



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

BRUNO ROGÉRIO DE SOUZA

CRESCIMENTO INICIAL DE *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (GUANANDI)

TRATADO COM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E BACTÉRIAS

POTENCIALMENTE PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

BRASÍLIA/DF, AGOSTO DE 2019.

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **Bruno Rogério de Souza**, matrícula nº **15/0101996**, intitulada “*Crescimento inicial de Calophyllum brasiliense CAMBESS (guanandi) tratado com substâncias húmicas e bactérias potencialmente promotoras do crescimento vegetal*”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 30 de agosto de 2019.

Prof. Dr. Jader Galba Busato Presidente
de Banca (FAV / UnB)

Prof. Dr. Fernando Fabriz Sodré Membro
Titular (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Alessandra Monteiro de Paula Membro
Titular(UnB)

Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss Membro
Titular (UFVJM)

Dr. Juscimar da Silva Membro
Suplente(CNPH/Embrapa)

Em 30 de agosto de 2019.

(61) 3107-3805

posgiq@unb.br

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre foram minha fortaleza. A real razão da minha felicidade e gratidão, Sr. Mateus e Dona Rosa a quem tanto amo...

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora da Piedade, Padroeira de Felixlândia – MG, pela benção alcançada neste caminho árduo.

Ao professor, Jader Galba Busato, que auxiliou e apoiou-me muito nesses anos.

Aos meus amigos de luta diária, Damiana, Victor, Jackeline, Jéssica e Samira, pessoas que muito contribuíram com abraços, laboratórios, reagentes e o principal: “exemplo de como ser vencedor”, amo vocês!

Aos sempre sorridentes que me disseram “muita calma nessa hora”, Marcelo e Joyce, vocês foram de grande ajuda.

Aos amigos do AQQUA, Hadassa, Milena, Angélica, Gabriel e Caçula com muito café e sorrisos.

Minha irmã maravilhosa, Francielle Cristina, você sabe o quanto sou grato por tudo em minha vida e o Sr. Rafael que muita fome conosco compartilhou no laboratório.

Aos meus avós: Antônio e Enedina, por cada gesto de carinho durante essa jornada.

Às professoras: Rosângela Ramires e Eliane Camargos Borba, por serem minhas referências profissionais inspiradoras na Biologia.

Aos melhores amigos que me fizeram crescer na luta, suor e de forma coerente: Magno Araújo, Ana Paula dos Santos, Ana Paula Gonçalves (*in-memoriam*), Luciana de Jesus.

À pessoa que muito contribuiu após a jornada lançada, hora com 50%, hora com 90%, às vezes 10%, mas foi fundamental para meu sucesso. Obrigado, Gabriel Henrique de Souza!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) que viabilizou a condução do trabalho a partir do financiamento obtido por meio do projeto “Indução do crescimento de espécie florestal com ocorrência nativa no Cerrado pelo uso de bioinsumo à base de substâncias húmicas e microrganismos” (Edital MCTI/Cnpq 14/2014; processo número 454787/2014-6).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

CRESCIMENTO INICIAL DE *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (GUANANDI) TRATADO COM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

RESUMO - Sistemas agrofloretais (SAFs) têm sido apontados como capazes de garantir a preservação de diferentes compartimentos ambientais e a oferta de produtos agrícolas. *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (guanandi) é uma espécie arbórea com ocorrência no Cerrado de interesse para o desenvolvimento de (SAFs) e a produção de mudas sadias e vigorosas desta espécie depende do uso de insumos, os quais devem ser produzidos a partir de fontes renováveis e de baixo custo de produção. Dentre estes, as substâncias húmicas (SH) e os inoculados microbianos (IM) têm sido estudados como potenciais agentes de desenvolvimento vegetal, mas ainda pouco explorados para a produção de mudas de espécies arbóreas. O presente trabalho teve como objetivos: avaliar os efeitos da adição de SH extraídas com NaOH (ácidos húmicos - AH) ou água quente (extrato húmico solúvel em água - EHSA) no desenvolvimento de mudas de guanandi em conjunto com bactérias. Realizou-se: a) O isolamento e a identificação de bactérias potencialmente promotoras de crescimento vegetal em estruturas da própria espécie vegetal, e também a rizosfera, em plantas oriundas de povoamentos florestais já existentes; b) Verificar se o uso combinado dos materiais húmicos e das bactérias isoladas altera o perfil de desenvolvimento de mudas de guanandi durante a fase de viveiro. Os testes de prospecção demonstraram um total de 31 isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio. Dentre esses, 28 solubilizaram fósforo e, 25, o zinco. O isolado, pertencente ao gênero *Pseudomonas*, apresentou o maior valor de fósforo solubilizado ($100,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) e foi o mais promissor para a produção de AIA ($0,52 \mu\text{g mL}^{-1}$) e solubilização de zinco ($147,8 \mu\text{g mL}^{-1}$). O gênero *Enterobacter* apresentou valor de solubilização de zinco ($147,7 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados obtidos mostraram a presença de uma grande diversidade de bactérias benéficas associadas a *Calophyllum brasiliense* Cambess, que podem ser exploradas como inoculantes microbianos na agricultura. Após a aplicação de IM+AH, a parte aérea e raiz apresentaram, respectivamente, um aumento médio de 35,77% e 54,81% da massa seca em comparação ao controle. O IM+EHSA apresentaram 10 e 16% mais massa seca e número de raízes laterais respectivamente em comparação com o tratamento controle. Com relação ao diâmetro do caule, houve um aumento de 21,76% da massa seca para o tratamento AH. O tratamento IM obtido a partir da rizosfera e de estruturas vegetais do guanandi acarretou deficiência hídrica nas mudas, reduzindo em 27,94% a quantidade de água, quando comparadas ao controle. Com relação da eficiência do uso da água (EUA), todos os parâmetros associados às trocas gasosas, o tratamento AH foi o que apresentou os melhores valores. É possível afirmar que a combinação do efeito de promoção do crescimento biométrico característico das SH com a inoculação de bactérias foi favorável, estimulando assim o uso de bioestimulante a base bactérias e SH em sistemas agrofloretais.

Palavras-chave: Bioestimulantes vegetais; Agrofloresta; Efeitos fisiológicos; Promoção do crescimento vegetal.

EARLY GROWTH OF *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (GUANANDI) TREATED WITH HUMIC SUBSTANCES AND POTENTIALLY PROMOTING BACTERIA OF VEGETABLE GROWTH

ABSTRACT - Agroforestry systems (SAFs) have been pointed as capable of guaranteeing the preservation of different environmental compartments and the supply of agricultural products. *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (guanandi) is a tree species that occur in the Cerrado of interest for the development of SAFs and the production of healthy and vigorous seedlings of this species depends on the use of inputs, which must be produced from renewable sources. Low cost of production. Among these, humic substances (SH) and microbial inoculated (IM) have been studied as potential agents of plant development, but still little explored for the production of seedlings of tree species. The present work aimed to evaluate the effects of the addition of SH extracted with NaOH (humic acids - AH) or hot water (water-soluble humic extract - EHSA) on the development of guanandi seedlings together with bacteria. (a) the isolation and identification of potential plant growth-promoting bacteria in structures of the plant species itself, and also the rhizosphere in plants from existing forest stands; (b) Verify that the combined use of humic materials and isolated bacteria alters the development profile of guanandi seedlings during the nursery phase. Prospecting tests showed a total of 31 isolates of nitrogen-fixing bacteria. Of these, 28 solubilized phosphorus and 25 zinc. The isolate, belonging to the genus *Pseudomonas*, presented the highest value of solubilized phosphorus ($100,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) and was the most promising for the production of IAA ($0,52 \mu\text{g mL}^{-1}$) and zinc solubilization ($147,8 \mu\text{g mL}^{-1}$). The genus *Enterobacter* presented a zinc solubilization value ($147,7 \mu\text{g mL}^{-1}$). The results showed the presence of a large diversity of beneficial bacteria associated with *Calophyllum brasiliense* Cambess, which can be exploited as microbial inoculants in agriculture. After the application of IM +AH, the shoot and root presented, respectively, an average increase of 35,77% and 54,81% of the dry mass compared to the control. The IM + EHSA presented 10 and 16% more dry mass and number of lateral roots respectively compared to the control treatment. Regarding stem diameter, there was a 21,76% increase in dry mass for AH treatment. The IM treatment obtained from the rhizosphere and plant structures of guanandi caused water deficit in the seedlings, reducing by 27,94% the amount of water when compared to the control. Regarding the efficiency of water use (WUA), all parameters associated with gas exchange, the AH treatment presented the best values. It is possible to state that the combination of the characteristic biometric growth-promoting effect of SH with bacterial inoculation was favorable, thus stimulating the use of biostimulant bacteria and SH in agroforestry systems.

Keywords: Plant Biostimulants; Agroforestry; Physiological effects; Promotion of plant growth.

SUMÁRIO

1.PRIMEIRA SEÇÃO	9
1.1 INTRODUÇÃO.....	9
2. SEGUNDA SEÇÃO: Artigos.....	23
2.1 ARTIGO 1 - Triagem de bactérias benéficas associadas ao <i>Calophyllum brasiliense</i> CAMBESS, de modo a desenvolver inoculantes microbianos para a agricultura.....	23
2.2 ARTIGO 2 – Efeito de bioestimulantes vegetais sobre o desenvolvimento inicial de mudas de <i>Calophyllum brasiliense</i> CAMBESS	52

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina difosfato
AH	Ácidos húmicos
AIA	Ácido indolacético
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Enzima H ⁺ ATPase
<i>C.brasiliense</i>	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess
CPA	Comprimento parte aérea
CRP	Comprimento raiz principal
DC	Diâmetro do caule
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRP	Diâmetro raiz principal
DYGS	Dextrose yeast glucose sucrose
<i>e.g.</i>	Elevado valor agregado
EHSA	Extrato húmico solúvel em água
IAF	Índice de área foliar
IHSS	Sociedade internacional de substâncias húmicas
K	Potássio
MFA	Massa fresca aérea
MFR	Massa fresca raiz
MAS	Massa seca aérea
MPCV	Microrganismos promotores de crescimento vegetal
MSR	Massa seca raiz
N ₂	Nitrogênio atmosférico
NCBI	Centro nacional de informações biotecnológicas
NF	Número de folhas
NMP	Número mais provável
NRL	Número de raiz lateral
P	Fósforo
PCR	“Polimerase chain reaction” (reação em cadeia da polimerase)
Ppm	Parte por milhão
SAFs	Sistemas agroflorestais
SH	Substâncias húmicas
UFC	Unidade formadora de colônia

1.PRIMEIRA SEÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

A influência do homem como agente de modificação do ambiente foi intensa nas últimas décadas, o que resultou em uma transformação acentuada da paisagem natural do planeta. As áreas florestais nativas foram particularmente afetadas em função da sua substituição por sistemas agrícolas e pecuários com objetivo de ampliar a oferta de alimentos e outros produtos de origem vegetal e animal. Apesar da maior produção, a destruição e/ou deterioração da qualidade das fontes de água doce, a erosão dos solos, o desaparecimento de espécies vegetais e animais foram acentuados (FUNASA, 2014). Muitos cientistas também afirmam que a substituição de áreas florestais por monocultivos agrícolas seja responsável por parte das alterações climáticas que culminaram, ou tem influenciado, no aquecimento do planeta (MMA, 2018).

O Brasil é um exemplo típico da interferência humana na paisagem natural. Tradicionalmente, o país é um grande fornecedor de matéria-prima florestal, com concomitante reocupação das áreas de vegetação nativa para a produção agropecuária. O Cerrado brasileiro, bioma extremamente rico em diversidade de vida, é considerado uma das últimas fronteiras agrícolas e tem sofrido alterações severas nas últimas décadas. Ocupando uma área original de aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados (EITEN,1993; RATTER et al.,1996), o Cerrado apresenta-se hoje com áreas florestais nativas bastante fragmentadas que representam somente 20% da vegetação original (MACHADO et al., 2004; FELFILI et al., 2005; OLIVEIRA, 2015). Como efeito, grande parte da sua diversidade tem sido perdida (para uma revisão mais abrangente sobre o assunto sugere-se o artigo “*A conservação do Cerrado*”, de KLINK e MACHADO (2005),

o que, na prática, representa enormes prejuízos ambientais, científicos, econômicos e culturais.

A substituição de florestas nativas por áreas agricultadas ocasiona a ruptura de um sistema integrado de reciclagem baseado na absorção de elementos e compostos químicos provenientes dos solos e da atmosfera pelas plantas, síntese de biomoléculas orgânicas e restituição destes ao ambiente por meio da liberação de resíduos e exsudatos. Com a destruição desse ciclo, a qualidade do solo é afetada negativamente, principalmente devido à destruição da matéria orgânica, componente fundamental para a sustentabilidade em solos de baixa fertilidade natural (SILVA et al., 2016; MEW et al., 2018). Para minimizar os impactos negativos da degradação da matéria orgânica após a remoção das florestas, a agricultura utiliza grandes quantidades de fertilizantes solúveis como os superfosfatos, o sulfato de amônio e o cloreto de potássio, na tentativa de garantir produtividades satisfatórias.

A dependência desse tipo de insumo é encarada, entretanto, como insustentável por grande parte dos cientistas que se ocupam do tema, uma vez que muitos desses fertilizantes são produzidos a partir de fontes não renováveis em escala humana, tais como os fosfatos naturais, com possibilidade de esgotamento das jazidas num período de tempo não muito longo (CORDELL et al., 2009). Além disso, há uma grande demanda por energia fóssil no processo de obtenção desses fertilizantes, que também podem aumentar a salinidade dos solos, a eutrofização de cursos d'água e a emissão de gases promotores do efeito estufa (HOBEN et al., 2011; NOVOTNY, 2011).

Sob as perspectivas econômica e social para o Brasil, há também severas críticas quanto à dependência externa de fertilizantes industrializados solúveis para garantir a oferta

de produtos vegetais. Em geral, 75% do nitrogênio, 50% do fósforo e 90% do potássio aplicados como fertilizantes são importados (ANDA, 2019), o que encarece os produtos e os torna inacessíveis para a grande parte dos agricultores brasileiros. As importações de fertilizantes intermediários alcançaram em dezembro de 2018 a quantidade de 2.629 milhões de toneladas, indicando aumento de 18,6% nas importações em relação ao mesmo período de 2017 (ANDA, 2019).

Os avanços ocorridos nas últimas décadas, visando suprir a demanda mundial por produtos vegetais, não podem ser negligenciados, mas as condicionantes sociais, ambientais e econômicas indicam a necessidade de alteração das formas de cultivo e criação. Nesse sentido, muitas práticas têm sido apontadas como capazes de garantir a produção de alimento e, ainda, promover a conservação da qualidade do ambiente. Dentre essas práticas, os sistemas agroflorestais (SAFs) apresentam um potencial ainda pouco explorado no Cerrado brasileiro, apesar dos muitos aspectos favoráveis de sua adoção. Os SAFs baseiam-se no emprego associado de espécies florestais com outras plantas de interesse agrícola em uma mesma área (MACHADO et al., 2004) A implementação destes sistemas permite ciclos de crescimento de culturas muito mais diversificado e estruturado que os sistemas de monocultivo, ampliando a capacidade desse ambiente de suportar as modificações impostas pelas práticas agrícolas, proporcionando assim uma constante renovação nos ciclos de crescimento das espécies exploradas (MORENO e OBRADOR, 2007).

Nos SAFs, observa-se o uso eficiente de recursos naturais em função do maior aproveitamento da energia solar, da água e dos nutrientes, permitindo uma redução significativa da necessidade de aplicação de fertilizantes solúveis (MORENO e

OBRADOR, 2007; MARINHO et al., 2014). O acúmulo de biomassa e de carbono no solo favorece a atividade de microrganismos responsáveis pela ciclagem de nutrientes, reduzem a emissão de gases promotores de efeito estufa para a atmosfera (KHANNA, 1997; HERGOUALC'H et al., 2012). Além disso, a qualidade da matéria orgânica é alterada, com acúmulo de formas lábeis e redução de estruturas recalcitrantes de carbono (MARINHO et al., 2014). A presença das árvores diminui a ocorrência de processos erosivos, aumentando a qualidade dos recursos hídricos (CANNAVO et al., 2011). Economicamente, as árvores introduzidas também podem ser fonte de renda a partir da sua exploração sustentada, possibilitando a ampliação da renda do agricultor.

O passo inicial para a implantação de SAFs é a seleção das espécies a serem utilizadas. Essa seleção leva em consideração a experiência do produtor com as espécies, a capacidade de adaptação edafoclimática das plantas, de sobrevivência e produção no sistema, além do retorno econômico potencial. Para a região do Cerrado, a espécie florestal *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (guanandi) vem ganhando destaque devido à possibilidade de retorno financeiro considerável e habilidade vigorosa de crescimento em áreas degradadas (LORENZI, 1998; BUSATO et al., 2016). Apresenta potencialidades para uso como fonte de madeira para construção civil, naval e de móveis finos; produção de fitoterápicos e aplicação ornamental (SANTA-CECÍLIA et al., 2011; BUSATO et al., 2016). O conjunto desses benefícios torna o guanandi uma espécie florestal interessante para a implantação de SAFs no Cerrado, mas a sua exploração, nesse sentido, assim como os resultados de pesquisa envolvendo a espécie, ainda são escassos.

