niger* na cultura. Também se torna importante um período de avaliação prolongado para verificarmos como será o comportamento do P no solo. Apesar de não ter sido algo analisado diretamente nessa investigação, a solubilização de P por isolados de *A. niger* já foi comprovada (MENDES et al., 2017; MENDES et al., 2014; MENDES et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2021). Estudos comprovam que o fungo foi capaz de liberar o P no solo em níveis superiores à sua demanda *in vitro*, sugerindo potencial contribuição para o fornecimento do nutriente para as plantas. Isso é um fator importante, visto que essa característica gera economias em adubações fosfatadas por parte do produtor (NASCIMENTO et al., 2021).

O diagrama de Pearson possibilitou verificar a correlação entre os valores extraídos dos índices de vegetação e os valores dos parâmetros coletados no campo para posteriormente serem criados os modelos de regressão com os índices que correlacionassem com as variáveis avaliadas. Com isso, foram gerados 3 modelos de predição de altura de plantas (cm), diâmetro de copa (cm) e diâmetro de caule (mm) que apresentaram boa precisão e que podem ser utilizados nos tratamentos com a inoculação realizada na muda, possibilitando um bom monitoramento das lavouras inoculadas com o fungo *A. niger*. Os modelos gerados a partir de dois índices de vegetação NGRID e VARI, também permitem maior flexibilidade na escolha de qual índice utilizar.

Os índices de vegetação vêm sendo utilizados cada vez mais na agricultura como forma de monitoramento das lavouras. Modelos de regressão foram gerados para acompanhar o índice de área foliar de duas cultivares de cafeeiro (BENTO et al., 2022). Estudos utilizaram o índice VARI com o intuito de gerar modelos de regressão para prever os valores dos parâmetros vegetativos índice SPAD, diâmetro de caule e número de folhas em alfaces inoculadas com o fungo *A. niger* (SILVA et al., 2022). Índices de vegetação também foram utilizados para estimativa de produção em arroz (ZHOU et al., 2017). Essas investigações corroboram com os resultados encontrados nesse manuscrito, mostrando que a aplicação de tecnologias na agricultura se torna cada vez mais frequente.

5 CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que a inoculação com o fungo *A. niger* foi capaz de promover o desenvolvimento de características produtivas da cultura evidenciando seu potencial na promoção de crescimento de plantas de cafeeiro. Os modelos de predição gerados relacionados a características biométricas (altura de plantas, diâmetro de copa e diâmetro de caule) nos tratamentos com inoculação de *A. niger* na muda apresentaram bons resultados de correlação. Sugere-se a busca por novas investigações para verificar a solubilização de P no solo por esse isolado, visto que já foi relatado seu potencial como solubilizador em outras culturas.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, M. R. et al. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. **Genome Research**, v. 21, n. 6, p. 885–897, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.112169.110>.
- ARAÚJO, V. C. et al. Enhanced growth in nursery of coffee seedlings inoculated with the rhizosphere fungus *Aspergillus niger* for field transplantation. **Rhizosphere**, v. 15, p. 1–4, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100236>.
- BENTO, N. L. et al. Characterization of Recently Planted Coffee Cultivars from Vegetation Indices Obtained by a Remotely Piloted Aircraft System. **Sustainability**, v. 14, n. 3, 1 fev. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/su14031446>.
- CHALFOUN, S. M. et al. Selection of fungal isolates with potential for phosphate solubilization and formulation of inoculant for coffee crops. **Coffee Science**, v. 14, n. 3, p. 315–325, 2019. DOI: <https://doi.org/10.25186/cs.v14i3.1583>.
- COUTINHO, F. P.; FELIX, W. P.; YANO-MELO, A. M. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 85–89, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.02.002>.
- DA GAMA, T. C. P. et al. Anatomia foliar, fisiologia e produtividade de cafeeiros em diferentes níveis de adubação. **Coffee Science**, v. 12, n. 1, p. 42, 2017. DOI: <https://doi.org/10.25186/cs.v12i1.1195>.
- ESCADAFAL, R.; BELGHITH, A.; BEM, M. H. Indices spectraux pour la télédétection de la dégradation des milieux naturels en Tunisie aride. **Mesures physiques et Signatures spectrales en Télédétection**, p. 17-21, 1994.
- GARCÍA-BERNÁ, J. A. et al. Systematic mapping study on remote sensing in agriculture. Applied Sciences. **Appl. Ciência**, v. 10, n.10, p. 3456, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/app10103456>.
- GITELSON, A. A. et al. Novel algorithms for remote estimation of vegetation fraction. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, n. 1, p. 76-87, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(01\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(01)00289-9).
- HARRELL JR, F. E; DUPONT, C. **Package 'hmisc' - R package version 4.5-0**. Disponível em: Acesso em: 20 fev. 2023.
- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**, ed.6, p. 800, 2007.
- KALAYU, G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, p. 7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>.
- KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. **Springer**, p. 31–62, 2014. DOI: https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5_2.

LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. A career perspective on soil management in the cerrado region of Brazil. **Advances in Agronomy**, v. 137, p. 1–72, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.12.004>.

LOUHAICHI, M.; BORMAN, M. M.; JOHNSON, D. E. Spatially located platform and aerial photography for documentation of grazing impacts on wheat. **Geocarto International**, v. 16, n. 1, p. 65-70, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1080/10106040108542184>.

LUBNA et al. Aspergillus Niger CSR3 regulates plant endogenous hormones and secondary metabolites by producing gibberellins and indoleacetic acid. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 100–111, 1 jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1436199>.

MATHIEU, R. et al. **Relationships between Satellite-Based Radiometric Indices Simulated Using Laboratory Reflectance Data and Typic Soil Color of an Arid Environment**, v. 66, n. 1, p. 17-28, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(98\)00030-3](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(98)00030-3).

MATIAS, F. I.; CARAZA-HARTER, M. V.; ENDELMAN, J. B. FIELDimageR: An R package to analyze orthomosaic images from agricultural field trials. **The Plant Phenome J.**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ppj2.20005>.