Um segundo aspecto associado à implantação de SAFs relaciona-se à obtenção de mudas de qualidade. A perspectiva de desenvolvimento sustentado requer que os insumos

empregados para a produção das mudas tenham origem renovável. Também é requisito que esses insumos venham afetar positivamente o crescimento das plantas, reduzindo a possibilidade de estresse sofrido, após o plantio do viveiro para a área definitiva. Esta etapa é extremamente sensível e pode significar o fracasso ou sucesso do empreendimento. As substâncias húmicas (SH) são compostos naturais obtidos de solos, sedimentos e resíduos orgânicos que podem ser utilizados como bioestimulantes do crescimento vegetal (CONCEIÇÃO et al., 2009; BALDOTTO et al., 2010; BUSATO et al., 2016). Usualmente, os trabalhos que abordam o papel das SH como estimulante do crescimento vegetal utilizam a fração húmica denominada ácidos húmicos (AH), obtida após extração com solução alcalina (NaOH) seguida de acidificação do meio até pH 1,0-1,5. Entretanto, muitos efeitos fisiológicos também foram reportados em plantas cultivadas sob aplicação de extrato húmico solúvel em água (EHSA) (PINTON et al., 1998; BUSATO et al., 2016; ZANIN et al., 2019). As frações húmicas mais eficientes, as doses, a forma de extração, o tipo de planta afetada, os principais efeitos observados, entre outros, são algumas das informações que ainda merecem ter seu estudo aprofundado especialmente em espécies florestais.

Outro insumo agrícola renovável capaz de auxiliar o crescimento das plantas, mas que ainda é pouco explorado para espécies florestais nativas, diz respeito aos microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV). Vários grupos microbianos podem associar-se às plantas e afetar de maneira diferenciada a vida do vegetal, suas características genótípicas e fenotípicas (BEATTIE, 2006). Esses microrganismos podem estimular o crescimento da planta através de efeitos biofertilizantes e bioestimulantes, acarretando aumento da resistência a doenças e melhor condicionamento da planta aos

estresses ambientais (STURZ e NOWAK, 2000; BALDOTTO et al., 2010; EMBRAPA, 2016). Um exemplo conhecido da interação planta-microrganismo é o que envolve a fixação de nitrogênio atmosférico (N_2), pela associação de espécies leguminosas e bactérias diazotróficas, endofíticas entre outras que habitam a rizosfera . Atualmente, entretanto, reconhece-se que diversas outras atividades metabólicas e fisiológicas das plantas estão em consonância com a vida dos microrganismos (EMBRAPA, 2016). Por exemplo, a produção de ácidos orgânicos e agentes quelantes por microrganismos que habitam o ambiente rizosférico pode auxiliar a solubilização de fosfato e zinco, aumentando a sua disponibilidade aos vegetais (KLOEPPER et al., 1980; ADESEMOYE et al., 2010; YU et al., 2012). Os microrganismos podem também ser fonte de fitohormônios vegetais, tais como o ácido indol acético (AIA), principal auxina encontrada nas plantas (BALDOTTO et al., 2010), além de aumentar a taxa fotossintética das plantas (ZHANG et al., 1996; BALDOTTO et al., 2010).

A identificação e uso de MPCV apresentam-se como uma nova fronteira para o desenvolvimento de insumos biológicos renováveis. Para espécies de interesse agrícola, há um grande número de trabalhos que já se encontra disponível na literatura científica (KLOEPPER et al., 1980; ADESEMOYE et al., 2010; BALDOTTO et al., 2010; YU et al., 2012; EMBRAPA, 2016). Para espécies florestais nativas de Cerrado, que representam potencial para o desenvolvimento de SAFs, mas que ainda não passaram por programas específicos de melhoramento ou que não se enquadram dentro de um contexto associado às *commodities*, há ainda um longo caminho a ser percorrido para o desenvolvimento desses tipos de insumo. Essa comprovação passa, inicialmente, pela prospecção de microrganismos em áreas já ocupadas pelas plantas de interesse; pela identificação desses

microrganismos e pela realização de teste de crescimento com plantas. Isso ocorre porque há uma integração íntima entre microrganismo e hospedeiro resultante da elevada especificidade existente entre eles (BALDOTTO et al., 2010). Em outras palavras, as plantas já possuem um conjunto de microrganismos associados às suas estruturas (internas ou externas) que é específico (YU et al., 2012; EMBRAPA, 2016) e precisa ser previamente identificado antes dos testes de campo.

Alguns estudos envolvendo a manipulação associada de MPCV e SH, visando o desenvolvimento acelerado dos vegetais, têm sido realizados e demonstraram que, quando aplicados conjuntamente, apresentam maior eficiência do que quando isolados (CONCEIÇÃO et al., 2009; MARQUES JÚNIOR et al., 2008; BALDOTTO et al., 2010; LIMA et al., 2014; OLIVARES et al., 2015; AGUIAR et al., 2016). Utilizando bactéria diazotrófica do gênero *Burkholderia* em conjunto com ácidos húmicos (AH) BALDOTTO et al. (2010), verificaram que a interação promoveu resultados superiores ao observado em cada fator isolado (bactéria ou AH) em abacaxi cultivado *in vitro*. Resultados semelhantes foram observados no enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar a partir da adição de bactéria diazotrófica e AH extraídos de vermicomposto (MARQUES JÚNIOR et al., 2008). A comprovação da eficiência desta associação é importante para o desenvolvimento agrícola tecnológico, científico e social que pode estar à disposição de uma parcela grande de agricultores que não dispõe de recursos financeiros para a aquisição dos insumos atualmente em uso.

1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A ação combinada de SH e MPCV tem sido explorada como bioinsumo agrícola, sob a perspectiva de estimular o crescimento das plantas empregando-se materiais renováveis e de baixo custo. Grande parte dos trabalhos, entretanto, emprega espécies vegetais de ciclo curto, notadamente milho e hortaliças. A exploração florestal juntamente com espécies agrícolas, em SAFs, tem sido apontada como uma alternativa viável para geração e renda e preservação ambiental e a obtenção de mudas de alta qualidade, a partir do uso desse tipo de tecnologia (bioinsumos), pode ser importante e estratégica na implantação dos sistemas.

A presente tese de doutorado foi elaborada com a hipótese de que a adição de bioinsumo agrícola, constituído à base de SH e possíveis MPCV isolados de plantas ou solos já povoados com guanandi, altera o perfil estimulando o desenvolvimento de mudas dessa espécie durante a fase de viveiro. Especificamente, os objetivos almejados foram: (i) realizar a prospecção e identificação em nível molecular de bactérias com habilidade para fixar N_2 atmosférico, solubilizar fósforo e zinco e produzir ácido indol-acético (AIA) que estejam, associadas a plantas de guanandi; (ii) extrair e caracterizar AH de vermicomposto de esterco bovino, visando avaliar se sua aplicação, em conjunto ou não com as bactérias prospectadas, pode favorecer o crescimento das mudas de guanandi e (iii) extrair e caracterizar EHSA a partir de vermicomposto de esterco bovino e também avaliar se a sua aplicação, em conjunto ou não com as bactérias, favorece o crescimento das mudas de guanandi.

A tese foi dividida em dois artigos científicos. O primeiro deles intitulado “*Triagem de bactérias benéficas associadas ao Calophyllum brasiliense CAMBESS, de modo a desenvolver inoculantes microbianos para a agricultura*”. O trabalho foi originalmente publicado em inglês na revista *Plant Omics Journal*. Aqui é apresentada a sua tradução em português. Algumas das bactérias isoladas e caracterizadas no trabalho foram empregadas para a confecção do segundo artigo, intitulado “*Efeito de bioestimulantes vegetais sobre o desenvolvimento inicial de mudas de Calophyllum brasiliense CAMBESS*”. Neles, as bactérias selecionadas foram aplicadas em mudas de guanandi em conjunto, ou não, com AH e EHSA, avaliando-se a biometria das plantas, parâmetros associados a trocas gasosas (*e.g.*, eficiência de uso da água) e taxa de fotossíntese.

1.3 REFERÊNCIAS

Adesemoye, A. O. et al. Increased plant uptake of nitrogen from ¹⁵N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 46, n. 1, p. 54–58, 2010. doi: 10.1007/s00248-009-9531-y.

Aguiar, N. O. et al. Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. **Annals of Applied Biology**, v. 168, n. 2, p. 203–213, 2016. doi.org/10.1111/aab.12256.

ANDA, Associação nacional para difusão de adubos, 2019. Acesso em 13/05/2019, disponível em: <http://anda.org.br/arquivos/>.

Baldotto, L. E. B. et al. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 349–360, 2010. doi.org/10.1590/S0100-06832010000200008.

Beattie, G. Plant-associated bacteria. **Biomedical and Life Sciences**, p. 1–56, 2006.

Busato, J.G. et al. Efeito do extrato húmico solúvel em água e biofertilizante sobre o desenvolvimento de mudas de *Callophyllum brasiliense*. **Pesqui. Florest. Bras.** 36, 161, 2016. doi:10.4336/2016.pfb.36.86.1024doi:10.1007/978-1-4020-4538-7.

Cannavo, P. et al. Agroforestry associating coffee and *Inga densiflora* results in complementarity for water uptake and decreases deep drainage in Costa Rica. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 140, n. 1–2, p. 1–13, 2011. doi: 10.1016/j.agee.2010.11.005.

Conceição, P. M. DA et al. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1880–1883, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782009005000137.

Cordell, D. et al. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Global Environmental Change**, v. 19, n. 2, p. 292–305, 2009. doi:10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009.

Eiten, G. Vegetação do Cerrado. In: Novaes Pinto, M (org.). Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. **Universidade de Brasília**, 1993.

Embrapa, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Microrganismos das plantas auxiliam o vegetal e podem ser fontes de antibióticos. 2016. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/10456334/microrganismos-das-plantas-auxiliam-o-vegetal-e-podem-ser-fontes-de-antibioticos?link=agencia>>, acesso em 08/06/2019.

Felfili, J.M et al. Biodiversidade, ecologia e conservação do Cerrado: avanços no conhecimento. Savanas desafios e estratégias para o equilíbrio entre **Soc. agronegócio e Recur. Nat.** 25–44.2005.

Funasa, Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS. **Ministério da Saúde**. Fundação Nac. Saúde 1 ed., 112.2014.

Hergoualc'h, K. et al. Changes in carbon stock and greenhouse gas balance in a coffee (*Coffea arabica*) monoculture versus an agroforestry system with *Inga densiflora*, in Costa Rica. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 148, p. 102–110, 2012. doi: 10.1016/j.agee.2011.11.018.

Hoben, J. P. et al. Nonlinear nitrous oxide (N₂O) response to nitrogen fertilizer in on-farm corn crops of the US Midwest. **Global Change Biology**, v. 17, n. 2, p. 1140–1152, 2011. doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02349.x.

Khanna, P. K. **Nutrient cycling under mixed-species tree systems in southeast Asia Agroforestry Systems**, 1997. doi:10.1023/A:1005952410569.

Klink, C. A. e Machado, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005. doi:10.1590/S0100-69912009000400001.

Kloepper, J. W. et al. **Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria** *Nature*, 1980. doi:10.1038/286885a0.

Lima, Da S. L. et al. Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–18, 2014. doi.org/10.1186/s40538-014-0023-z.

Lorenzi, H. **Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

Machado, R. B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **International do Brasil**, p. 1–23, 2004. doi:10.1590/S0104-42302007000600013.

MMA, Ministerio do Meio Ambiente. Efeito Estufa e Aquecimento Global. **Meio Ambiente**. 2018. Disponível em:<C:\Users\Notebook\Downloads\Efeito Estufa e Aquecimento Global.html> acesso em 08/06/2019.

Marinho, E. B. et al. Organic matter pools and nutrient cycling in different coffee production systems in the Brazilian Cerrado. **Agroforestry Systems**, v. 88, n. 5, p. 767–778, 2014. doi:10.1007/s10457-014-9723-4.

Marques Júnior, R. B. et al. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1121–1128, 2008. doi:10.1590/S0100-06832008000300020.

Mew, M.C. et al. Phosphorus supply chain-scientific, technical, and economic foundations: A transdisciplinary orientation. **Sustain.** 10, 2018. doi:10.3390/su10041087.

Moreno, G.; Obrador, J. J. Effects of trees and understory management on soil fertility and nutritional status of holm oaks in Spanish dehesas. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, 2007. doi:10.1007/s10705-007-9089-3.

Novotny, V. The danger of hypertrophic status of water supply impoundments resulting from excessive nutrient loads from agricultural and other sources. **Journal of Water Sustainability**, v. 1, n. 1, p. 1–22, 2011. doi:10.11912/jws.1.1.1-22.

Oliveira, G.B. DE. O Novo Código Florestal e a Reserva Legal do Cerrado. Diss. mestrado. **Universidade de Brasília** 141 f.2015.

Olivares, F. L. et al. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. **Scientia Horticulturae**, v. 183, n. 1, p. 100–108, 2015. doi:10.1016/j.scienta.2014.11.012.

Pinton, R. et al. Pyrophosphate-extractable humic substances fractions as source of iron for Fe-deficient cucumber plants. **Biology Fertility Soils**, v. 26, p. p.23–27, 1998.

Ratter, J.A., et al. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation II: comparison of the woody vegetation of 98 areas. **Edinb. J. Botany**, p. 2:153-180, 1996.

Santa-Cecília, F. V. et al. **Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*** **Journal of Ethnopharmacology**, 2011. doi:10.1016/j.jep.2010.09.036.

Silva, D.D.E. da et al. Avaliação da degradação ambiental a partir da prática da cultura do feijão no município de Tavares-Pb. **Holos** **8**, 148.2016. doi:10.15628/holos, 2015.2063

Sturz, A. V.; Nowak, J. **Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops** *Applied Soil Ecology*, 2000. doi:10.1016/S0929-1393(00)00094-9.

Yu, X. et al. **Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut** *European Journal of Soil Biology*, 2012. doi:10.1016/j.ejsobi.2012.01.004.

Zanin, L. et al. Humic Substances Contribute to Plant Iron Nutrition Acting as Chelators and Biostimulants. *Front. Plant Sci.* 10, 675, 2019. doi:10.3389/fpls.2019.00675

Zhang, F. S et al. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Nodulation and Nitrogen Fixation at Suboptimal Root Zone Temperatures**, 1996.

2. SEGUNDA SEÇÃO: ARTIGOS

2.1 ARTIGO 1 - Triagem de bactérias benéficas associadas ao *Calophyllum brasiliense* CAMBESS, de modo a desenvolver inoculantes microbianos para a agricultura

Artigo aprovado e publicado na revista “*Plant Omics Journal*” em Setembro de 2019.

DOI: 10.21475/POJ.12.02.19.

Bruno Rogério de Souza^{a}, LÍlian Estrela Borges Baldotto^b, Alessandra Monteiro de Paula^c, Fabrício Souza Campos^d, Klever Cristiano Silveira^b, Pabline Marinho Vieira^e, Fernando Fabríz Sodrê^a, Jader Galba Busato^c.*

^a*Universidade de Brasília, Instituto de Química, Campus Darcy Ribeiro, Caixa Postal: 4478, CEP 70910-970, Brasília / DF, Brasil.* ^b*Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal. Rodovia MG 818, Km 6, CEP 35690-000, Florestal / MG, Brasil.* ^c*Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus Darcy Ribeiro, Caixa Postal: 4508, CEP 70910-970, Brasília / DF, Brasil.* ^d*Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi, Caixa Postal: 66, CEP 77402-970, Gurupi / TO, Brasil.* ^e*Instituto Federal Goiano, Departamento de Ciências Biológicas, Rodovia Geraldo Silva Nascimento Km-12.5 – Área Rural, CEP 75790-000, Urutaí / GO, Brasil.*

**Autor correspondente: brsvzp@hotmail.com/ ORCID:https://orcid.org/0000-0003-0945-3682*

RESUMO - Bactérias benéficas pertencem a um grupo de microrganismos que são capazes de aumentar o crescimento das plantas por vários mecanismos. Neste estudo, bactérias solubilizadoras de fósforo e zinco, fixadoras de nitrogênio e produtoras de ácido indolacético (AIA) associadas a *Calophyllum brasiliensis* CAMBESS (guanandi), foram isoladas visando o desenvolvimento de inoculantes microbianos (IM) para uso na agricultura. A caracterização e a identificação das bactérias isoladas também foram realizadas. Obteve-se um total de trinta e um isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio, dos quais 28 mostraram a capacidade de solubilizar fósforo e, 25, de solubilizar o zinco. O isolado AP-JNFb-3-2, pertencente ao gênero *Pseudomonas*, apresentou o maior valor de fósforo solubilizado ($100,4 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os isolados AP-JNFb-3-2 e RHI-JMVL-3-1, associados aos gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter*, respectivamente, apresentaram os maiores valores de solubilização de zinco ($147,8$ e $147,7 \mu\text{g mL}^{-1}$). O isolado RO-LGI.P-3-2, pertencente ao gênero *Pseudomonas*, foi o mais promissor para a produção de AIA ($0,52 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados obtidos demonstraram a presença de uma grande diversidade de bactérias benéficas associadas ao guanandi, que podem ser exploradas como IM na agricultura.