MELKE, A.; ITTANA, F. Nutritional requirement and management of Arabica Coffee (*Coffea arabica* L.) in Ethiopia: national and global perspectives. **American Journal of Experimental Agriculture**, v. 5, n. 5, p. 400–418, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.9734/AJEA/2015/12510>.

MENDES, G. O. et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 239–249, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>.

MENDES, G. O. et al. Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. **Microbial Biotechnology**, v. 8, p. 930–939, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12289>.

MENDES, G. O. et al. Fermentation liquid containing microbially solubilized P significantly improved plant growth and P uptake in both soil and soilless experiments. **Applied Soil Ecology**, v. 117–118, p. 208–211, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.05.008>.

MUNDIM, G. DE S. M.; MACIEL, G. M.; MENDES, G. DE O. *Aspergillus niger* as a Biological Input for Improving Vegetable Seedling Production. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, 1 out. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040674>.

NASCIMENTO, J. M. et al. *Aspergillus niger* as a key to unlock fixed phosphorus in highly weathered soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 156, p. 1–9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108190>.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ - OIC. **Exportação de café dos países exportadores**. Disponível em: <https://www.ico.org/pt/about_statistics_p.asp?section=Estat%EDstica>. Acesso em: 3 mar. 2023.

- PAVINATO, P. S. et al. Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72302-1>.
- RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5º Aproximação**, ed. 1, p. 360, 1999.
- RICHARDSON, A. J.; WIEGAND, C. L. Distinguishing vegetation from soil background information. **Photogrammetric engineering and remote sensing**, v. 43, n. 12, p. 1541-1552, 1977.
- RIOS, G. F. A. et al. Mensuração fenológica e fotogramétrica foliar com lasers e câmara digital. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 12, n. 2, p. 2487–2499, 5 jun. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.7127/rbai.v12n200765>.
- SILVA, P. V. et al. Field evaluation of the effect of *Aspergillus niger* on lettuce growth using conventional measurements and a high-throughput phenotyping method based on aerial images. **Plos One**, v. 17, n. 9, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274731>.
- TUCKER, C. Red and Photographic Infrared Linear Combinations for Monitoring Vegetation. **Remote Sensing of Environment**, v. 8, p. 127-150, 1979. DOI: [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(79\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(79)90013-0).
- ZARCO-TEJADA, P. J.; RUEDA, C. A.; USTIN, S. L. Water content estimation in vegetation with MODIS reflectance data and model inversion methods. **Remote Sensing of Environment**, v. 85, n. 1, p. 109–124, 25 abr. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00197-9](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00197-9).
- ZHOU, X. et al. Predicting grain yield in rice using multi-temporal vegetation indices from UAV-based multispectral and digital imagery. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, v. 130, p. 246–255, 1 ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2017.05.003>.

CAPÍTULO 2

Mecanismos da promoção de crescimento de plantas por *Aspergillus niger*

RESUMO

Aspergillus niger é um potencial candidato a ser aplicado em áreas agrícolas, visto que além da capacidade de solubilização de fosfato, atua na promoção de crescimento de plantas por meio de outros mecanismos. Nesse trabalho avaliamos a capacidade dos isolados de *A. niger* FS1 e ATCC 1015 na produção de compostos orgânicos e enzimas de interesse agrícola. A síntese de sideróforos e das enzimas fosfatase e ACC deaminase foi investigada através de métodos qualitativos e quantitativos. O isolado *A. niger* FS1 apresentou produção de sideróforos de 2.057 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e atividade da enzima fosfatase de 7,19 ng p-NPP ml^{-1} . O *A. niger* ATCC 1015 também apresentou resultados positivos na produção de sideróforos. Ambos isolados propostos não sintetizaram a enzima ACC deaminase. Esses resultados contribuem para aplicação do *A. niger* em áreas agrícolas, visto que seu uso pode promover aumento da sanidade da planta contribuindo indiretamente para o biocontrole de fitopatógenos e promoção de crescimento da planta, além de ser microrganismo promissor para o desenvolvimento de biofertilizantes.

Palavras-chave: *A. niger* FS1 e ATCC 1015; enzimas; sideróforos.

1 INTRODUÇÃO

Microorganismos promotores de crescimento de plantas (MPCP) abrangem um extenso grupo de bactérias e fungos (TRIVEDI et al., 2020) no qual através de múltiplos mecanismos promovem o crescimento e desenvolvimento das plantas (ARAÚJO et al., 2020; ETESAMI; MAHESHWARI, 2018). Dentre os mecanismos, citam-se a produção de enzimas (ANDERSEN et al., 2011), sideróforos (COSTA; LOPER, 1994), solubilização de P (CHALFOUN et al., 2019) e biocontrole de patógenos (TOJU et al., 2018), além da produção de fitormônios como ácido giberélico (GAs) e ácido indolacético (AIA) que auxiliam no crescimento de raiz, caule e folha (LUBNA et al., 2018).

Por potencializarem o desempenho vegetal, os MPCP têm sido propostos como importantes integrantes de novas biotecnologias na agricultura (ARAÚJO et al., 2020), decorrente da sua multifuncionalidade por apresentar capacidade de produzir fitormônios, aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo, bem como sua utilização na indústria alimentícia (LUBNA et al., 2018). Associações simbióticas com microrganismos rizosféricos, tem se tornado alternativa eficaz de tolerância a estresses ambientais bióticos e abióticos pelas plantas interferindo positivamente nas suas funções fisiológicas e metabólicas, como fotossíntese e disponibilidade de nutrientes essenciais (PRIYA et al., 2022; TOJU et al., 2018).

O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo de fungos promotores de crescimento de plantas. O fungo *Aspergillus niger* é considerado um microrganismo multifuncional, com capacidade de solubilizar minerais fosfáticos (MENDES et al., 2015), sendo microrganismo promissor para o desenvolvimento de inoculantes (MENDES et al., 2014). Além disso, o *A. niger* apresenta capacidade de produzir sideróforos e fitormônios promotores de crescimento como ácido indolacético e giberélico (LUBNA et al., 2018), auxiliando a planta sob condições de estresse e potencializando o seu desenvolvimento.

Decorrente da ampla aplicabilidade e potenciais papéis desenvolvidos pelos sideróforos, a sua investigação se torna cada vez mais frequente (SAHA et al., 2016). Fungos que sintetizam sideróforos desempenham papel importante no biocontrole de fitopatógenos, pois promovem a captura de Fe^{3+} do meio, acarretando competição em busca de Fe^{3+} com patógenos adjacentes, levando a supressão do crescimento desses patógenos fúngicos (CHOUDHURY; TREVELYAN; BOSWELL, 2020; KUMARI et al., 2013).

Apesar de muitos estudos estarem direcionados a bactérias, diversos fungos têm apresentado melhor potencial para solubilizar fosfato, principalmente o *Aspergillus* spp. (WANG et al., 2018; BAKRI, 2019). Microrganismos capazes de mineralizar P no solo e reduzir o nível de etileno da planta através da produção de enzimas como fosfatase e ACC deaminase se tornam candidatos desejáveis quando se procura um potencial biofertilizante (GALEANO et al., 2021).

Diante de todas essas funcionalidades, o *A. niger* é uma alternativa a ser estudada, pois sua capacidade de promoção de crescimento de plantas já foi comprovada (ARAÚJO et al., 2020), bem como seu potencial como solubilizador de fosfato do solo (KALAYU, 2019; MENDES et al., 2014; 2015; 2017). Objetivou-se com essa pesquisa avaliar a capacidade de isolados de *A. niger* FS1 e ATCC 1015 na produção de compostos orgânicos e enzimas, investigando seu desempenho como promotor de crescimento de planta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Os isolados de *Aspergillus niger* FS1 e ATCC 1015 foram obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (Universidade Federal de Uberlândia, Monte Carmelo, MG, Brasil). Os fungos foram mantidos em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) incubadas a 28 °C.

A solução de esporos foi preparada em 50 mL de Tween 80 0,01% por meio da raspagem das placas com auxílio da alça de Drigalski estéril. A contagem de esporos foi feita em câmara de Neubauer para se obter concentração de 10^7 esporos mL⁻¹.

2.2 Produção de sideróforos

O meio de cultura utilizado para determinação da produção de sideróforos foi conforme descrito por Grimm e Allen (1954), modificado por Baakza et al. (2004). O meio foi composto por 1 g L⁻¹ de K₂SO₄; 3 g L⁻¹ de acetato de amônio; 3 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 1 g L⁻¹ de ácido cítrico; 20 g L⁻¹ de sacarose e pH 6,8 ajustado com amônia. Para suplementação do meio foi feito

preparo de uma solução estoque contendo 2 g L⁻¹ de tiamina; 0,005 g L⁻¹ de CuSO₄ .5H₂O; 0,035 g L⁻¹ de MnSO₄.H₂O; 2 g L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e 80 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Para completa remoção de ferro do meio, foi utilizada solução de 8-hidroxiquinolina 3% dissolvida em clorofórmio (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Após agitação e separação de fases, o clorofórmio foi descartado. O meio foi lavado três vezes com clorofórmio para completa remoção residual de 8-hidroxiquinolina e complexos ferrosos, a fim de evitar inibição do crescimento do microrganismo (MESSENGER; RATLEDGE, 1985). As vidrarias foram imersas em HCl 6 mol L⁻¹ por 1 h e enxaguadas com água destilada para completa remoção de ferro (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

Os fungos foram cultivados e a solução de esporos foi preparada (item 2.1). Os frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura líquido esterilizado em autoclave (121 °C por 20 min) foram inoculados com 10⁶ conídios/frasco (BAAKZA et al., 2004). Os erlenmeyers foram incubados no shaker a 28 °C, com velocidade de 150 rpm, durante 15 dias. Os filtrados fúngicos foram obtidos através de filtração com filtro de papel e submetidos ao teste do FeCl₃ (NEILANDS, 1981) e ensaio Cromo Azurol Sulfonato - CAS (SCHWYN; NEILANDS, 1987) para detecção da presença de sideróforos por testes qualitativo e quantitativo (Tabela 1).

TABELA 1. Métodos de detecção e quantificação de sideróforos em filtrados fúngicos.

Ensaio	QUALITATIVO	QUANTITATIVO	Metodologia
Teste de FeCl ₃	Formação de coloração amarelo avermelhado e pico de absorbância entre 420 e 450 nm	-	(NEILANDS, 1981)
Cromo Azurol Sulfonato (CAS)	Alteração de cor do azul para laranja/vermelho	Preparo da curva padrão e leitura das absorbâncias em 630 nm	(SCHWYN; NEILANDS, 1987)

A quantificação de sideróforos produzidos pelos isolados de *A. niger* do ensaio de Cromo Azurol Sulfonato (CAS) foi mensurada a partir da leitura da curva padrão, composta por sideróforos do tipo hidroxamato (mesilato de deferoxamina – MDF). Decorrente da natureza dos sideróforos utilizados na curva padrão e seguindo metodologia proposta por

Schwyn e Neilands (1987), foi necessária adição da solução CAS *Shuttle* (ácido 5-sulfosalicílico) na solução CAS, para garantir aumento na velocidade de transferência do Fe.

O preparo da curva padrão e as leituras foram realizados conforme adaptação da metodologia de Schwyn e Neilands (1987):

- **Preparo da curva padrão:** foi preparada com solução de 20 µg/mL de mesilato de deferoxamina (MDF) em 5 concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 µg/mL).
- **Leitura das amostras e dos padrões:** foi adicionado 1 mL da solução CAS em 1 mL dos padrões e das amostras (diluídas 51x). Após 5 minutos com auxílio do espectrofotômetro, foi feita leitura da absorbância no comprimento de onda de 630 nm.