Palavras-chave: Crescimento de plantas; Inóculo microbiano; Sequenciamento do gene 16S rRNA; Solubilização de fósforo; Solubilização de zinco; Produção de ácido indolacético.

ABSTRACT - Beneficial bacteria belong to a group of microorganisms that are able to enhance plant growth by several mechanisms. In this study, phosphorus and zinc solubilizing, nitrogen-fixing and indole acetic acid (IAA) producing bacteria associated with *Calophyllum brasiliensis* CAMBESS (guanandi) were screened to develop microbial inoculants (MI) for use in agriculture. Characterization and identification of screened bacteria were also performed. A total of thirty-one nitrogen-fixing bacteria isolates were obtained, of which 28 showed the ability to solubilize phosphorus and, 25, to solubilize zinc. The isolate AP-JNFb-3-2, belonging to the genus *Pseudomonas*, presented the highest value of solubilized phosphorus ($100.4 \mu\text{g mL}^{-1}$). The isolates AP-JNFb-3-2 and RHI-JMVL-3-1, associated with the genera *Pseudomonas* and *Enterobacter*, respectively, showed the highest values for zinc solubilization (147.8 and $147.7 \mu\text{g mL}^{-1}$). Isolate RO-LGI.P-3-2, belonging to the genus *Pseudomonas*, was the most promising for IAA production ($0.52 \mu\text{g mL}^{-1}$). The results obtained showed the presence of a large diversity of beneficial bacteria associated with guanandi, which may be explored as MI in agriculture.

Keywords: Plant Growth; Microbial inoculum; 16S rRNA gene sequencing; Phosphorus solubilization; Solubilization of zinc; Indolacetic acid production.

1. Introdução

A tendência global nos agrossistemas produtivos aponta para o uso de insumos agrícolas obtidos em conceitos sustentáveis. Os bioestimulantes vegetais atendem a esse requisito e são definidos como substâncias ou microrganismos aplicados a plantas em baixas quantidades com o objetivo de aumentar a eficiência nutricional, a tolerância ao estresse abiótico e as características de qualidade das culturas (Du Jardin, 2015).

Particularmente na agricultura brasileira, o sucesso evidenciado como uso de microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico nas últimas décadas estimulou o desenvolvimento e o emprego de inóculos microbianos (IM). Além da fixação de nitrogênio, alguns IM podem promover o crescimento das plantas aumentando a produção de ácidos orgânicos e substâncias quelantes, resultando em maior solubilidade de fósforo e zinco solúveis no solo (Chen et al., 2006; Gontia-Mishra et al., 2017). Também produzem reguladores de crescimento, como auxinas, citocininas e giberelinas (Groppa et al., 2012) que podem modular o desenvolvimento radicular e aumentar a absorção de água e nutrientes pelas plantas, bem como aumentar o controle da doença devido à produção de antibióticos ou enzimas líticas da parede celular (Sarma et al., 2015). Além disso, esses reguladores podem reduzir o estresse ambiental resultante da seca, calor extremo ou salinidade (Groppa et al., 2012).

Muitos gêneros de bactérias já foram avaliados como IM, com resultados demonstrando aumentos significativos no crescimento e produção das plantas. No entanto, a maior parte desses estudos foi realizada em culturas anuais (Groppa et al., 2012; Sarma et al., 2015; Gontia-Mishra et al., 2017). Plantas de ciclo longo como a espécie florestal *Calophyllum brasiliensis* CAMBESS (guanandi) vem ganhando destaque devido a sua

importância econômica para os agricultores, pois apresenta capacidade de crescimento em áreas degradadas e potencial para a implantação de SAF's (Schembergue et al., 2017).

O Cerrado brasileiro é uma das regiões com ocorrência nativa do guanandi e, apesar de seu desenvolvimento agrícola extensivo visando a produção de grãos, há um interesse crescente na exploração madeireira sustentável nessa região. No entanto, os solos do Cerrado são classificados como Latossolos (65%) e argissolos (15%), que apresentam deficiência acentuada de formas solúveis de nutrientes como fósforo e zinco (Rada, 2013; Lopes e Guilherme, 2016). Além disso, a região do Cerrado apresenta uma longa estação seca compreendendo de 5 a 6 meses, há períodos de seca mesmo durante a estação chuvosa, solos com baixa capacidade de retenção de água e desenvolvimento radicular limitado em função da toxicidade do alumínio quando o pH dos solos não é corrigido (Lopes e Guilherme, 2016). Desta forma, espera-se que a seleção e aplicação de um conjunto benéfico de microrganismos selecionado auxiliem as plantas de guanandi quando essas estiverem submetidas a condições adversas no Cerrado. No entanto, nesse caso essa possibilidade de ação de bactérias no desenvolvimento da planta, ainda não foi explorada para o guanandi. O presente estudo foi realizado com objetivo de isolar e identificar bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, solubilizadoras de fósforo e zinco produtoras de ácido indol-acético (AIA) associadas ao guanandi na perspectiva de desenvolver um IM com potencial para uso na agricultura.

2. Material e Métodos

2.1 Isolamento e quantificação de bactérias

Partes aéreas (folhas e ramos) de diferentes plantas de *C. brasiliensis* foram coletadas de espécimes adultos (aproximadamente 10 anos) juntamente com seus solos rizosféricos e raízes em Brasília, Distrito Federal. Os materiais foram coletados em sacos plásticos esterilizados e imediatamente enviados ao laboratório (Microbiologia UFV-Florestal) para o isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio de acordo com o procedimento descrito por Döbereiner et al. (1995). O material foi desinfetado à superfície usando etanol a 70% (p / v) durante 1 min agitação, seguido por adição de solução de hipoclorito de sódio a 3% (v / v), agitação lenta durante 15 min e lavado quatro vezes com água destilada .

Amostras de 1,0 g de raízes finas e partes aéreas desinfetadas à superfície foram trituradas separadamente em 9,0 mL de solução salina estéril (NaCl, 0,85 g L⁻¹). Para isolar as bactérias presentes na rizosfera, 1,0 g do solo aderido às raízes também foi agitado na mesma solução salina estéril por 5 min na mesma relação 1:1 solo: solução. De ambas as soluções diluídas (10⁻¹), diluições seriadas de 10⁻² a 10⁻⁶ foram obtidas. Assim, alíquotas de 0,1 mL de cada solução diluída foram colocadas em frascos contendo 5,0 mL de seis meios específicos semissólidos isentos de N: JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV ou JMV L.

O material foi então incubado a 30°C durante 7 dias. Posteriormente, a população bacteriana foi determinada pela técnica do número mais provável (NMP), utilizando três repetições, e expressa como o log do número de células g⁻¹ do material testado após o crescimento nos diferentes meios. Os frascos das menores diluições em série que apresentaram uma fina película subsuperficial foram usados para isolamento de colônias puras que foram então transferidas para meios JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV ou JMV L semissólidos frescos, seguidos por várias etapas de purificação (Döbereiner et al, 1995).

Utilizando-se o material biológico desenvolvido na película superficial, foram riscadas em placas de ágar do mesmo meio de cultura sólido e incubadas a 30°C durante 7 dias. Subsequentemente, as colônias isoladas foram selecionadas de acordo com as suas características morfológicas semelhantes e foram novamente transferidas por riscagem para uma nova placa com o mesmo meio de cultura para purificação das colônias.

2.2 Caracterização morfológica e avaliação da coloração gram

Os isolados foram subcultivados em meio DYGS semi-sólido e específico, consecutivamente, por 24 h, a 30 °C, com o objetivo de avaliar as características morfológicas de ambas as colônias e células bacterianas de acordo com Lozada et al. (2018). Um código isolado foi assim designado para identificar as bactérias da seguinte forma: a origem do material usado (Root = RO; Parte aérea = AP; Rhizosphere = RHI); o meio de cultura utilizado (JMV, JMVL, NFb, JNFb, LGI e LGI.P); a diluição utilizada (1=10⁻²; 2=10⁻³; 3=10⁻⁴; 4=10⁻⁵; 5=10⁻⁶) e um número para diferenciar as cepas bacterianas isoladas da mesma placa de Petri.

2.3 Isolamento do DNA genômico, amplificação por PCR e análise da sequência 16S rRNA

Os isolados bacterianos foram identificados com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Em resumo, o DNA genômico foi isolado em duplicata utilizando um kit "DNA & RNA Purification Bacterial Genomic Miniprep" (Sigma Aldrich) e os extratos da mesma amostra foram reunidos. Primers de PCR universais para os genes 16S rDNA de bactéria 27f ((5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')) (Lane,1991)) e 1492r ((5'-

GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991)), para o gene 16S rRNA, foram amplificados em tamanho esperado de 1465 pb. [Os PCRs foram realizados em triplicatas de reações de 50 µL com 0,6 µM de cada um dos iniciadores, ~5 ng de DNA de molde e 1×tampão de reação de PCR, 2,5 U de Pfu DNA polymerase (MBI. Fermentas, EUA)].

O programa de amplificação consistiu em um passo de desnaturação inicial a 96 °C durante 5 min, seguido de 25 ciclos, onde 1 ciclo consistiu em 96 °C durante 30 s (desnaturação), 55 °C durante 30 s (anelamento) e 72 °C por 1min 30 s (extensão) e uma extensão final de 72 °C durante 5 min. Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose (2% em tampão TBE) contendo brometo de etídio e purificados com um kit de extração de gel de DNA (Axygen, EUA). Para serem sequenciados, foi utilizado um sequenciador Applied Biosystems (ABI 3730xl DNA Analyzer). As sequências foram depositadas no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (banco de dados do banco NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) com números de acesso de MH304298 a MH304309.

2.4 Análise filogenética

As sequências foram alinhadas usando o plugin Genius MAFFT (versão 8.1.1) com configurações padrão, e árvores filogenéticas foram construídas usando o método Neighborg-Joining baseado na matriz de distâncias de dois parâmetros Kimura com 1.000 réplicas de bootstrap (n=1000) no Pacote MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura, et al., 2013).

2.5 Quantificação de fósforo e solubilização de zinco

Os isolados foram caracterizados pela sua capacidade de solubilizar fosfato e zinco com base na formação de um halo de dissolução visível em meio sólido. Para fósforo, os isolados foram cultivados em meio líquido DYGS por 24 h, a 30 °C e 120 rpm. Alíquotas de 20 µL das suspensões bacterianas foram incubadas a 30 °C, por 7 dias, em placas de Petri contendo meio de cultura sólido a pH 7,0 utilizando: 10,0 g de glicose, 5,0 g de cloreto de amônio (NH₄Cl), 1,0 g de cloreto sódio (NaCl), 1,0 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O), 1,0g de fosfato de cálcio (Ca₅(PO₄)₃OH), 15 g de ágar e 1 L de água destilada (Verma et al., 2001).

Para o zinco, as bactérias isoladas foram cultivadas no mesmo meio líquido DYGS nas mesmas condições e alíquotas de 20µL das suspensões bacterianas foram incubadas a 30°C, por 7 dias, em placas de Petri contendo meio sólido preparado em pH 7,0 usando : 10,0 g de glicose, 1,0 g de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,1 g de hidrogenofosfato de dipotássio (K₂HPO₄), 0,2 g de sulfato de magnésio hepta-hidrato de (MgSO₄.7H₂O), 1,0g de óxido de zinco (ZnO), 15 g de ágar e 1 L de água destilada (Saravanan et al., 2003). O diâmetro do halo para ambos os testes foi medido usando um paquímetro digital e calculado usando a fórmula matemática: diâmetro do halo (mm) = diâmetro total - diâmetro da colônia. Esta diferença foi utilizada para determinar qualitativamente, com três repetições, a capacidade dos isolados solubilizarem fósforo e zinco.

A análise quantitativa foi avaliada quanto ao potencial de solubilização de fósforo dos isolados identificados com base na análise da sequência, utilizando tubos Falcon contendo 10 mL de meio NBRIP. O meio NBRIP foi preparado a pH 7,0 ajustado usando: 10,0 g de glicose, 5,0 g de fosfato de cálcio (Ca₅(PO₄)₃OH), 5,0 g de cloreto de magnésio

(MgCl₂.6H₂O), 0,25 g de hepta-hidrato de sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,1 g de (NH₄)₂SO₄ e 1 L de água destilada (Nautiyal, 1999). 100 µL de inóculo contendo 10⁸ UFC mL⁻¹ de cada isolado bacteriano foram então aplicados ao meio, com posterior incubação a 30 °C, por 5 dias. Um controle não inoculado também foi mantido sob as mesmas condições. Em seguida os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min e o fósforo no sobrenadante foi estimado pelo método da cor azul molibdofosfórico (MASINI, 2008), usando um espectrômetro a 650 nm (UV-vis 8454, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA).

O potencial de solubilização de zinco dos isolados foi avaliado utilizando tubos Falcon contendo 10 mL de meio DYGS líquido inoculado individualmente com cada isolado obtido (100 µL de inóculo com 10⁸ UFC mL⁻¹). Um controle não inoculado também foi mantido sob as mesmas condições. O meio DYGS líquido foi preparado a pH 7,0 utilizando: 10,0 g de glucose, 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,1g de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g de hepta-hidrato de sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), 0,1 g de fosfato dipotássico (K₂HPO₄), 1,0g de óxido de zinco (ZnO) e 1 L de água destilada e foi incubado a 30 °C por 5 dias. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min, foi determinada a curva analítica, definido os padrões e o zinco no sobrenadante foi então estimado por espectroscopia de emissão atômica com plasma de micro-ondas (MP-AES-4200, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA).

2.6 Determinação da produção de AIA

Os isolados foram testados quanto à sua capacidade de produzir ácido indol-acético (AIA), conforme método colorimétrico apresentado por (Illmer e Schinner, 1995). Para

realização dos testes, 1,0 mL do meio NBRIP previamente centrifugado foi inoculado em frascos contendo 2,0 mL de reagente de Salkowski preparado com 1,2g de ferro tricloreto (FeCl_3), 42 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e 58 mL água destilada. Este foi mantido à temperatura ambiente no escuro por 30 min e, em seguida, o desenvolvimento da cor rosa foi medido no sobrenadante usando um espectrofotômetro a 560 nm (UV-vis 8454, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). A absorvância foi correlacionada com uma curva analítica produzida usando soluções padrão contendo AIA sintético comercial.

2.7 Análise estatística

Os resultados quantitativos (NMP, solubilização de fósforo, solubilização de zinco e produção de AIA) foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a ($p < 0,05$). Dados qualitativos (caracterização morfológica e coloração gram, formação de halo de solubilização de fósforo e zinco, isolamento do DNA genômico, amplificação por PCR e sequência 16S rRNA e análise filogenética) foram analisados descritivamente. Para cada teste, foram colhidas amostras em triplicata, com exceção da análise genômica e filogenética.

3. Resultados

3.1 Quantificação e Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio

As populações de bactérias fixadoras de nitrogênio da rizosfera, raízes e partes aéreas do guanandi, avaliadas pelo método de NMP, são apresentadas na Fig.1. Os seis meios de cultura não apresentaram diferenças em relação à população de bactérias presente nas raízes (Fig.1A). Resultado semelhante foi observado para bactérias da rizosfera

(fig.1C). Por outro lado, na parte aérea, os meios JMV, LGLP e JNFb apresentaram o maior crescimento de bactérias em comparação com o meio LGI (Fig.1B). Os meios NFb e JMVl apresentaram crescimento intermediário, sem diferença estatística em relação aos demais.

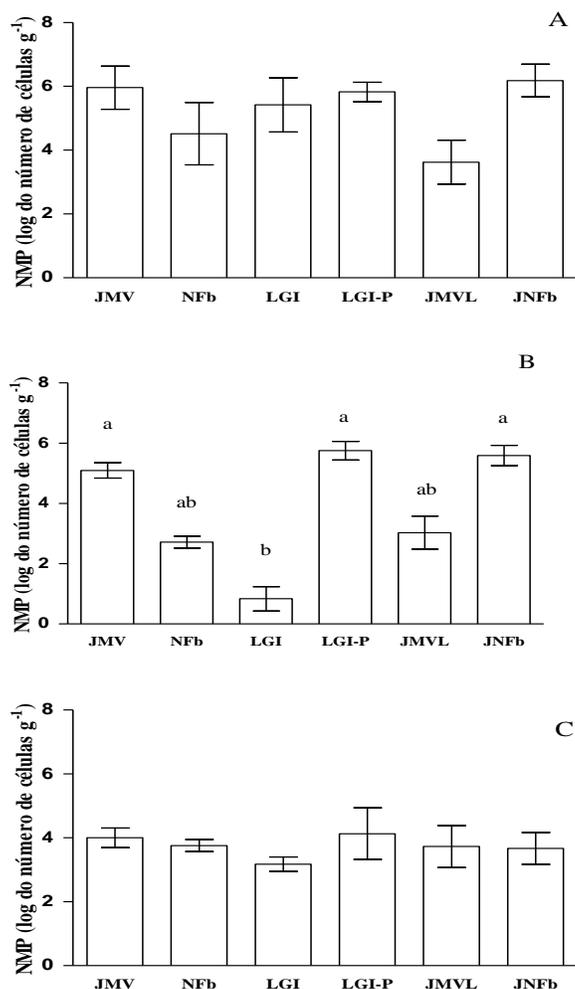


Figura 1 - Log do número de células de bactérias por grama presentes nas raízes (A), (B) da parte aérea e (rizosfera) (C) após o crescimento em diferentes meios de cultivo. Barras referem-se a desvios padrão. As letras referem-se ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A ausência de letras indica falta de diferença estatística.