2.3 Atividade da enzima fosfatase

O meio de amido de milho foi preparado conforme descrito por Shieh e Ware (1968) e modificado por Gargova e Sariyska (2003). O meio foi preparado com 40 g L⁻¹ de amido de milho; 30 g L⁻¹ de glicose; 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,5 g L⁻¹ de KCl; 0,1 g L⁻¹ de FeSO₄; 8,6 g L⁻¹ de NaNO₃; 0,2 g L⁻¹ de K₂HPO₄ e pH 5. Os fungos foram cultivados em BDA, se divergindo apenas no período de incubação de 50 dias e a solução de esporos foi preparada (item 2.1). Os frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio de amido de milho estéril foram inoculados e posteriormente incubados no shaker a 30 °C, com velocidade de 220 rpm, durante 9 dias (GARGOVA; SARIYSKA, 2003). A cultura foi filtrada através de papel filtro quantitativo com porosidade de 7,50 micras e submetidos a aplicação dos reagentes.

Para determinar atividade da enzima fosfatase, foi preparado soluções de tampão universal modificado (MUB) pH 6,5, tolueno, *p*-nitrofenil fosfato (PNP) 0,115 mol L⁻¹, hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 mol L⁻¹ e solução estoque de *p*-nitrofenol, seguindo metodologia de Tabatabai e Bremner (1969). Além disso, foi preparado outra solução de MUB da reação com os valores dos elementos multiplicados por 1,45 como forma de adequar as quantidades para leitura das amostras, uma vez que a metodologia original analisa a atividade enzimática em solo, enquanto na presente pesquisa analisou-se em meio de cultura.

Após preparo das soluções, o procedimento foi realizado em duas etapas, seguindo adaptação da metodologia de Tabatabai e Bremner (1969).

- 1. Preparo da curva padrão:** foi preparada em balão volumétrico de 100 mL no qual foi adicionado 10 mL da solução estoque de *p*-nitrofenol diluída e seu volume completado com água destilada. A curva foi preparada nas concentrações de 0, 10, 20 e 30 µg/mL.
- 2. Leitura das amostras e dos padrões:** após a retirada das amostras do banho-maria foi adicionado 4 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ nas amostras e nos padrões, a fim de interromper a reação. Os frascos foram agitados por alguns segundos para completa homogeneização do NaOH. Com auxílio do espectrofotômetro, foi feita leitura da absorbância no comprimento de onda de 405 nm. A cor amarela indica presença de *p*-nitrofenol, e é usada para estimar esse fenol.

2.4 Atividade da enzima ACC deaminase

O procedimento para verificar a atividade da enzima ACC deaminase envolve duas etapas: produção de biomassa e indução de síntese da ACC deaminase. Para ambas etapas foi preparado o meio sintético proposto por Yedidia; Benhamou e Chet, (1999) composto por 15 g L⁻¹ de glicose; 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O; 0,6 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,15 g L⁻¹ de KCl e 1 ml da solução estoque (0,005 g L⁻¹ de FeSO₄·7H₂O; 0,006 g L⁻¹ de MnSO₄·H₂O; 0,004 g L⁻¹ de ZnSO₄·H₂O e 0,002 g L⁻¹ de CoCl₂). Para produção de biomassa, a fonte de nitrogênio (N) utilizada foi 1 g L⁻¹ de NH₄NO₃ e para a indução de síntese da ACC deaminase foi utilizado 0,3033 g L⁻¹ de 3 mM de ACC, respectivamente.

Para a produção de biomassa, os isolados foram cultivados em frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio sintético com nitrato de amônio (YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999). Os frascos foram inoculados com solução de esporos (item 2.1) e mantidos a 30 °C por 2 dias a 150 rpm. Em seguida, as biomassas foram lavadas em condições assépticas com Tris HCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,6) e transferidas para tubos cônicos de 50 mL. Os tubos contendo 15 mL de meio sintético suplementado com 3 mM de ACC também foram incubados por 24 horas a 28 °C e agitados em agitador roller.

A atividade da ACC deaminase foi determinada usando ACC como substrato e seguindo metodologia proposta por Viterbo et al. (2010). Após o período de incubação a biomassa foi separada do meio através de filtração com filtro de papel de porosidade 7,50 micras. Em seguida, a biomassa foi ressuspensa em meio volume (7,5 mL) de Tris HCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,5)

e macerada em almofariz. Uma alíquota de 25 μL de tolueno foi adicionada a uma alíquota de 200 μL de cultura macerada previamente homogeneizada em tampão Tris HCl 0,1 mol L^{-1} (pH 8,5). Em seguida foi adicionado à suspensão 20 μL de ACC 0,5 mol L^{-1} e incubado em banho-maria a 30 °C por 15 min. Após a incubação, 1 mL de HCl 0,56 mol L^{-1} foi adicionado às amostras, que foram homogeneizadas e centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. Após a centrifugação foi adicionado 1 ml do sobrenadante, 800 μL de HCl 0,56 mol L^{-1} e 300 μL de solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNF). As amostras foram incubadas em banho-maria a 30 °C por 30 min. Posteriormente foi adicionado nas amostras e nos padrões 2 mL de NaOH 2 mol L^{-1} . Após a adição e homogeneização de NaOH, a absorbância é medida no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de α -cetobutirato (produto da quebra do ACC) foi determinada usando uma curva padrão de α -KB puro. O ensaio foi realizado conforme descrito por Viterbo et al. (2010) com modificações na quantidade de meio de cultura (30 mL e 15 mL) e condições de cultivo (150 rpm e 100 μL de solução de esporos/tubo).

2.5 Delineamento experimental e Procedimento analítico

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições (*A. niger* FS1, *A. niger* ATCC 1015 e controle) onde cada erlenmeyer constituiu uma unidade experimental, totalizando 15 unidades em cada experimento.

Os dados de quantificação, produção de sideróforos e produção da atividade da enzima fosfatase, foram submetidos à análise de variância, e posteriormente ao teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Os dados obtidos foram analisados no *software* Genes (versão 2015.5.0).

Nos experimentos de sideróforos e enzima fosfatase, foram geradas equações de regressão linear através dos valores de concentração e absorbância da curva padrão utilizando o Microsoft Excel. A equação de regressão utilizada para mensurar a quantidade de sideróforos produzidos por cada isolado, foi calculada através do Logaritmo Neperiano (LN) das absorbâncias da curva padrão (Figura 1).