Em geral, os resultados do NMP para as raízes ilustraram a proliferação acentuada das bactérias nos seis meios específicos (média de 5,26 log de células g⁻¹) quando comparados com a parte aérea (3,93 log de células g⁻¹) e rizosfera (3,54 log de células g⁻¹). A presença de um elevado número de microrganismos oportunistas resulta em alta competição na rizosfera e pode ser reconhecida como um importante mecanismo de regulação populacional. Assim, bactérias e outros grupos microbianos podem competir por nutrientes e compostos exsudados pelas raízes, reduzindo a população de bactérias fixadoras de nitrogênio.

Obteve-se um total de 31 isolados bacterianos, dos quais 7 da parte aérea, 11 eram da rizosfera e 13 das raízes de guanandi. Isolados dos meios semissólidos (JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVl) permitiram a obtenção de bactérias fixadoras de nitrogênio detectadas pela formação de um filme aerotático sobrenadante, que foram então purificados em meio sólido seletivo.

3.2 Identificação das bactérias isoladas e avaliação morfológica por coloração

As características morfológicas dos isolados cultivados no meio específico estão apresentadas na Tabela 1. Houve predomínio da coloração do centro branco (25 isolados, 81% do total) e do tipo de lente (28 isolados, 90%). Todos os isolados apresentaram colônias com superfícies lisas. O muco foi observado em 4 isolados (13%), e 10 isolados (32%) apresentaram tamanho de colônia menor que 1 mm. Com exceção dos isolados RO-NFb-3-2, RO-JNFb-4-2, RO-LGI-4-1 e RO-LGI.P-3-2, todos os outros foram Gram-negativos.

Tabela 1 - Características morfológicas dos isolados cultivados em meio específico de crescimento.

Isolado	Coloração	Tamanho	Elevação	Borda	Superfície	Muco	Natureza Gram	Diâmetro	Diâmetro
								halo P (mm)	halo Zn (mm)
AP-JMV-2-1	Centro amarelo de aspecto leitoso	> 1mm	Lente	Lobado	Suave	-	-	17	17
RO-JMV-4-1	Centro branco claro	< 1mm	Plana	Inteira	Suave	+	-	13	13
RHI-JMV-3-1	Borda translúcida, centro branco claro	> 1mm	Plana	Inteira	Suave	-	-	-	-
AP-JMVL-3-1	Borda translúcida, centro branco claro	> 1mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	18	18
RO-JMVL-4-1	Borda translúcida, centro branco claro	1mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	16	3
RHI-JMVL-3-1	Borda translúcida, centro branco claro	> 1mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	14	5
AP-NFb-2-1	Centro branco de aspecto leitoso	<1 mm	Lente	Ondulado	Suave	-	-	15	6
RO-NFb-3-1	Centro branco de aspecto leitoso	>1 mm	Lente	Ondulado	Suave	-	-	15	8
RO-NFb-3-2	Centro branco de aspecto leitoso	1 mm	Lente	Ondulado	Suave	-	+	15	4
RO-NFb-3-3	Centro branco de aspecto leitoso	1 mm	Lente	Ondulado	Suave	-	-	14	6
RO-NFb-3-4	Borda translúcida, centro branco claro	<1 mm	Lente	Inteira	Suave	+	-	-	-
RHI-NFb-3-1	Centro branco de aspecto leitoso	<1 mm	Lente	Ondulado	Suave	-	-	14	3
RHI-NFb-3-2	Centro branco aspecto leitoso, borda translúcida	<1 mm	Lente	Ondulado	Suave	+	-	14	5
RHI-NFb-3-3	Centro branco aspecto leitoso, borda transparente	<1 mm	Lente	Ondulado	Suave	+	-	-	-
RHI-NFb-3-4	Centro branco de aspecto leitoso	< 1 mm	Lente	Ondulado	Suave	-	-	14	8
APJNFb-3-1	Centro amarelo, borda branca do aspecto leitoso	>1 mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	15	5
AP-JNFb-3-2	Centro branco claro, borda clara	1 mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	15	-
RO-JNFb-4-1	Aspecto leitoso centro amarelo, borda clara	>1 mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	16	14
RO-JNFb-4-2	Centro branco claro, borda clara	> 1 mm	Lente	Lobada	Suave	-	+	9	-
RO-JNFb-4-3	Centro branco aspecto leitoso, borda clara	> 1mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	15	16
RHI-JNFb-3-1	Centro branco aspecto leitoso, borda clara	> 1mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	18	17
RHI-JNFb-3-2	Centro branco aspecto leitoso, borda clara	>1 mm	Convexo	Inteira	Suave	-	-	16	8
RHI-LGI-2-1	Centro branco	< 1mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	14	-

RO-LGI-4-1	Centro branco, borda translúcida	< 1mm	Lente	Inteira	Suave	-	+	18	13
RO-LGI-4-2	Centro branco, borda branca clara	< 1mm	Lente	Ondulado	Suave	-	-	8	7
AP-LGI.P-2-1	Centro branco, borda branca clara	1mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	11	3
AP-LGI.P-2-2	Centro branco	1 mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	9	5
RHI-LGI.P-3-1	Translúcido	1mm	Lente	Ondulado	Suave	-	-	15	6
RHI-LGI.P-3-2	Translúcido	1mm	Lente	Ondulado	Suave	-	-	14	13
RO-LGI.P-3-1	Borda translúcida, centro branco claro	< 1mm	Lente	Inteira	Suave	-	-	12	8
RO-LGI.P-3-2	Borda translúcida, centro branco claro	1 mm	Lente	Ondulado	Suave	-	+	11	9

3.3 Identificação rRNA 16S e análise filogenética de bactérias isoladas da espécie vegetal

A análise filogenética do sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizada nos 31 isolados. E o banco de dados do NCBI foi utilizado para identificar e comparar as sequências. Doze isolados (RHI-LGIP-3-1, RHI-JMVL-3-1, RO-JMVL-4-1, AP-JMVL-3-1, RHI-NFb-3-4, AP-JNFb-3-1, RO-JNF-4-2, RO-NF-3-4, AP-JNF-3-2, RO-NF-3-2, RO-LGIP-3-2 e RHI-NF-3-3) foram usados para obter uma árvore filogenética, com base no sequenciamento parcial do 16S rRNA (Fig. 2). Os produtos de PCR de 19 isolados não apresentaram padrões para produzir dados de sequência de alta qualidade, mesmo após a realização dos métodos de purificação.

A análise filogenética revelou que os 12 isolados pertenciam a quatro gêneros: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Bacillus*. Nove isolados (AP-JMVL-3-1, RHI-NF-3-4, AP-JNF-3-1, RO-JNF-4-2, RO-NF-3-4, AP-JNF-3-2, RO-NFb-3-2, RO-LGIP-3-2 e RHI-NFb-3-3) apresentaram 99% ou mais de semelhança entre as sequências disponíveis do GenBank. Por outro lado, os isolados RHI-LGIP-3-1, RHI-JMVL-3-1 e RO-JMVL-4-1 apresentaram a menor similaridade (87%).

Com base nas sequências dos isolados RHI-LGIP-3-1, RHI-JMVL-3-1, RO-JMVL-4-1 e AP-JMVL-3-1, os resultados da pesquisa do Blast mostraram que eles estão intimamente relacionados com diferentes cepas do gênero *Enterobacter*. Os isolados AP-JNFb-3-2, RO-NFb-3-2 e RO-LGIP-3-2 estavam intimamente relacionados (99%) com espécies do gênero *Pseudomonas*. Os isolados RO-LGIP-3-2, AP-JNFb-3-2 e RHI-NFb-3-2 foram relacionados ao gênero *Pseudomonas*, com 100% de similaridade. No isolado RHI-NFb-3-3 houve 100% de ocorrência para o gênero *Bacillus*. Quatro isolados (RHI-NFb-3-4, AP-JNF-3-1, RO-JNFb-4-2, RO-NFb-3-4) foram intimamente relacionados (100%) com a espécie *Escherichia coli*.

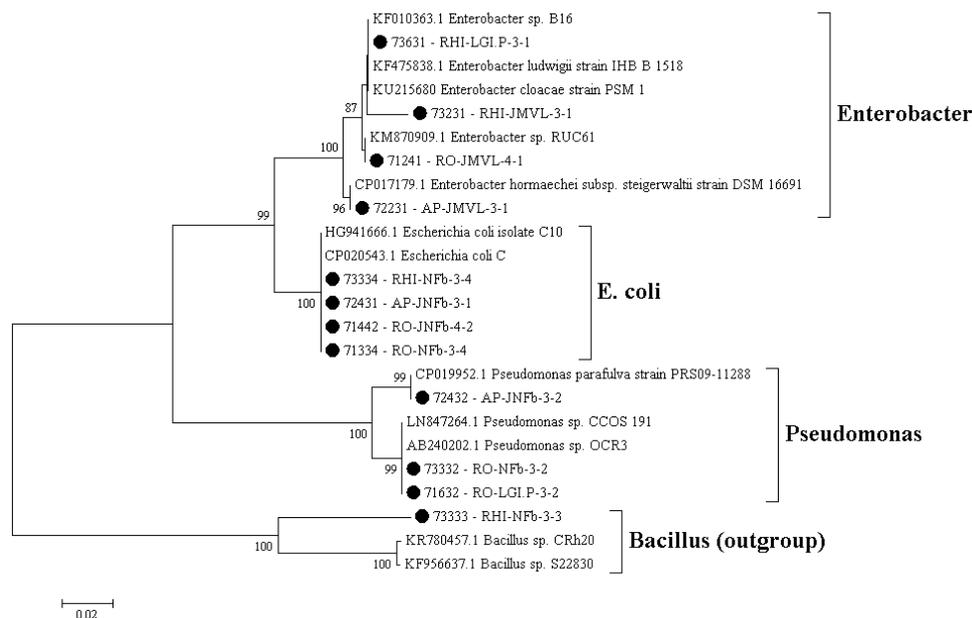


Figura 2 - Árvore filogenética de isolados bacterianos obtidos de *Calophyllum brasiliense* CAMBESS.

3.4 Verificação qualitativa e quantitativa da solubilização por bactérias de fósforo e zinco

Vinte e oito isolados (90%) apresentaram a capacidade de solubilizar fósforo *in vitro*, apresentando um halo característico ao redor das colônias. Apenas 3 isolados (RHI-JMV-3-1, RO-NFb-3-4 e RHI-NFb-3-3) não exibiram esse potencial. Foram observados diâmetros de halo variável, onde os isolados AP-JMV-2-1, AP-JMVL-3-1, RO-JMVL-4-1, RO-JNFb-4-1, RHI-JNFb-3-1, RHI -JNFb-3-2 e RO-LGI-4-1 apresentaram os maiores valores (diâmetro do halo > 16 mm, Tabela 1). Um total de 25 isolados (80%) apresentou capacidade de solubilizar o zinco, dos quais 8 tinham diâmetro do halo maior ou igual a 13 mm (Tabela 1). Os isolados AP-JMV-2-1, AP-JMVL-3-1, RO-JNFb-4-3 e RHI-JNFb-3-1 apresentaram o maior diâmetro do halo, com valores maiores que 16 mm. Ao contrário, os isolados RHI-JMV-3-1, RO-NFb-3-4, RHI-NFb-3-3, AP-JNFb-3-2, RO-JNFb-4-2 e RHI-LGI-2-1 não apresentaram capacidade de solubilizar o zinco, como foi observado pela ausência de um halo.

A concentração de fósforo solúvel no meio NBRIP inoculado variou entre 34,9 e 100,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 3A), com o maior registro observado com o isolado AP-JNFb-3-2. Os resultados da busca BLAST das sequências 16S rRNA indicaram que este isolado está intimamente relacionado com bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (*P. parafulva* CP 019952.1) (Fig. 2). O isolado RO-NFb-3-4, estatisticamente semelhante ao AP-JNFb-3-2, apresentou o segundo maior valor de fósforo solubilizado ($93,7 \pm 9,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) e foi relacionado ao isolado de *Escherichia coli* C10 HG941666 1 e *E. coli* C CP020543.1.

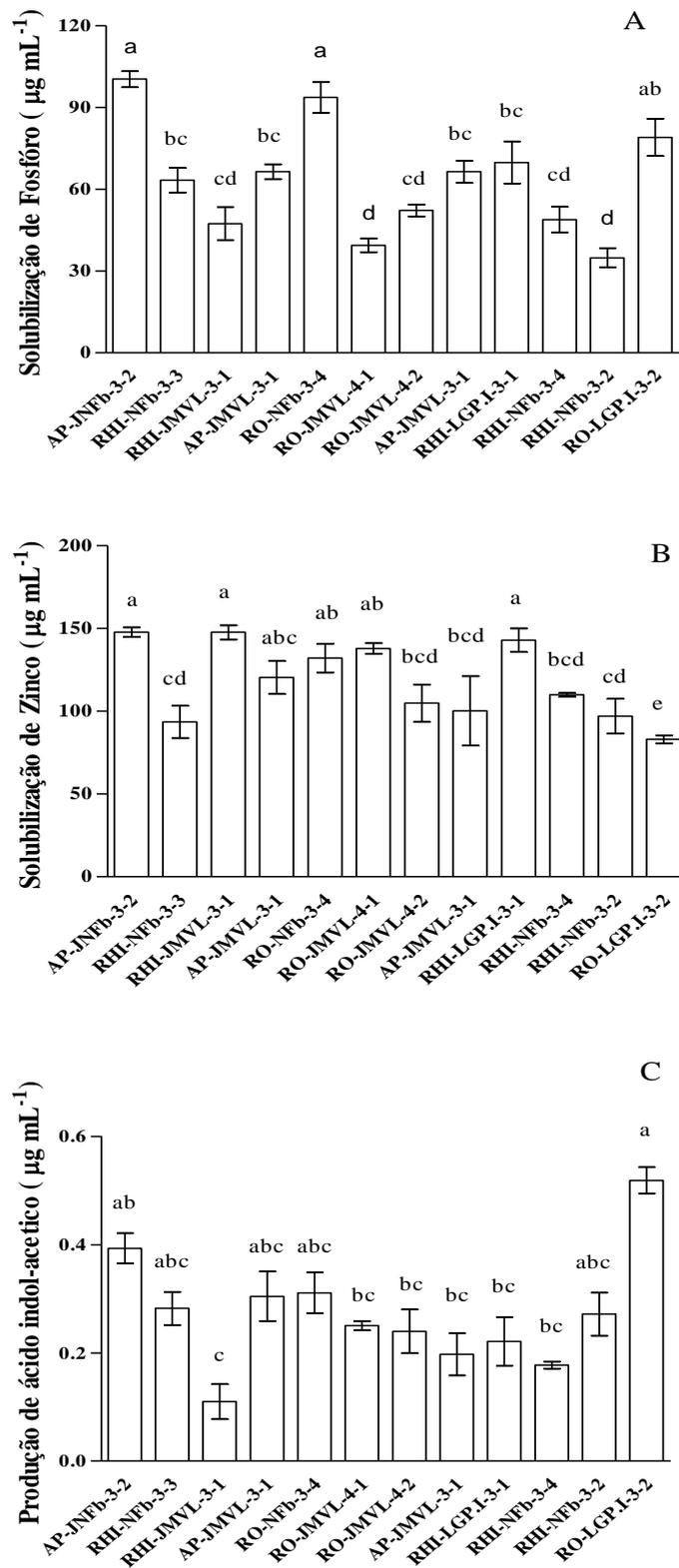


Figura 3 - Solubilização de fósforo (A), solubilização de zinco (B) e produção de ácido indolacético (C) por isolados bacterianos obtidos de *Calophyllum brasiliense* CAMBESS.