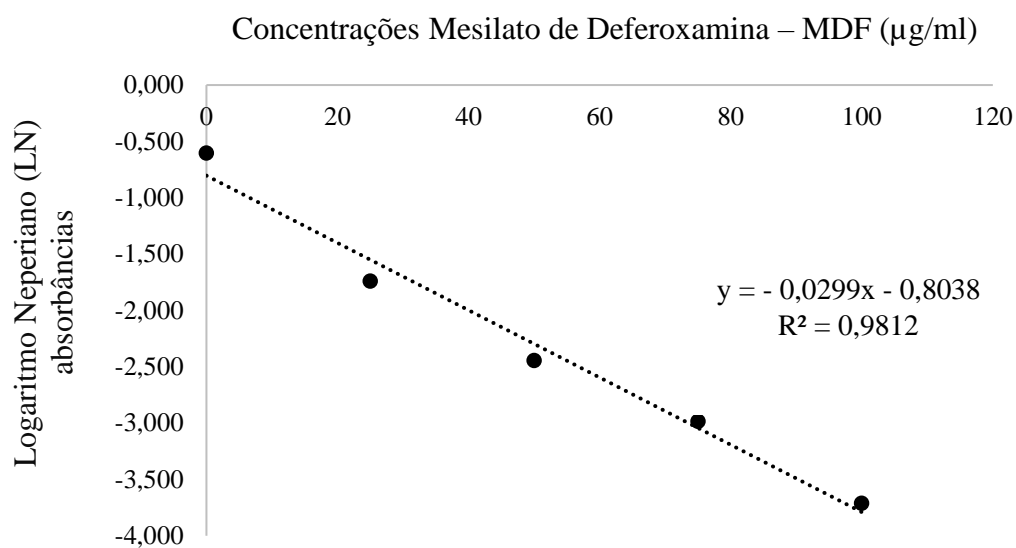


FIGURA 1. Equação de regressão para estimar quantidade de sideróforos produzidos pelos isolados de *A. niger* FS1 e ATCC 1015.

A quantidade de *p*-nitrofenol produzida pelas amostras fúngicas, foi calculada utilizando como parâmetro os valores de absorbância da curva padrão. Após a leitura dos padrões e utilizando a equação de regressão linear gerada foi possível quantificar o *p*-nitrofenol produzido por cada isolado de *A. niger* (Figura 2).

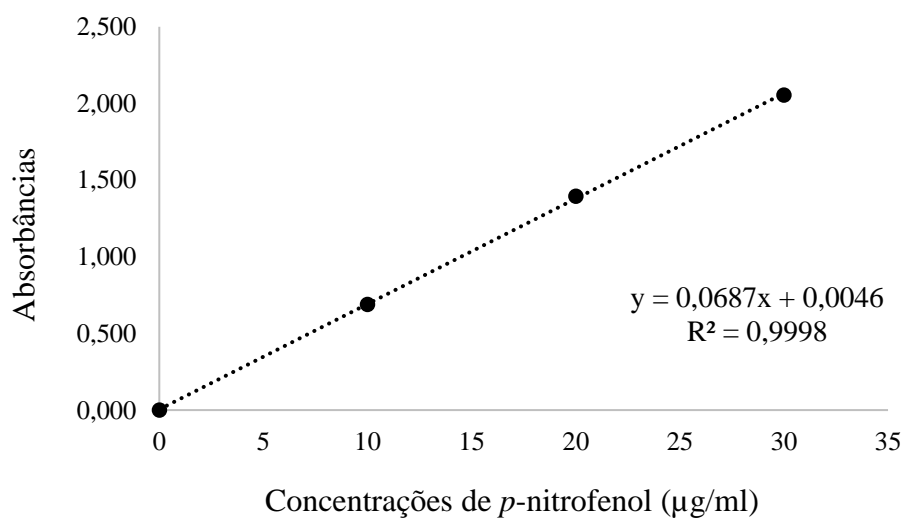


FIGURA 2. Equação de regressão linear para estimar quantidade de *p*-nitrofenol produzido pelos isolados de *A. niger* FS1 e ATCC 1015.

3 RESULTADOS

A detecção de sideróforos foi comprovada pela reação positiva no teste de FeCl_3 e ensaio CAS dos isolados de *A. niger* testados (FS1 e ATCC 1015) (Tabela 2). Também foi detectado no teste de FeCl_3 , pico de absorvância entre 420 e 450 nm, evidenciando a capacidade desses isolados em produzir sideróforos do tipo hidroxamato.

TABELA 2. Potencial dos isolados de *Aspergillus niger* na produção de sideróforos.

		<i>A. niger</i> FS1	<i>A. niger</i> ATCC 1015
Teste de FeCl_3	Produção de sideróforos e pico entre 420 e 450 nm	+	+
Ensaio de Cromo Azurol Sulfonato - CAS	Produção de sideróforos	+	+

Os isolados de *A. niger* FS1 e ATCC 1015 apresentaram resultado positivo para produção de sideróforos em ensaio qualitativo a partir da alteração da coloração das amostras do amarelo para amarelo/avermelhado no teste do FeCl_3 , e do azul para laranja/vermelho no ensaio CAS (Figura 3).

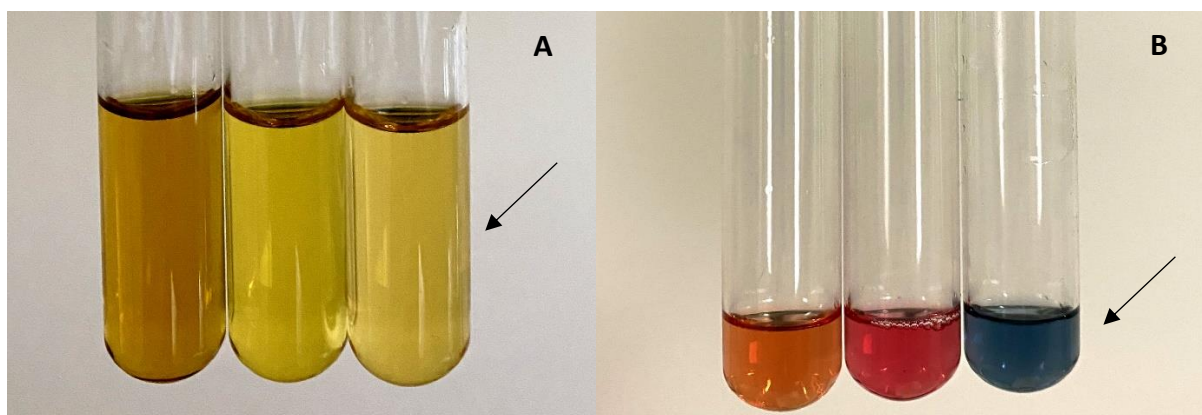


FIGURA 3. A) Teste qualitativo de FeCl_3 executado nas amostras de *A. niger* FS1 (esquerda), *A. niger* ATCC 1015 (centro) e controle (direita). B) Ensaio qualitativo de Cromo Azurol Sulfonato (CAS) aplicado nas amostras de *A. niger* FS1 (esquerda), *A. niger* ATCC 1015 (centro) e controle (direita).

A análise quantitativa da produção de sideróforos em meio líquido foi avaliada segundo método CAS proposto por Schwyn e Neilands (1987). Houve diferença significativa entre os isolados de *A. niger* na produção de sideróforos pelo teste F a nível de 1% de probabilidade, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (Figura 4). O isolado FS1 foi superior ao isolado ATCC 1015 apresentando concentração de sideróforos 2,7 vezes a mais, após 15 dias de incubação.

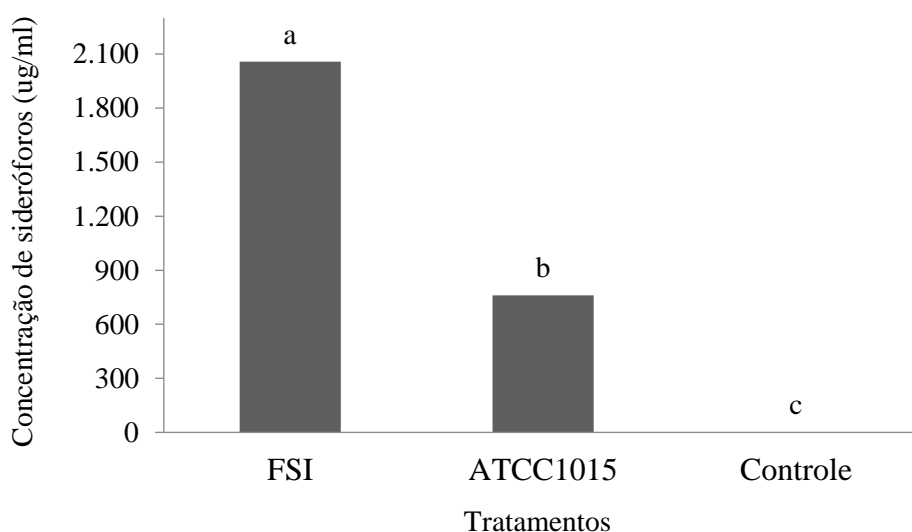


FIGURA 4. Produção de sideróforos de diferentes isolados do fungo *Aspergillus niger* comparados pelo teste de Tukey a nível de 1% de significância.

Também foi utilizado o teste de médias Tuckey a 1% de significância para comparar a produção da enzima fosfatase pelos isolados FS1 e ATCC 1015 em meio líquido através do método quantitativo do *p*-nitrofenol fosfato proposto por Tabatabai e Bremner (1969). O isolado FS1 foi superior ao isolado ATCC 1015 liberando 7,19 ng *p*-NPP/ml, em pH 6,5 (Figura 5).

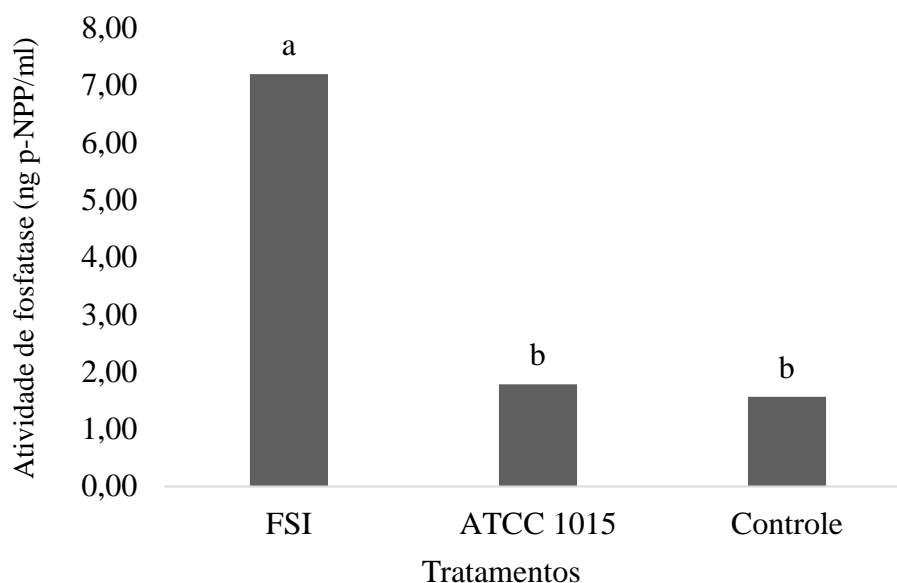


FIGURA 5. Produção de fosfatase de diferentes isolados do fungo *Aspergillus niger* comparados pelo teste de Tuckey a nível de 1% de significância.

Não houve diferença entre o isolado ATCC 1015 (1,78 ng p-NPP/ml) e o tratamento controle (1,57 ng p-NPP/ml) o que evidencia que o isolado não possui capacidade de sintetizar a enzima.

Os isolados FS1 e ATCC1015 não apresentaram evidência na produção da enzima ACC deaminase nas condições avaliadas.

4 DISCUSSÃO

O uso de microrganismos benéficos na agricultura se torna cada vez mais frequente, sendo uma estratégia sustentável se comparada ao uso de fertilizantes e pesticidas químicos na agricultura (LUBNA et al., 2018). Isolados do fungo *A. niger* FS1 e ATCC 1015 foram investigados com o intuito de identificar a capacidade desses isolados quanto à produção de sideróforos e enzimas fosfatase e ACC deaminase sendo esses aspectos relevantes no ponto de vista agrícola.