O isolado RO-LGI.P-3-2 apresentou concentração de fósforo solubilizado de $79,0 \pm 4,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ e está intimamente relacionado com *Pseudomonas* sp. CCOS 191 ln847264.1 e *Pseudomonas* sp. OCR3 AB240201.1. A concentração de zinco solúvel no meio DYGS inoculado variou de 83,0 a $147,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 3B), sendo que os isolados AP-JNVb-3-2 ($147,8 \pm 5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), RHI-JMVL-3- 1 ($147,7 \pm 7,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) e RHI-LGI.P-3⁻¹ ($142,9 \pm 12,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) registraram os maiores valores. O isolado AP-JNFb-3-2 está intimamente relacionado com bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. No entanto, os isolados RHI-JMVL-3-1 e RHI-LGI.P-3-1 foram relacionados ao gênero *Enterobacter* (cepa de *E. cloacae* PSM 1 KU 215680, cepa de *E. ludwigii* IHB B 1518 KF 475838.1 ou *Enterobacter* sp. B16 KF 010363.1).

3.5 Quantificação da produção de ácido indol-acético pelos isolados bacterianos

Os 12 isolados foram testados para produção de AIA e os resultados são apresentados na Fig. 3C. A produção do AIA variou entre $0,11 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,52 \pm 0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$, tendo o isolado RO-LGI.P-3-2 apresentado o maior valor. As sequências 16S rRNA indicaram estreita relação deste isolado com bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. CCOS 191 LN 847264.1 ou *Pseudomonas* sp. OCR3 AB240202.1).

4. Discussão

Inoculantes microbianos podem induzir respostas bioquímicas que favorecem o crescimento das plantas. Este estudo apresentou, pela primeira vez, a existência de uma interação entre plantas de guanandi, uma espécie arbórea do Cerrado brasileiro, com diferentes espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio. A colonização predominante de bactérias fixadoras de nitrogênio no sistema radicular tem sido relatada para diferentes espécies de plantas (Singh et al., 2011), o principal local de infecção bacteriana são rupturas

de células epidérmicas durante o surgimento de raízes laterais e estabelecimento endofítico por colonização de espaços intercelulares do parênquima cortical (Baldotto et al., 2011).

Essas bactérias, além de fixarem o nitrogênio, podem também ser capazes de solubilizar nutrientes e produzir fitohormônios, e, são, portanto, materiais biológicos com potencial para uso como promotores de crescimento de plantas (Singh et al., 2011). Dentre os isolados que puderam ser identificados pelo sequenciamento 16S rRNA, o AP-JNFb-3-2 está intimamente relacionado ao gênero *Pseudomonas* (*P. parafulva* CP 019952.1) e apresentou maior capacidade de solubilizar fósforo em meio NBRIP, com valor de $100,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Essa concentração é menor que a observada por Gupta et al. (2012) que relataram que as bactérias associadas à *Aloe barbadensis* apresentaram solubilização de fósforo entre 150 e $340 \mu\text{g mL}^{-1}$. As espécies mais próximas dos isolados obtidos por Gupta et al. (2012) foram identificadas como *Pseudomonas synxantha*, *Burkholderia gladioli*, *Enterobacter hormaechei* e *Serratia marcescens*. Da mesma forma, Awais et al. (2017) isolaram bactérias solubilizadoras de fósforo da rizosfera de cana-de-açúcar e arroz, e observaram que a solubilização variou de 50,07 a 717,99 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$) nos meios NBRIP e Pikovskaya.

Os solos do Cerrado brasileiro são geralmente ácidos e deficientes em nutrientes (Lopes e Guilherme, 2016) e, portanto, a solubilização do fosfato inorgânico é de grande interesse para a seleção de microrganismos com potencial para serem explorados como IM na agricultura. Uma avaliação de potenciais solubilizantes de fosfato de 20 isolados de raiz de arroz, cultivados na região do Cerrado brasileiro determinou que 75% dos isolados foram capazes de solubilizar no meio Pikovskaya. A análise de sequenciamento do gene 16S rRNA revelou que todos os isolados avaliados apresentaram alta similaridade com o gênero *Bacillus*. (Braga et al., 2018).

A atividade solubilizadora de fósforo é determinada pela capacidade microbiana de produzir e liberar ácidos orgânicos, que através de seus grupos carboxílicos quelatam os

cátions ligados ao fósforo ou diminuem o pH, convertendo o fósforo em formas solúveis (Gupta et al., 2012; Awais et al., 2017). Chen et al (2006) usaram cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para detectar ácido cítrico, glucônico, láctico, succínico, propiônico e três outros ácidos orgânicos não identificados que foram produzidos a partir de culturas de *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Gordonia* e *Phyllombacterium*. Shahid et al. (2012) observaram que *Enterobacter sp.* produziu ácidos glucônico e málico, resultando em 43,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo solubilizado. Outras bactérias pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus* e *Serratia* também são capazes de produzir diferentes ácidos orgânicos, resultando em concentrações de fósforo solubilizado entre 270,2 e 623,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Chen et al., 2006; Yi et al., 2008).

No entanto, embora a liberação dos ácidos orgânicos tenha sido indicada como um dos principais fatores responsáveis pela solubilização de fósforo, também há relatos que sugerem que o fósforo insolúvel pode ser solubilizado sem qualquer produção de ácido orgânico (Kim et al., 1997; Chen et al. al., 2006). Ácidos inorgânicos como ácido clorídrico (Kim et al. 1997), nítrico e sulfúrico (Dugan et al. 1965) produzidos por quimioautotróficos e a atividade da bomba de H^+ , por exemplo, têm sido apontados também como possíveis mecanismos para promover a solubilização inorgânica do fósforo (Reyes et al., 1999). O presente trabalho não procurou determinar os mecanismos responsáveis pela solubilização, mas apenas identificar as bactérias mais promissoras. Nesse sentido, os isolados AP-JNFb-3-2 e RO-LGI.P-3-2, identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, apresentaram o maior potencial para atuar como agentes de solubilização de fósforo.

O zinco é um nutriente requerido pelas plantas como componente de reações enzimáticas, metabolismo de carboidratos, síntese de auxinas e também desempenha um papel vital na regulação da expressão gênica necessária para a tolerância a estresses ambientais (Gontia-Mishra et al., 2017). A deficiência de zinco nas culturas pode ser devida à

sua baixa solubilidade, em vez de baixa disponibilidade no solo (Iqbal et al., 2010). Assim, as bactérias que atuam como agentes de solubilização aplicadas no IM podem auxiliar as plantas na obtenção desse nutriente.

Um total de 25 isolados obtidos de tecidos e rizosfera do guanandi apresentaram capacidade de solubilização de zinco no teste qualitativo, dos quais oito apresentaram diâmetros de halo maiores ou iguais a 13 mm. Esse resultado é semelhante ao relatado por Ramesh et al. (2014) e Mumtaz et al. (2017) em estudos envolvendo solubilização de zinco por bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*. Em medidas quantitativas, os isolados AP-JNFb-3-2, RHI-JMVL-3-1 e RHI-LGP-3-1, intimamente relacionados às bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter*, apresentaram o maior potencial de solubilização com o teor de zinco na média entre 142,9 e 147,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses valores estão de acordo com os apresentados por Khande et al. (2017) que isolaram bactérias da rizosfera de duas cultivares de soja cultivadas na Índia e obtiveram valores de solubilização de zinco variando de 89,00 a 547,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os isolados obtidos por Khande et al (2017) foram identificados como *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. tequilensis* e *B. subtilis subsp. Inaquosorum*. Trabalhos anteriores demonstram a capacidade de bactérias do gênero *Pseudomonas* para solubilizar o zinco de vários compostos insolúveis de zinco (Di Simine e Sayer, 1998; Gontia-Mishra et al., 2017).

A criação de condições ácidas no meio líquido pelas bactérias em decorrência da produção de diferentes ácidos orgânicos também foi relatada, similar ao fósforo, como a principal causa de solubilização de zinco (Saravanan et al., 2003; Ramesh et al., 2014). Di Simine et al. (1998) observaram que o ácido glucônico e 2 ácidos ceto-glucônicos produzidos por *Pseudomonas fluorescens* auxiliaram na solubilização de sais de zinco e Gontia-Mishra et al. (2017) demonstraram uma correlação positiva entre solubilização de zinco por

Pseudomonas aeruginosa e a redução do pH do meio. A produção de ácidos orgânicos pelos isolados obtidos de guanandi reduziu drasticamente o pH nos meios (dados não mostrados), sendo esta uma das explicações possíveis para solubilização do zinco.

Os 12 isolados identificados pela análise de PCR produziram AIA em concentrações entre 0,11 e 0,52 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esse intervalo está abaixo do observado por Posada et al. (2016) que relataram concentrações produzidas por bactérias da rizosfera de banana entre 1,9 e 60,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Mumtaz et al. (2017) também relataram maior produção de AIA por isolados endofíticos bacterianos de sementes de arroz (entre 11,5 a 38,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e por *Bacillus spp* (entre 2,6 a 15,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente. Por outro lado, Tsavkelova et al (2005a, 2007b) demonstraram que as quantidades de AIA secretadas na cultura líquida por bactérias isoladas de orquídeas tropicais variaram de 0,5 a 92,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, é possível inferir que o AIA produzido por bactérias varia muito de acordo com a linhagem da espécie. O isolado mais promissor observado no presente trabalho foi o RO-LGIP-3-2 e as sequências de 16S rRNA indicaram uma estreita relação deste com bactérias do gênero *Pseudomonas* (*Pseudomonas sp.* CCOS 191 LN 847264.1 ou *Pseudomonas sp.* OCR3 AB240202.1).

5. Conclusões

O isolado AP-JNFb-3-2, obtido da parte aérea das plantas e identificado como pertencente ao gênero *Pseudomonas*, foi a bactéria solubilizadora de fósforo mais promissora. Os isolados AP-JNFb-3-2 e RHI-JMVL-3-1 apresentaram os maiores valores de solubilização de zinco. Estas bactérias foram associadas aos gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter*, respectivamente. O isolado RO-LGIP-3-2, pertencente ao gênero *Pseudomonas*, apresentou o maior valor para produção de AIA com $(0,52 \mu\text{g mL}^{-1})$. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram a presença de uma grande diversidade de bactérias associadas a exemplares adultos de guanandi, que podem ser exploradas para uso como IM visando auxiliar as plantas na obtenção de nutrientes de solos pobres do Cerrado, assim como na oferta de reguladores de crescimento para as plantas.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, agência do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e comunicações (MCTIC) do Brasil (CNPq, nº 454797 / 2014-6), e apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

- Awais M., et al. Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. **Biocatal Agric Biotechnol.** 11:312-321, 2017. doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.018.
- Baldotto L.E.B., et al. Structural interaction between gfp-labeled diazotrophic endophytic bacterium (*Herbaspirillum seropedicae*) ram10 and pineapple plantlets 'Vitória'. **Braz J Microbiol.** 42:114-125, 2011. doi.org/10.1590/S1517-83822011000100015.
- Braga L.F., et al. Polyphasic characterization of bactéria obtained from upland rice cultivated in cerrado soil. **Braz J Microbiol.** 49:20-28, 2018. doi.org/10.1016/j.bjm.2017.04.004.
- Chen YO, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Appl Soil Ecol.** 34: 33-41, 2006. doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002.
- Di Simine C.D.D., et al. Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. **Biol Fert Soils.** 25:87-94, 1998. doi.org/10.1007/s003740050467.
- Döbereiner J., et al. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: Embrapa, SPI.; Itaguaí: Embrapa, CNPAB. 60p., 1995.
- Du Jardin, et al. P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Sci Hortic-England.**196:3-14, 2015. doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021.
- Dugan P., Lungren D.G., et al. Energy supply for the chemoautotroph *Ferrobacillus ferroxidans*. **J Bacteriol.** 89:825-834, 1965.
- Gontia-Mishra I., et al. Zinc solubilizing bacteria from the rhizosphere of rice as prospective modulator of zinc biofortification in rice. **Rhizosphere.** 3:185-190, 2017. doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.04.013.

Groppa M.D., et al. Root hydraulic conductance, aquaporins and plant growth promoting microorganisms: a revision. **Appl Soil Ecol.** 61:247–254, 2012. doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.013.

Gupta M., et al. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-a biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. **Microbiol Res.** 167:358-363, 2012. doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.004.

Illmer P., Schinner F., et al. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. **Soil Biol Biochem.** 27:257-263, 1995. doi.org/10.1016/0038-0717(94)00190-C.

Iqbal U., et al. Effect of zinc-phosphate-solubilizing bacterial isolates on growth of *Vigna radiate*. **Ann Microbiol.** 60:243–248, 2010. doi.org/10.1007/s13213-010-0033-4.

Khande R., et al. Zinc solubilizing *Bacillus* strains that modulate growth, yield and zinc biofortification of soyben and wheat. **Rhizosphere.** 4:126-138, 2017. doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.09.002.

Kim K.Y., et al. *Rahnella aquatilis*, bacterium isolated from soybean rhizosphere hydroxyapatite. **FEMS Microbiol Lett.** 153:273-277, 1997. doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00246-2.

Lane Dj., et al. 16S/23S rRNA sequencing. In: stackebrandt e, goodfellow m, editors. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. **New York, NY: John Wiley and Sons.** 115-75, 1991.

Lopes A.S., et al. A career perspective on soil management in the cerrado region of Brazil. **Adv Agron.** 137:1–72, 2016. doi.org/10.1016/bs.agron.2015.12.004.

Lozada J.A.R., et al. Selection of diazotrophic bacteria isolated from wastewater treatment plant sludge at a poultry slaughterhouse for their effect on maize plants. **Rev Ceres.** 65:85-92, 2018. doi.org/10.1590/0034-737x201865010011.

MASINI, J.C. Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da análise por injeção sequencial. **Química Nova**, v.31, p.704-708, 2008. Available from: <<http://quimicanova.s bq.org.br/qn/qnol/2008/vol31n3/39-ED07348.pdf>>. Accessed: Jan. 17, 2013.

Mumtaz M.Z., et al. Zinc solubilizing *Bacillus sp.* potential candidates for biofortification in maize. **Microbiol Res.** 202:51-60, 2017. doi.org/10.1016/j.micres.2017.06.001.

Nautiyal C.S., et al. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol Lett.** 170:265-270, 1999. doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.

Posada L.F., et al. Bioprospecting of aerobic endospore-forming bacteria with biotechnological potential for growth promotion of banana plants. **Sci Horti-England.** 212:81-90, 2016. doi.org/90.10.1016/j.scienta.2016.

Rada N., et al. Assessing Brazil's cerrado agricultural miracle. **Food Policy.** 38:146-155, 2013. doi.org/10.1016/j.foodpol.2012.11.002.

Ramesh A., et al. Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhatai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in vertisols of central India. **Appl Soil Ecol.** 73:87–96, 2014. doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.08.009.

Reyes I., et al. Effect of nitrogen source on solubilization of different inorganic phosphates by bacterial strain of *Penicillium rugulosum* and two (uv) induced mutants. **FEMS Microbiol Ecol.** 28:281-290, 1999. doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00583.x.

Saravanan V.S., et al. Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (zsb) isolates. **Braz J Microbiol.** 34:121–125, 2003. doi.org/10.1590/S1517-83822004000100020.

Sarma B.K., et al. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. **Soil Biol Biochem.** 87:25–33, 2015. doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.001.

Schembergue, A et al. Sistemas Agroflorestais como Estratégia de Adaptação aos Desafios das Mudanças Climáticas no Brasil. **Rev. Econ. e Sociol. Rural** 55, 9–30.2017. doi:10.1590/1234-56781806-94790550101

Shahid M., et al. Root colonization and growth promotion of sunflower *Helianthus annuus* L. by phosphate solubilizing *Enterobacter sp.* Fs-11. **World J Microb Biot.** 28:2749–2758, 2012.

Singh J.S., et al. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agric Ecosyst Environ.** 140:339-353, 2011. doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017.

Tamura K., et al. Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Mol Biol Evol.** 30:2725–2729, 2013. doi.org/10.1093/molbev/mst197.

Tsavkelova E.A., et al. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiol Res.** 162:69-76, 2007. doi.org/10.1016/j.micres.2006.07.014.

Tsavkelova E.A., et al. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. **Microbiology.** 74:46-53, 2005. doi.org/10.1007/s11021-005-0027-6.

Verma S.C., et al. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **J Biotechnol.** 91:127-141, 2001. doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00333-9.

Yi Y., et al. Exo-polysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World J Microb Biot.** 24:1059-1065, 2008. doi.org/10.1007/s11274-007-9575-4.

2.2 ARTIGO 2 – Efeito de bioestimulantes vegetais sobre o desenvolvimento inicial de mudas de *Calophyllum brasiliense* CAMBESS

Bruno Rogério de Souza*^a, Damiana Beatriz Silva^a, Danilo Marques França^b, Fernando Frabriz Sodré^a, Lucas Felisberto Pereira^b, Marihus Altoé Baldotto^c e Jader Galba Busato^b

^a*Universidade de Brasília, Instituto de Química, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Caixa Postal 4478, CEP 70910-970, Brasília/DF, Brasil.* ^b*Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Caixa Postal 4508, CEP 70910-970, Brasília/DF, Brasil.* ^c*Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal. Rodovia MG 818, Km 6, CEP 35690-000, Florestal / MG, Brasil.*

*Autor correspondente: brsvzp@hotmail.com/ ORCID:<https://orcid.org/0000-0003-0945-3682>

Artigo redigido conforme as normas do periódico “*Frontiers in Plant Science*” (versão preliminar).