Já foi comprovada capacidade do gênero *Aspergillus* na produção de sideróforos, principalmente do tipo hidroxamato e carboxilato (GALEANO et al., 2021; NARAYANAN et al., 2022; GOSH; BANERJEE; SENGUPTA, 2017; PERCORARO et al., 2022). Essas

investigações reiteram a capacidade desse fungo na promoção indireta de crescimento da planta, visto que os sideróforos desempenham papel crucial como agente de biocontrole de fitopatógenos provocando impactos positivos como aumento da sanidade da planta proporcionando maior tolerância ao desenvolvimento de doenças (LUBNA et al., 2018). No presente estudo, a detecção de sideróforos do tipo hidroxamato foi investigada. Os resultados evidenciaram que os isolados de *A. niger* FS1 e ATCC 1015 foram capazes de sintetizar sideróforo hidroxamato.

Esses resultados condizem com os resultados de Galeano e colaboradores (2021), que relataram que o fungo *A. niger* produziu sideróforos em meio líquido após 5 e 10 dias sendo 23 e 88% de unidades de sideróforos produzidas, respectivamente. Da mesma forma El-Mahdy, Mohamed, Mogazy (2021) e Lubna e colaboradores (2018), relataram produção de sideróforos pelo *A. niger* em meio sólido, através da formação de um halo alaranjado ao redor da colônia fúngica.

A produção de fosfatase pelos fungos é um atributo crucial na ciclagem de P do solo, o tornando disponível para as plantas. Visto que o P é um macronutriente requerido em grandes quantidades e interfere diretamente no crescimento e desenvolvimento da planta, o uso de fungos que sintetizam fosfatase pode ser uma abordagem promissora, visto que seu uso reflete positivamente na redução da utilização de fertilizantes, bem como aumentam a disponibilidade de P do solo através do processo de mineralização (BAKRI, 2019).

A presente investigação evidenciou que apenas o isolado FS1 de *A. niger* apresentou atividade da enzima fosfatase. Esse resultado indica que esse isolado de *A. niger* pode ser utilizado para formulação de biofertilizantes visando a mineralização de fosfato no solo. Resultados semelhantes foram relatados anteriormente por Bakri (2019); Galeano et al. (2021) e Solhtalab; Klein; Aristilde (2021) em que isolados de *A. niger* apresentaram alta capacidade de liberar P por meio de fontes orgânicas.

A sua alta capacidade em mineralizar fosfato no solo está diretamente correlacionada com a síntese da enzima fosfatase. A fosfatase realiza papel relevante na reciclagem de P, pois promove a desintegração de ésteres de fosfato, liberando íons fosfato $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} , o que constitui a forma absorvível de P pelas raízes das plantas (LOPES, 1998). A liberação de *p*-nitrofenol através da hidrólise do substrato *p*-nitrofenil evidencia a presença dessa enzima (TABATABAI; BREMNER, 1969). Pesquisadores como Galeano et al. (2021); Hidayat;

Eriksen; Wiebe (2006) e Nahas (2015) descreveram uma quantidade significativa da atividade de fosfatase ácida em outros isolados de *A. niger*, o que indica seu potencial uso em formulações.

Além de apresentar alta capacidade na síntese de enzimas e compostos orgânicos, esse isolado pode apresentar habilidades que atuam direta ou indiretamente na promoção de crescimento das plantas. Já foi relatado aumento nos parâmetros de crescimento vegetativo em hortaliças (MUNDIM; MACIEL; MENDES, 2022; SILVA et al., 2022); mudas de café (ARAÚJO et al., 2020); arroz (LUBNA et al., 2018) e feijão (GALEANO et al., 2021) inoculados com o *A. niger*. O efeito promotor de crescimento de plantas pelo *A. niger* pode estar associado à sua alta capacidade em solubilizar e mineralizar os fosfatos presentes no solo, aumentando gradativamente a quantidade de P disponível para a planta e induzindo seu desenvolvimento.

No presente estudo, os isolados de *A. niger* FS1 e ATCC 1015 não apresentaram capacidade de produzir a enzima ACC deaminase. Por outro lado, foi demonstrada por Galeano e colaboradores (2021) a capacidade do isolado *A. niger* 9-P na produção dessa enzima, utilizando a mesma metodologia do presente estudo. Os resultados dessa investigação referente a atividade das enzimas fosfatase e ACC deaminase evidenciam que os isolados estudados pertencem a mesma espécie, porém apresentam particularidades, instigando a busca por novas investigações, visto que existem poucos relatos que descrevem a síntese dessas enzimas por fungos do gênero *Aspergillus*.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados revelam que os isolados de *A. niger* investigados são microrganismos multifuncionais, por apresentarem habilidades na solubilização de P no solo, síntese da enzima fosfatase e atividade de produção de sideróforos. O *A. niger* FS1 e ATCC 1015 apresentaram resultados promissores para produção de sideróforos. O isolado FS1 se mostrou eficiente na síntese da enzima fosfatase. Esses resultados contribuem para aplicação do *A. niger* em áreas agrícolas, visto que seu uso pode promover o biocontrole de fitopatógenos atuando indiretamente na promoção de crescimento da planta, além de ser microrganismo promissor para o desenvolvimento de biofertilizantes. Ambos os isolados propostos não promoveram a síntese da enzima ACC deaminase. No entanto, sugere-se que novas investigações sejam