EFEITO DE BIOESTIMULANTES VEGETAIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE MUDAS DE *Calophyllum brasiliense* CAMBESS

RESUMO – Bioestimulantes vegetais são compostos ou microrganismos aplicados às plantas ou rizosfera que podem estimular processos naturais capazes de auxiliar no desenvolvimento dos cultivos agrícolas. Substâncias húmicas (SH) e microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) apresentam seu potencial, dado o conjunto de resultados encontrados na literatura especializada envolvendo esses materiais, é entretanto ainda limitado a poucas espécies vegetais, em particular, àquelas de ciclo mais curto. Espécies vegetais de interesse para a implantação de sistemas agroflorestais (SAFs), tais como *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (guanandi), têm sido pouco exploradas nesse contexto. No presente trabalho, os efeitos da adição de soluções contendo ácidos húmicos (AH) e extrato húmico solúvel em água (EHSA), associados ou não a soluções bacterianas, foram avaliados como bioestimulantes capazes de acelerar o desenvolvimento inicial de mudas de guanandi. A hipótese é que as medidas biométricas das plantas, o conteúdo de nutrientes, a taxa fotossintética e a eficiência de uso da água sejam favorecidas com a aplicação conjunta dos AH e EHSA com os MPCV. Para isto efetuou-se a caracterização química dos AH e EHSA, utilizou-se bactérias previamente selecionadas pela sua habilidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco, capacidade de fixação biológica de nitrogênio atmosférico e de produção de ácido indol-acético. Realizou-se também a determinação dos parâmetros de trocas gasosas, sendo efetuada aplicação em seis tratamentos (controle, IM, AH, EHSA, IM+AH e IM+EHSA). Após a aplicação do tratamento IM+AH, a parte aérea e raízes apresentaram, respectivamente, um aumento médio de 35,77% e 54,81% da massa seca. Com relação ao diâmetro do caule, houve um aumento de 21,76% da massa seca. O tratamento IM+EHSA apresentou 10 e 16% mais massa seca e número de raízes laterais respectivamente em comparação com o tratamento controle. Destaca-se que o tratamento IM acarretou deficiência hídrica nas mudas, reduzindo em 27,94% a quantidade de água assimilada pelas plantas. Com exceção da eficiência do uso da água (EUA), todos os parâmetros associados às trocas gasosas, o tratamento AH foi o que apresentou os melhores resultados. O conjunto destes resultados obtidos mostrou que a presença de bactérias e SH, associados ao guanandi, podem ser explorados para auxiliar as plantas na obtenção de nutrientes, bem como oferecer reguladores de crescimento, favorecendo sua exploração em SAFs e incentivando a produção e comercialização de espécies nativas.

Palavras-chave: Bioestimulante vegetal; Agrofloresta; Efeitos fisiológicos; Promoção do crescimento vegetal; Ácido Húmico, Guanandi.

EFFECT OF VEGETABLE BIOESTIMULANTS ON THE INITIAL DEVELOPMENT OF *Calophyllum brasiliense* CAMBESS SEEDLINGS

ABSTRACT - Plant biostimulants are compounds or microorganisms applied to plants or rhizosphere that can stimulate natural processes capable of assisting in the development of agricultural crops. Humic substances (SH) and plant growth-promoting microorganisms (MPCV) have their potential, given the set of results found in the specialized literature involving these materials, however, it is still limited to a few plant species, particularly those of shorter cycle. Plant species of interest for the implantation of agroforestry systems (SAFs), such as *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (guanandi), have been little explored in this context. In the present work, the effects of the addition of solutions containing humic acid (AH) and water-soluble humic extract (EHSA), associated or not with bacterial solutions, were evaluated as biostimulants capable of accelerating the initial development of guanandi seedlings. The hypothesis is that plant biometric measurements, nutrient content, photosynthetic rate, and water use efficiency are favored by the joint application of AH and EHSA with MPCV. For this, the chemical characterization of AH and EHSA was carried out, previously selected bacteria were used for their ability to solubilize calcium phosphate and zinc oxide, biological nitrogen fixation capacity and indole acetic acid production. Gas exchange parameters were also determined and applied in six treatments (control, IM, AH, EHSA, IM + AH and IM + EHSA). After the application of the IM + AH treatment, the shoot and roots presented, respectively, an average increase of 35,77% and 54,81% of the dry mass. Regarding stem diameter, there was a 21,76% increase in dry mass. The IM + EHSA treatment presented 10 and 16% more dry mass and number of lateral roots respectively compared to the control treatment. It is noteworthy that the IM treatment caused water deficit in the seedlings, reducing by 27,94% the amount of water assimilated by the plants. Except for water use efficiency (WUA), all parameters associated with gas exchange, the AH treatment presented the best results. These results show that the presence of bacteria and SH, associated with guanandi, can be exploited to assist plants in obtaining nutrients, as well as offer growth regulators, favoring their exploitation in SAFs and encouraging the production and marketing of species native.

Keywords: Plant Biostimulant; Agroforestry; Physiological effects; Promotion of plant growth; Humic acid, Guanandi.

1. Introdução

Bioestimulantes vegetais são compostos ou microrganismos aplicados às plantas que podem estimular processos naturais capazes de auxiliar no desenvolvimento dos cultivos agrícolas, independente da sua constituição nutricional (EUROPEAN BIOSTIMULANTS, 2018). Inicialmente empregados em sistemas de produção com elevado valor agregado (*e.g.*, cultivo protegido e produção orgânica de hortaliças e frutas), o mercado de bioestimulantes tem crescido nos últimos anos movido pela sua aplicação também em cultivos convencionais (COLLA e ROUPHAEL, 2015). No ano de 2019, o mercado global de bioestimulantes vegetais foi estimado em 2,19 bilhões de dólares, com projeções para alcançar 4,44 bilhões já em 2024 (MARKETSANDMARKETS, 2017).

Uma revisão crítica a respeito do uso de bioestimulantes na agricultura foi realizada por DU JARDIN (2015), que incluiu as substâncias húmicas (SH) como uma das oito possíveis categorias existentes. As SH são formadas a partir de transformações químicas, físicas e biológicas de resíduos orgânicos e podem contribuir para a regulação de muitos processos ecológicos e ambientais, incluindo o crescimento de plantas (CANELLAS et al., 2015). De acordo com ROSE et al. (2014), raízes e parte aérea das plantas podem ser aumentados, em média, em até 22% em função da aplicação exógena de SH. Esse estímulo de crescimento tem sido explicado principalmente devido ao efeito que essas substâncias exercem sobre a H⁺-ATPase, proteína diretamente envolvida na absorção de nutrientes, no desenvolvimento de raízes laterais e na expansão de celular (CANELLAS et al., 2002; ZANDONADI et al., 2010; RAMOS et al., 2015).

A ação das SH como estimulante vegetal, entretanto, envolve também outros mecanismos de defesa das plantas relacionados à atenuação de estresses promovidos pela escassez de água (MELO et al., 2017), excesso de sais (AYDIN et al., 2012) e de metais (DOBBSS et al., 2018; PITTARELLO et al., 2018). Aumentos na taxa de fotossíntese líquida

e na eficiência do uso da água também já foram reportados em plantas tratadas com SH (FAN et al., 2014; OLIVARES et al., 2015; BUSATO et al., 2017). Recentemente, CANELLAS et al. (2019) também observaram que as SH alteram o perfil de exsudação das raízes, liberando uma variedade de compostos que interferem na comunidade microbiana presente na rizosfera. Essa liberação poderia estimular a ação de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV), os quais podem interagir com as plantas e auxiliar no seu desenvolvimento por diferentes mecanismos.

O número de MPCV empregados como bioestimulantes vegetais é relativamente baixo considerando a biodiversidade natural desses organismos (OLIVARES et al., 2017), mas a literatura especializada reporta uma vasta gama de informações a respeito dos efeitos positivos de fungos e bactérias no controle de doenças, no aumento da oferta de nutrientes e no auxílio da defesa contra estresses abióticos (BALDOTTO et al., 2010; MELO et al., 2017; MATTEOLI et al., 2018). A liberação de células nos ápices radiculares (células de borda) desempenha um papel fundamental na detecção de alterações ambientais que necessitem de uma sinalização específica para a defesa das plantas (DRIOUICH et al., 2013). Essas células são liberadas mais intensamente quando as plantas são tratadas com SH, o que pode, também, favorecer a colonização de MPCV nas plantas de interesse (CANELLAS e OLIVARES, 2017). Assim, MARQUES JÚNIOR et al., (2008) relataram aumento no comprimento das raízes (de 60 a 118%) e área radicular (33 até 233%) quando toletes de cana-de-açúcar foram tratados com SH e *H. Seropedicae*. De maneira semelhante, SH aplicadas em conjunto com a mesma bactéria aumentaram o crescimento das raízes de milho e garantiu a sobrevivência da bactéria adicionada até a emissão de raízes por plantas (CONCEIÇÃO et al., 2008).

Apesar de todo potencial do uso de SH e MPCV, associados ou não, no desenvolvimento vegetal, o conjunto de resultados encontrados na literatura especializada envolvendo esses materiais é limitado a poucas espécies vegetais, em particular milho

(CANELLAS et al., 2013; RODRIGUES et al., 2017; MELO et al., 2018), cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018), alface (MEIRELLES et al., 2017; SHAH et al., 2018) e tomate (FREITAS et al., 2009; BERNADES et al., 2011). Plantas de ciclo longo ou mesmo espécies vegetais de interesse para a implantação de sistemas agroflorestais (SAFs) têm sido pouco exploradas nesse contexto. Particularmente para a região do Cerrado, a espécie florestal *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (guanandi) tem sido apresentada como uma boa alternativa para implantação de SAFs devido à sua habilidade de crescimento em solos de baixa fertilidade e alto valor agregado da madeira (MARTINOTTO et al., 2012). Assim, torna-se importante determinar se esses bioestimulantes interferem positivamente no desenvolvimento de mudas de guanandi, potencializando o povoamento com essa espécie florestal.

No presente trabalho, os efeitos da adição de SH extraída de vermicomposto de esterco bovino empregando-se NaOH (ácidos húmicos, AH) e água (extrato húmico solúvel em água, EHSA), associados ou não a soluções contendo bactérias potencialmente promotoras do crescimento de plantas, foram avaliados como bioestimulante capaz de acelerar o desenvolvimento inicial de mudas de guanandi. A hipótese é que as medidas biométricas das plantas, a taxa fotossintética e a eficiência de uso da água sejam positivamente alteradas com a aplicação conjunta dessas bactérias e AH ou EHSA.

2. Material e Métodos

2.1. Vermicompostagem e extração de ácidos húmicos e extrato solúvel em água- Para obtenção dos AH e EHSA, inicialmente foi realizado um processo de compostagem por 30 dias empregando-se de esterco bovino e palha seca de milho, em proporções capazes de garantir uma relação inicial C/N < 40/1. Após, as pilhas de composto foram colonizadas com minhocas da espécie *Eisenia foetida* na proporção de 1000 minhocas por m³ de composto. Ao

longo do processo, a umidade foi ajustada para valores entre 50 e 70%. A coleta do vermicomposto foi realizada 120 dias após o início do processo, quando já não apresentava as características da matéria-prima original.

Os AH foram então extraídos do vermicomposto conforme procedimento descrito em SANTOS et al. (2008). Para isso, foi utilizada NaOH 0,1 mol L⁻¹, como solvente na razão vermicomposto/extrator de 1:20 (m:v). O material foi agitado por 6 horas em atmosfera inerte de N₂, seguido de separação da fração solúvel por decantação e centrifugação. O extrato alcalino obtido teve o pH reduzido até 1,5-2,0 com H₂SO₄ 6 mol L⁻¹, forçando a precipitação dos AH, que foram separados da fração solúvel (ácidos fúlvicos) por decantação seguida de centrifugação. Os AH foram então redissolvidos e precipitados com NaOH e H₂SO₄ três vezes para a remoção de impurezas minerais, lavados repetidamente com água destilada e dialisados contra água destilada em membranas “cut-off” 14 kDa (Thomas Scientific, Inc). Os AH foram então congelados e secos por liofilização (L101, Liotop, São Paulo, Brasil).

Para obtenção do EHSA, empregou-se uma adaptação do método proposto por PINTON et al. (1998). Nesse caso, o vermicomposto e água aquecida a 70 °C (razão 1:20m:v) foram agitados por período de 4 horas, com posterior período de descanso para decantação da fração insolúvel. Após separação da fração solúvel por sifonação, o material insolúvel resultante sofreu nova extração, utilizando-se o mesmo procedimento, sendo o extrato obtido adicionado ao primeiro obtido. Os EHSA foram então congelados e secos por liofilização (L101, Liotop, São Paulo, Brasil).

2.2. Caracterização dos AH e EHSA - A avaliação da composição elementar foi realizada em automático CHN (CHN 2400 series, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) e as acidez total, carboxílica e fenólica foram determinadas de acordo com SCHNITZER e GUPTA, (1965). Para acidez total, 100 mg de cada material foram acondicionados em erlenmeyer contendo 50

mL de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ $0,125 \text{ mol L}^{-1}$, agitando-se por 24 h. A suspensão foi filtrada em papel filtro faixa azul e o material foi titulado com solução padronizada de HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ até pH $8,4 \pm 0,1$ com auxílio de um pHmetro (Tec 5, TECNAL, Piracicaba, São Paulo, Brasil) até pH $8,4 \pm 0,1$. Para acidez carboxílica, 100 mg de de cada material foram colocados em erlenmeyer contendo 50 mL de solução de $\text{Ca}(\text{COO})_2$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, em água livre de CO_2 , com agitação por 24 h seguida de filtração (papel faixa azul com poros de 0,125 mm). O resíduo foi lavado com água livre de CO_2 e titulado com solução padronizada de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até pH $9,8 \pm 0,2$. A acidez fenólica foi determinada pela diferença entre a total e a carboxílica.

A espectroscopia na região do infravermelho foi realizada utilizando-se pastilhas com 1 mg de AH em 100 mg de KBr, na faixa de 600 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} de número de onda, em um equipamento Varian 640 (Varian, Tóquio, Japão). Os espectros foram discutidos conforme (DENDISOVÁ et al., 2018; PALENCIA, 2018; ZHANG e ROEYERS, 2019). Para identificar e quantificar os principais grupamentos de C presentes no material, foi realizada análise de ressonância magnética nuclear de ^{13}C em um equipamento Bruker spectrometer (Bruker Avance III HD 600 MHz, Bruker, Germany) operando a 150.9 MHz. As amostras foram acondicionadas em rotor de zircônio, com parâmetro de giro de $10 \pm 1 \text{ KHz}$ e polarização cruzada com rotação no ângulo mágico (CPMAS), com tempo de aquisição de 22,5 ms, decaimento de 1,0 s e tempo de contato de 2,0 ms. Os espectros foram manipulados no software SpinWorks versão 3.1. e avaliados de acordo com MARTINEZ-BALMORI et al., (2014), em seis regiões: deslocamentos químicos entre 190 a 160 ppm (carbonilas de cetonas, quinonas, aldeídos e grupos carbonilas); de 160 a 140 ppm (fenóis e C aromático O-substituído); de 140 a 110 ppm (C aromático não substituído e olefínico); de 110 a 95 ppm (C anomérico); de 95 a 65 ppm (Sistemas O-alquil); de 65 a 45 ppm (substituição metoxi; N grupos alquílicos) e de 45 a 0 ppm (carbonos alquílicos, principalmente CH_2 e CH_3). As áreas referentes aos carbonos alquilo (0 a 45 ppm) e aromático/olefínico (110 a 160 ppm) foram

somadas para obtenção do índice de hidrofobicidade (HB). As áreas de 200 a 160, 110 a 95 e 95 a 5 ppm foram somadas para obtenção do índice de hidrofiliocidade (HI). A partir destas, obteve-se a relação HB/HI. O índice de aromaticidade (IA) foi definido em porcentagem da área do espectro de ^{13}C RMN na região dos grupos aromáticos (110-160 ppm) em relação à área total do espectro, excetuando-se as áreas do C carboxílico e carbonílico (Hatcher et al., 1981). Os resultados da caracterização das SH obtidos pelas diferentes técnicas descritas foram avaliados de maneira descritiva.

2.3. Produção das mudas de guanandi e testes preliminares – Sementes de guanandi foram obtidas de um viveiro comercial (mudas de sementes nobres – MG), e utilizadas para testes preliminares visando determinar possíveis concentrações ótimas de AH e EHSA capazes de estimular o desenvolvimento inicial das plantas. Para isto, as sementes foram inicialmente esterilizadas com hipoclorito de sódio a 10%, enxaguadas com água destilada e acondicionadas em canteiros com areia, em pleno sol, para germinação. Após 60 dias, plântulas contendo 4 a 6 pares de folhas receberam 400 mL de soluções contendo 0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 ou 40,0 mgL^{-1} de AH ou EHSA, aplicadas semanalmente. Após 60 dias, as mudas foram coletadas para avaliação de número de raízes (NR) e número de raízes laterais (NRL), por contagem manual, comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz principal (CRP); diâmetro do caule (DC) e da raiz principal (DRP), empregando-se um paquímetro digital (Stainless Hardened Aço inox 150 mm / 6"); índice de área foliar (IAF), a partir da obtenção de imagens e processamento no programa imageJ[®], massa fresca da parte aérea (MFA) e das raízes (MFR), em balança analítica (Marte/Shimadzu AUW); massa seca da raiz (MSR) e parte aérea (MAS), após secagem do material em estufa de circulação forçada (TE-394/4, Tecnal, São Paulo, Brasil) por 72 h a 65 °C e pesagem em balança analítica (Marte/Shimadzu AUW). Os dados obtidos foram modelados e, a partir da derivação

das equações obtidas, foram determinadas as concentrações ótimas para cada medida avaliada, sendo a concentração ótima empregada no experimento de crescimento de plantas de guanandi aquela resultante da média aritmética de cada valor determinado. O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições e os dados foram avaliados utilizando-se o software estatístico R (versão 3.2.2.).

2.4. Adição de bactérias, AH e EHSA às mudas – As bactérias com potencial para emprego como estimulantes do crescimento do guanandi foram previamente isoladas e identificadas por SOUZA et al. (2019). Foram selecionadas dois isolados pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter* devido à sua habilidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco, capacidade de fixação biológica de nitrogênio atmosférico e de produção de ácido indol-acético. As bactérias foram aplicadas isoladamente ou em conjunto com as concentrações ótimas de AH e EHSA (22,6 mg L⁻¹ e 25,55 mg L⁻¹, respectivamente) determinadas conforme tópico 2.3.

Para os testes visando determinar o potencial de estímulo ao crescimento, plântulas de guanandi obtidas conforme tópico 2.3. foram transplantadas para vasos de 2,0 L contendo substrato autoclavado formado por solo, vermiculita e areia, na proporção 3:1:1 (v:v:v). Os teores de nutrientes no substrato foram analisados conforme (EMBRAPA, 2009). Após as plântulas receberam adições da concentração mais eficiente de AH, EHSA, bactérias e combinações (AH+bact.; EHSA+bact.) além de um tratamento controle. Para isto, os AH e EHSA solubilizados em KOH 0,1 mol L⁻¹ e o pH da solução foi ajustado para 6,5 com HCl 0,1 mol L⁻¹, sendo aplicados quinzenalmente 100 mL planta⁻¹, por meio de pulverização foliar e diretamente na rizosfera. As bactérias selecionadas foram crescidas em meio LB, sendo aplicados 50 mL de solução (meio/bactérias) contendo as bactérias (10⁸ bactérias mL⁻¹). Para

ajuste da concentração bacteriana, utilizou-se leitura da densidade óptica em 640 nm, de acordo com a curva de crescimento da solução contendo as bactérias e o meio de cultura.

Assim, foram observados seis tratamentos: 1) Controle: mudas produzidas utilizando-se somente o substrato de crescimento vegetal autoclavado; 2) AH: mudas produzidas com o substrato, com adição de AH determinada; 3) EHSA: mudas produzidas com o substrato, com adição de EHSA determinada; 4) IM: mudas produzidas com o substrato, com aplicação dos isolados bacterianos (10^8 bactérias mL⁻¹); 5) AH+IM: mudas produzidas com o substrato, com adição de AH e IM. 6) EHSA+IM: mudas produzidas com o substrato, com adição de EHSA e IM. O material permaneceu em viveiro de produção de mudas separados a 50 metros de distância, em pleno sol, por um período de 150 dias, sendo regados diariamente, minimizando o máximo os riscos de contaminação dos tratamentos avaliados. Uma segunda aplicação das soluções contendo as bactérias nos tratamentos 3 e 4 foi realizada 60 dias após a primeira aplicação. Após atestada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, foi realizado teste F e, quando significativo, empregou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias.

2.5. Parâmetros relacionados às trocas gasosas e taxas fotossintéticas – Foram determinados empregando-se um sistema portátil de determinação de trocas gasosas por infravermelho (Infra-Red Gas Analyser) (LI-6400 XTR-Z, Analytical Development Company Limited, Nebraska, USA). As medições foram realizadas das 9 h às 11h 40 min (HALL et al., 1993), utilizando a última folha completamente desenvolvida, registrando cinco medições para cada folha, em intervalos de 20 a 30 s, avaliando-se a taxa líquida de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (gs), concentração de CO₂ nas cavidades subestomáticas (C_i) e a taxa de transpiração (E), sob irradiância de 1200 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração externa de CO₂ (C_a) de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. A eficiência no uso de água (EUA) foi obtida pela

relação entre (A/E) $[(\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1})^{-1}]$. Os parâmetros de fluorescência da clorofila A (Chl a) foram obtidos por meio de câmaras de fluorescência integradas na mesma pinça na qual os parâmetros de trocas gasosas foram mensurados, empregando-se, 5 repetições sorteadas em cada tratamento e realizando a avaliação da comparação das médias pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

2.5.1. Avaliações biométricas - Aos 150 dias foram avaliadas as características: NR por contagem manual; NRL por contagem manual com auxílio de lupa; CPA, com régua graduada, considerando-se da base do vaso (substrato) até a última ramificação foliar; CRP da base do vaso (substrato) até o final da raiz principal; DC e DRP, com paquímetro digital; IAF, a partir da obtenção de imagens fotográficas e processamento no programa digital imageJ[®]; MFA, MFR, MSR e MAS em balança analítica, sendo MSR e MAS obtidos após um período de 72 h em estufa a 65 °C (TE-394/4, Tecnal, São Paulo, Brasil). A densidade de raízes laterais foi também obtida a partir da relação entre NRL e CRP. Os resultados seguiram um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 20 repetições os dados foram avaliados utilizando-se o software estatístico R (versão 3.2.2.).

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição elementar, acidez total, carboxílica e fenólica dos AH e EHSA

A Tabela 1 apresenta a composição elementar e a distribuição dos componentes de acidez das SH empregadas no experimento.

Tabela 1 – Acidez total, fenólica, carboxílica, composição elementar e relações atômicas dos AH e EHSA extraídos de vermicomposto de esterco bovino.

	Acidez			Composição elementar				Relações atômicas		
	Acidez total	Acidez fenólica	Acidez carboxílica	C	H	N	O	C/N	H/C	O/C
 mmol _c g ⁻¹ g Kg ⁻¹ ...						
AH	6,0	3,5	2,5	442,5	68,1	27,4	461,3	18,84	1,85	0,78
EHSA	2,0	1,3	0,7	245,2	3,70	1,61	52,42	177,68	0,18	0,16

Os resultados demonstraram para os AH baixo conteúdo de C e N e elevado conteúdo de O, já para os EHSA o conteúdo de C, O e N também foram baixos quando comparado à média observada na literatura (GRIFFITH e SCHNITZERZ, 1975; CELI et al., 1997; BUSATO et al., 2010; CANELLAS et al., 2015; DOBBSS et al., 2016; PITTARELLO et al., 2018). Estes resultados demonstraram que a vermicompostagem foi caracterizada pela degradação da matéria orgânica responsável e pela formação de materiais húmicos LV et al. (2013), vez que essa variação no teor de C está relacionada às condições ambientais do vermicomposto e à própria heterogeneidade do mesmo (EBELING et al., 2011). Pode estar associado também a uma elevada acidez total do material, faixa que pode ser observada para material humificado menos condensado, como os ácidos flúvicos, o que implica SH pouco oxidadas e menor intensidade do processo de humificação para este trabalho (CANELLAS et al., 2015). Observa-se que pode ocorrer bloqueio dos grupamentos funcionais oxigenados pela formação de complexos MENDONÇA e ROWELL (1996). Esses bloqueios podem diminuir a evolução química das SH promovendo acúmulo de ácidos fúvicos ou de AH com baixo grau de humificação (DOBBSS et al., 2010). De fato, quando os EHSA foram avaliados em relação aos componentes de acidez, foi observada baixa acidez total (Tabela 1), sendo que o

comportamento mostrado pelos EHSAs deve ser atribuído às suas diversas características moleculares (PICCOLO et al., 2019).

O conteúdo de O sugere níveis elevados de oxidação nos AH obtidos do vermicomposto, que pode estar associado a uma elevada acidez total do material, faixa que pode ser observada para material humificado menos condensado, como os ácidos flúvicos, o que implica AH bastante oxidados e menor intensidade do processo de humificação (CANELLAS et al., 2015). De fato, quando os AH foram avaliados em relação aos componentes de acidez, foi observada baixa acidez total (Tabela 1). O AH apresentou valores de 2,5, 3,5 e 6,0 mmol_c g⁻¹, enquanto que EHSAs foram de 0,7, 1,3 e 2,0 mmol_c g⁻¹ para acidez carboxílica, fenólica e total, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com dados relatados por PERTUSATTI e PRADO (2007) divergindo para a acidez total 4,94 e 2,40 mmol_c g⁻¹, no entanto, está de acordo com DOBBSS et al. (2009), pois a acidez fenólica foi responsável por quase dois terços do H⁺ na acidez total das SH avaliadas por estes autores.

Considera-se essa variação em função da origem da SH analisada CANELLAS et al. (2005), onde a acidez fenólica representou a maior parte dos grupos reativos. PICCOLO (2002), SIERRA et al. (2004) e MAJI et al. (2017) associam a acidez fenólica das SH ao conteúdo de grupamentos hidroxilas que normalmente estão ligados a anéis aromáticos (fenóis) que pode ser também observado no tópico 3.2 do espectro de infravermelho. Para CANELLAS et al. (2005) e BALDOTTO e BALDOTTO (2014), as espécies fenólicas estão associadas a macromoléculas de lipídeos, onde a proeminência dos grupamentos carboxílicos e de OH-fenólicos sublinha a significatividade da acidez das SH.

Em comparação com esses resultados COTTA (2019) encontrou em um dos seus tratamentos avaliados para SH valores de 0,84, 4,33 e 5,17 mmol_c g⁻¹ para a acidez carboxílica, fenólica e total, o que permite associar estes resultados ao processo de estabilização, onde ocorre uma diminuição dos grupos alifáticos na estrutura da matéria

orgânica e a formação de anéis aromáticos substituídos, os quais são geralmente grupos carboxílicos, hidroxílicos e carbonílicos. Um dos aspectos mais estudados sobre as SH é a sua capacidade de complexação sendo abordada por PRADO et al. (1999) que obteve resultados divergentes ao deste trabalho valores de 2,33, 2,74 e 5,07 mmol g_c^{-1} para a acidez carboxílica, fenólica e total em função da origem das SH, o que de forma direta influi na capacidade de complexação com metais, que ocorre devido ao grande número de grupos funcionais. Essas frações de tamanho molecular maior tendem a apresentar quantidade relativa de C aromático, enquanto as frações de menor tamanho tendem a ser compostas por carbonos oxidados e menos compostos C aromáticos (CANELLAS et al., 2010).

A partir da composição elementar das SH, foram obtidas as razões atômicas C/N, H/C e O/C, AH (18,84; 1,85 e 0,78) e EHSA (177,68; 0,18 e 0,16) respectivamente (LU et al., 2000; MIRANDA et al., 2007). A razão H/C maior nos EHSA associa-se segundo estes autores, as transformações diagenéticas, bem como as condições ambientais sob as quais as substâncias húmicas foram formadas.

COTTA (2019) obteve em seus tratamentos avaliados as razões atômicas C/N, H/C e O/C, entre 24,87-21,38, 1,61-1,38 e 0,50-0,33, respectivamente, resultados que se relacionam aos deste trabalho, uma vez que, acelerada humificação do vermicomposto reflete em um decréscimo da C/N e o aumento de nutrientes minerais (P, K e Na), e está relacionada com a mineralização da matéria orgânica pelas minhocas. Para KAYHANIAN e TCHOBANOGLOUS (1993), a relação C/N do húmus estabilizado deve estar entre 15 a 20 (razões atômicas) sendo divergente para os EHSA, no entanto, a razão C/N indica o grau de incorporação de nitrogênio na estrutura húmica e é considerada um dos mais simples métodos para se avaliar a capacidade de assimilação pelas plantas do nitrogênio (COTTA, 2019).

A razão atômica O/C maior nos AH estima a abundância de oxigênio contido em grupos funcionais, relacionada com os teores de carboidratos, sendo que para BUDZIAK et

al. (2004) as razões O/C aumentaram e diminuíram de valor no decorrer da compostagem, indicando processos oxidativos mais fortes no início da compostagem, e de redução no final o que pode ser associado as diferenças entre os AH e EHSA. Para BALDOTTO e BALDOTTO (2014), as razões O/C indicam o teor de grupos oxigenados presentes na molécula, de forma que as razões H/C e C/N tendem a diminuir a razão O/C estando de acordo com os resultados deste trabalho.

A razão atômica O/C pode ser estimada pela abundância de oxigênio contido em grupos funcionais, relacionada com os teores de carboidratos das SH; para BALDOTTO e BALDOTTO (2014), as razões O/C indicam o teor de grupos oxigenados presentes na molécula, de forma que as razões H/C e C/N tendem a diminuir a razão O/C. A relação C/N indica o grau de incorporação do N na estrutura das SH e conseqüente grau de humidificação (JARBAS et al., 2007), pois quanto menor a razão atômica H/C, maior a resistência à termodegradação, indicando alta resistência de estruturas aromáticas a processos de oxidação estando relacionada com o grau de aromaticidade (BOTERO, 2010).

3.2. Espectroscopia na região do infravermelho

De modo geral, os espectros de AH e EHSA apresentam nove bandas de absorção bem definidas, conforme observado na (Figura 1).

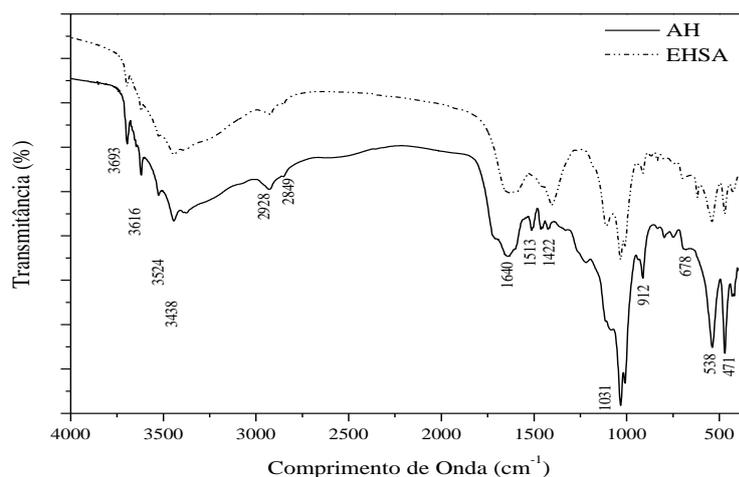


Figura 1- Espectros de infravermelho de AH e EHSA extraídos de vermicomposto de esterco bovino.

Há uma banda de absorção com centro em 3.524 cm^{-1} (variando de 3.693 a 3.438 cm^{-1}) devido ao estiramento de ligações O-H de vários grupos hidroxilados, mas principalmente ácidos carboxílicos capazes de fazer ligações hidrogênio que alteram a frequência de estiramento. Na faixa espectral de comprimentos de 3.440 - 3.300 cm^{-1} , verificou-se a presença de uma banda de absorção, referente, a estiramento COOH em H, de modo que a força das ligações intermoleculares indica a extensão do alargamento. Quanto mais ligações de H, mais ácido é o material analisado e mais larga é a absorção nessa região (DIAS et al., 2009). A quantidade de oxigênio pode ser relacionada à presença de grupos funcionais na superfície das SH (DE SOUZA e BRAGANÇA, 2017) e o mesmo pode ser dito sobre a presença de hidrogênio. Os grupos representados pelas bandas 3616 cm^{-1} , 2600 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} , nas quais a última banda é atribuída ao alongamento C=O, e ao alongamento e deformação OH no grupo COOH, respectivamente (TROMPOWSKY et al., 2005; DE SOUZA e BRAGANÇA, 2017). A banda em torno de 3438 cm^{-1} está relacionada com estiramento de OH de

grupamentos carboxílicos, fenólicos, álcoois e da água ligada (SANCHES et al., 2007; DIAS et al., 2009).

Observou-se uma aguda e bem definida banda de absorção centrada em 2.928 cm^{-1} devido ao estiramento simétrico de ligações C-H, principalmente de grupos metil (CH_3); são atribuídas aos estiramentos antissimétrico e simétrico de C-H dos grupos alifáticos (SANCHES et al., 2007; DOSKOČIL et al., 2018). A banda distinta ocorrendo em torno de 1640 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento de grupos C=C em anéis aromáticos (DOSKOČIL et al., 2018).