realizadas com o intuito de avaliar o desempenho desses isolados na produção de outras enzimas e metabólitos de interesse agrícola.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, M. R. et al. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. **Genome Research**, v. 21, n. 6, p. 885–897, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.112169.110>.
- ARAÚJO, V. C. et al. Enhanced growth in nursery of coffee seedlings inoculated with the rhizosphere fungus *Aspergillus niger* for field transplantation. **Rhizosphere**, v. 15, p. 1–4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100236>.
- BAAKZA, A. et al. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 311, n. 1, p. 1–9, 5 nov. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.028>.
- BAKRI, M. M. Tri-Calcium and Zinc Phosphates Solubilization by *Aspergillus niger* and Its Relation to Organic Acids Production. **BioNanoScience**, v. 9, n. 2, p. 238–244, 15 jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12668-019-0604-1>.
- CHALFOUN, S. M. et al. Selection of fungal isolates with potential for phosphate solubilization and formulation of inoculant for coffee crops. **Coffee Science**, v. 14, n. 3, p. 315–325, 2019. DOI: <https://doi.org/10.25186/cs.v14i3.1583>.
- CHOUDHURY, M. J. A.; TREVELYAN, P. M. J.; BOSWELL, G. P. Mathematical modelling of fungi-initiated siderophore-iron interactions. **Mathematical Medicine and Biology**, v. 37, n. 4, p. 515–550, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/imammb/dqaa008>.
- COSTA, J. M.; LOPER, J. E. Characterization of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 7, n. 4, p: 440–448, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-7-0440>.
- EL-MAHDY, O. M.; MOHAMED, H. I.; MOGAZY, A. M. Biosorption effect of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysosporium* for Cd- and Pb-contaminated soil and their physiological effects on *Vicia faba* L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 67608-67631, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15382-4>.
- ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 225-246, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>.
- GALEANO, R. M. S. et al. Plant growth promoting potential of endophytic *Aspergillus niger* 9-p isolated from native forage grass in Pantanal of Nhecolândia region, Brazil. **Rhizosphere**, v. 18, p. 2452–2198, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100332>.

- GARGOVA, S.; SARIYSKA, M. Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 231-235, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00247-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00247-8).
- GHOSH, S. K.; BANEERJE, S.; SENGUPTA, C. Bioassay, characterization and estimation of siderophores from some important antagonistic fungi. **Journal of Biopesticide**, v. 10, n. 2, p. 105-112, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.57182/jbiopestic.10.2.105-112>.
- GRIMM, P. W.; ALLEN, P. J. Promotions by microorganisms in formation of cytochromes in *Ustilago sphaerogena*. **Plant Physiol**, v. 29, n. 4, p. 369–377, 1954.
- HIDAYAT, B. J.; ERIKSEN, N. T.; WIEBE, M. G. Acid phosphatase production by *Aspergillus niger* N402A in continuous flow culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 2, p. 324–331, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00045.x>.
- KALAYU, G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, p. 7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>.
- KUMARI, P. et al. Characterization of functionality traits of plant growth promoting rhizobacteria antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*. *Pl. Dis. Res.*, v. 28, n. 1, p. 11-15, 2013.
- LOPES, A. S. **Manual internacional de fertilidade do solo**. ed. 2, p. 177. Piracicaba: Associação Brasileira da Potassa e do Fosfato, 1998.
- LUBNA, A. S. et al. *Aspergillus niger* CSR3 regulates plant endogenous hormones and secondary metabolites by producing gibberellins and indoleacetic acid. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 100–111, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1436199>.
- MARTINS, M. E. G. Coeficiente de determinação. **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 1, 2018. DOI: <http://doi.org/10.24927/rce2018.024>.
- MENDES, G. O. et al. Fermentation liquid containing microbially solubilized P significantly improved plant growth and P uptake in both soil and soilless experiments. **Applied Soil Ecology**, v. 117–118, p. 208–211, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.05.008>.
- MENDES, G. O. et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 239–249, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>.
- MENDES, G. O. et al. Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. **Microbial Biotechnology**, v. 8, p. 930–939, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12289>.
- MESSINGER, A. J. M.; RATLEDGE, C. **Siderophores**. v. 3, p. 275-294, 1985.
- MUNDIM, G. DE S. M.; MACIEL, G. M.; MENDES, G. DE O. *Aspergillus niger* as a Biological Input for Improving Vegetable Seedling Production. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040674>.

NARAYANAN, M. M. et al. The role of endophytes in combating fungal and bacterial induced stress in plants. **Molecules**, v. 27, n. 19, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27196549>.

NAHAS, E. Control of acid phosphatases expression from *Aspergillus niger* by soil characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 5, p. 658–666, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132015050485>.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987.

NEILANDS, J. B. Microbial iron compounds. **Rev. Biochem.** v. 50, p. 715–731, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.50.070181.003435>.

PERCORARO, L. et al. Biosynthesis Pathways, Transport Mechanisms and Biotechnological Applications of Fungal Siderophores. **Journal of fungi**, v. 8, n.21, p. 1-28, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof8010021>.

PRIYA, P. et al. Comparative proteomic analysis of saline tolerant, phosphate solubilizing endophytic *Pantoea* sp., and *Pseudomonas* sp. isolated from *Eichhornia* rhizosphere. **Microbiological Research**, v. 265, p. 1–13, 1 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127217>.

SAHA, M. et al. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 3984–3999, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>.

SHIEH, T. R.; WARE, J. H. Survey of Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase. **Applied microbiology**, v. 16, n. 9, p. 1348-1351, 1968. DOI: <https://doi.org/10.1128%2Fam.16.9.1348-1351.1968>.

SILVA, P. V. et al. Field evaluation of the effect of *Aspergillus niger* on lettuce growth using conventional measurements and a high-throughput phenotyping method based on aerial images. **Plos One**, v. 17, n. 9, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274731>.

SOLHTALAB, M.; KLEIN, A. R.; ARISTILDE, L. Hierarchical reactivity of enzyme-mediated phosphorus recycling from organic mixtures by *aspergillus niger* phytase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 7, p. 2295–2305, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05924>.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, n. 4, p. 301-307, 1969. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1).

TOJU, H. et al. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. **Nature Plants**, v. 4, p. 247–257, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0139-4>.

TRIVEDI, P. et al. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 607-621, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>.

VITERBO, A. et al. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. **FEMS Microbiology Letters**, v. 305, n. 1, p. 42–48, abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01910.x>.

WANG, X. et al. Isolation and characterization of phosphofungi and screening for plant growth-promoting activities. **AMB Express**, v. 8, n.1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0593-4>.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1061-1070, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1061-1070.1999>.