A banda de absorção em 1.690 cm^{-1} (variando entre 1.712 cm^{-1} e 1.640 cm^{-1}), atribuída genericamente à presença de carbonilas (C=O) em cetonas e aldeídos; uma banda de absorção intensa e alargada em 1.623 cm^{-1} (1.640 cm^{-1}) atribuída à presença de uma série de estiramento simétricos de ligações C=O de grupos COO^- , banda de amida e quinonas; banda de absorção centrada em 1.513 cm^{-1} , devido a estiramentos C-C de anéis aromáticos (indicador da presença de ligninas) e sistemas N=C conjugados; uma banda de absorção em 1.422 cm^{-1} atribuída à deformação de ligações C-H de grupos metil e metilenos; uma banda de absorção bem definida centrada em 1.198 cm^{-1} atribuída à presença de deformação de O-H em grupos carboxílicos e ligações éster (C-O) e, ainda, à presença de fenóis.

Uma banda de absorção em 1.086 cm^{-1} e 1.031 cm^{-1} devida a estiramentos C-O de polissacarídeos nos AH. Por fim, as bandas de absorção entre 800 e 912 cm^{-1} atribuídas a vibrações de ligações C-H de grupos aromáticos e de impurezas inorgânicas e organometálicas (DOBBSS et al., 2009). A comparação da região de impressão digital (1400 a 900 cm^{-1}) com o espectro de uma amostra padrão é de fundamental importância para confirmar a identidade da substância analisada. Estes autores também afirmam que as bandas de deformação C-H fora do plano foram observadas na zona de $912\text{-}678\text{ cm}^{-1}$ e foram atribuídos a estruturas aromáticas com hidrogênios aromáticos isolados. DIAS et al. (2009) observaram

que a banda de absorção na zona de 1.510–1.540 cm^{-1} pode estar relacionada ao estiramento C=C aromático, cuja deformação ocorre de 800 cm^{-1} para baixo.

3.3. Ressonância magnética nuclear de ^{13}C

A participação de cada região observada nos espectros de RMN de ^{13}C é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2- Resultados obtidos por ressonância magnética nuclear de ^{13}C a partir dos AH extraídos de um vermicomposto.

Deslocamento químico (Integração da área *)								
0-45	45-65	65-95	95-110	110-140	140-160	160-190	HB/HI	IA
.....ppm.....								
22,3	20,8	22,4	7,2	16,1	4,8	6,4	1,92	20,9
25,4	19,3	24,1	6,5	11,3	3,5	9,9	1,89	14,8

*Valores referem-se à área relativa correspondente a cada região no espectro de ^{13}C .

O deslocamento do espectro entre 0 e 45 ppm apresentou 22,3% para os AH e 25,4% para os EHSA de longas cadeias alquílicas sem substituição que podem incluir cadeias lineares de carbono metílenos, provenientes, possivelmente de polissacarídeos incorporados às estruturas dos AH (CANELLAS et al., 2001). Estes contribuem para a região alifática do espectro que é composta por grupos $(\text{CH}_2)_n$ e grupos $(\text{CH}_3)_n$ terminais de compostos lipídicos de plantas e microrganismos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), como graxas e poliésteres alifáticos (DESHMUKH et al., 2005; CHEN et al., 2008).

A região entre 95 e 110 ppm com 7,2 e 6,5% dos AH e EHSA no espectro é associada à presença de carboidratos como unidades monoméricas de cadeias de polissacarídeos, presentes em tecidos vegetais com lignina (JOHNSON et al., 2005). A região entre 45 e 65

ppm foi responsável por 20,8 e 19,3% dos AH e EHSA no espectro pode ser associada ao substituinte metoxil em anéis aromáticos de guaiacila e siringila (unidades da estrutura da lignina) ou a ligações C-N em aminoácidos (HATCHER, 1987). AGUIAR et al. (2013) e MARTINEZ-BALMORI et al. (2014) identificaram os mesmos grupos funcionais entre 140 e 160 ppm, o deslocamento químico representou 4,8 e 3,5% da área do espectro das SH no presente trabalho, sendo essa região atribuída a carbono alquil com N-substituído em proteínas e peptídeos.

Na região entre 65 e 95 ppm, representam 22,4 e 24,1% no espectro dos AH e EHSA, picos referentes à presença de carbono ligado a substituintes de oxigênio e/ou carbonos ligados a grupos de éteres, atribuíram-se os sinais à presença de carbono ligados a grupos aromáticos e fenólicos (DIGNAC et al., 2002; SIMPSON e SIMPSON, 2012). A região entre 110-160 ppm apresenta ocorrência de anéis aromáticos, especificamente entre 110 e 140 ppm representam 16,1 e 11,3% do espectro com ocorrência de grupos fenólicos para as SH aqui analisadas. A região entre 160 e 185 ppm representam 6,4 e 9,9% no espectro dos AH e EHSA está relacionada a grupos carboxílicos que determinam o grau de hidrofobicidade das SH (SIMPSON e SIMPSON, 2012; OLIVEIRA, 2015). É importante ressaltar, segundo WEN et al. (2013), que alguns problemas, tais como, atribuições e quantificações de sinais mais precisas são difíceis de serem resolvidos devido à sobreposição de sinais e outros fatores.

O índice de hidrofobicidade de 1,92 e 1,89 para os AH e EHSA corresponde aos componentes hidrofílicos AGUIAR et al. (2013), esse índice segundo DOBBSS et al. (2009) está associado à capacidade de oxidação e grau de aromaticidade, que neste trabalho foi de 20,9 e 14,8% dos AH e EHSA respectivamente, valores semelhantes aos encontrados na literatura (DOBBSS et al., 2010; AGUIAR et al., 2013). A distribuição não-uniforme da hidrofobicidade da matéria orgânica no solo pode retardar a entrada de água nos agregados e, assim, aumentar sua resistência à hidratação (SULLIVAN, 1990). Desta forma, SH que

contêm natureza mais hidrofóbica são capazes de formar agregados mais estáveis do que aqueles que possuem natureza mais hidrofílica (AGUIAR et al., 2013) mostrando que SH, com maior grau de hidrofobicidade (C-aromático + C-alquílico), apresentam maior capacidade de estimular sistemas biológicos (DOBBSS et al., 2010). A importância da hidrofobicidade da matéria húmica no crescimento radicular tem sido demonstrada em vários estudos (CANELLAS et al., 2015). Dentre estes estudos Spaccini et al. (2000) provaram que biomoléculas liberadas no solo durante a mineralização de resíduos de milho foram protegidas da degradação microbiana por componentes hidrofóbicos circundantes.

O processo de humificação decorrente da vermicompostagem demonstra mudanças estruturais na conformação das SH, tais como alterações na composição elementar, grupos funcionais e hidrofobicidade (AGUIAR et al., 2013). SH com maior grau de hidrofobicidade usualmente apresentam maior capacidade de estimular desenvolvimento vegetal (DOBBSS et al., 2010).

3.4. Testes com plantas

3.4.1. Testes preliminares com AH para verificação de possível concentração ótima –

A Tabela 3 indica o modelo de concentração-resposta para as diferentes variáveis avaliadas a partir da aplicação de soluções contendo AH. Para o guanandi, as concentrações ótimas modeladas variaram de 9,37 mg L⁻¹, para CPA, até 32,93 mg L⁻¹, para MFA. A média geral obtida com as concentrações ótimas de todas as variáveis avaliadas foi de 22,6 mg L⁻¹, sendo esta empregada no experimento posterior.

Tabela 3- Modelo de concentração-resposta, coeficiente de correlação (R^2), número de unidades que integram a amostra (n), nível de significância da regressão (valor- p) e ponto de inflexão (concentração ótima) para CPA, NRL, IAF, MFA, MAS e DRL de mudas de guanandi, após 60 dias em tratamento com diferentes doses de ácidos húmicos.

Variável	Equação ($y = b_2x^2 + b_1x + b_0$)	R^2	N	p	Concentração ótima $mg L^{-1}$ (dx/dy): $b_1 + 2(b_2)x = 0$
CPA	$y = - 0,0042x^2 + 0,6787x + 12,53$	0,7825	8	<0,05	9,37
NRL	$y = - 0,0446x^2 + 1,9381x + 20,27$	0,8505	8	<0,05	21,73
IAF	$y = - 0,0174x^2 + 0,8091x + 21,96$	0,8613	8	<0,05	22,15
MFA	$y = - 0,0007x^2 + 0,0461x + 1,302$	0,8749	8	<0,05	32,93
MSA	$y = - 0,0002x^2 + 0,0113x + 0,401$	0,6668	8	<0,05	27,20
DRL	$y = - 0,0069x^2 + 0,2768x + 3,161$	0,7692	8	<0,05	20,05
MÉDIA					22,60

Para mudas de *Cattleya warnery var.*, a concentração ideal foi de $4,16 mg L^{-1}$ para melhor incremento em massa nas plantas (SILVA et al., 2015), enquanto que PINHEIRO et al. (2010) determinaram $4,30 mg L^{-1}$ para maior estímulo ao crescimento do diâmetro do caule em mudas de eucalipto.

3.4.2. Testes preliminares com EHSA para verificação de possível concentração ótima- A

Tabela 4 indica o modelo de concentração-resposta para diferentes variáveis avaliadas a partir da aplicação de soluções contendo EHSA. Para o guanandi, as concentrações ótimas modeladas variaram de $22,24 mg L^{-1}$, para DRL, até $27,99 mg L^{-1}$, para IAF. A média geral obtida com as concentrações ótimas de todas as variáveis avaliadas foi de $25,55 mg L^{-1}$, sendo esta empregada no experimento posterior.

Tabela 4 - Modelo de concentração-resposta, coeficiente de correlação (R^2), número de unidades que integram a amostra (n), nível de significância da regressão (valor- p) e ponto de inflexão (concentração ótima) para CPA, NRL, IAF, MFA, MAS e DRL de mudas de guanandi, após 60 dias em tratamento com diferentes doses de EHSA.

Variável	Equação ($y = b_2x^2 + b_1x + b_0$)	R^2	N	p	Concentração ótima mgL^{-1} (dx/dy): $b_1 + 2(b_2)x = 0$
CPA	$y = - 0,0048x^2 + 0,2587x + 10,27$	0,6765	8	<0,05	26,95
NRL	$y = - 0,0286x^2 + 1,3826x + 16,29$	0,9342	8	<0,05	24,17
IAF	$y = - 0,0097x^2 + 0,543x + 20,632$	0,7632	8	<0,05	27,99
MFA	$y = - 0,0005x^2 + 0,0242x + 1,3146$	0,8114	8	<0,05	24,20
MSA	$y = - 9,E-05x^2 + 0,005x + 0,4628$	0,7249	8	<0,05	27,77
DRL	$y = - 0,0075x^2 + 0,3336x + 2,3353$	0,8759	8	<0,05	22,24
MÉDIA					25,55

Avaliações foram realizadas com duas variedades comerciais de sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench), 1G282 e 50a50 por VENDRUSCOLO et al. (2014) para composição dos tratamentos, expostos a cinco diferentes doses de substâncias húmicas (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mL Kg⁻¹), não ocorrendo efeito das doses de substâncias húmicas na germinação e crescimento inicial de plântulas de sorgo. Essas concentrações são inferiores as aqui testadas, mas vale ressaltar que não se trata de uma florestal. Para mudas de *Cattleya warnery var.*, a concentração ideal foi de 4,16 mg L⁻¹ para melhor incremento em massa nas plantas, SILVA et al. (2015), enquanto PINHEIRO et al. (2010) determinaram 4,30 mg L⁻¹, para maior estímulo ao crescimento do diâmetro do caule em mudas de eucalipto.

Das quatro doses (0,1,0, 3,0 e 5,0 mg L⁻¹) testadas por RODRIGUES et al. (2018), a dose 3,0 mg L⁻¹ de C de AH de Fertiactyl GZ® e de AH-Alternativo promoveu, respectivamente, maior massa seca da parte aérea e maior massa seca da raiz. Observa-se que os efeitos nas plantas de guanandi são próximos, tendo uma variação de 5,750 mg L⁻¹ entre a menor concentração e a maior. Alterando desta forma tanto a morfologia da parte aérea

quanto do sistema radicular, sendo a concentração ótima da aplicação dos EHSAs sobre vegetais, dependente de estudos preliminares que definam a concentração ótima para cada espécie (BALDOTTO e BALDOTTO 2014).

3.4.2. Trocas gasosas e das taxas fotossintéticas nas mudas sob adição de AH(concentração ótima), EHSAs(concentração ótima), IM, AH+IM e EHSAs+IM

Durante o período da realização do experimento, a temperatura variou entre 17,2 °C e 27,2 °C. A temperatura média registrada diariamente às 9h foi de 20,2 °C ± 2,1. Nestas condições, observou-se que, no intervalo de 150 dias de crescimento, foi definida a curva de luz para o guanandi (Figura 2 A), sendo a Densidade de Fluxo de Fótons (DFFF) para a avaliação a pleno sol variando ao longo do dia de 2,03 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 2010,2 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

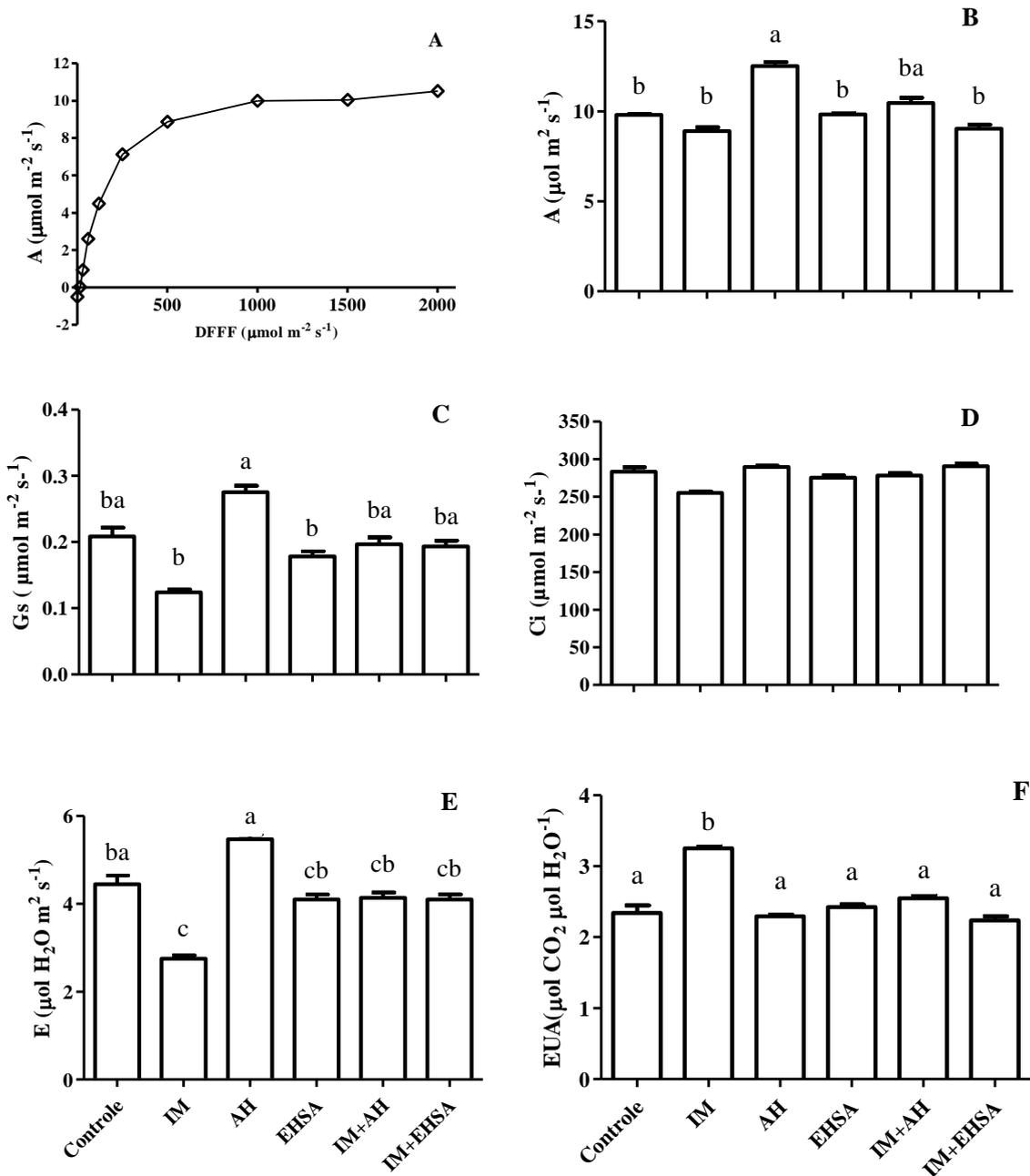


Figura 2 - (A) Curva de luz do guanandi, sendo: taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) em função da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFF), **(B)** Taxa Fotossintética (A- $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **(C)** Taxa de concentração de CO₂ (Ci- $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **(D)** Condutância estomática (gs- $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **(E)** Eficiência no uso da água (EUA- $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol H}_2\text{O}^{-1}$); **(F)** Taxa de transpiração (E- $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), submetidas a diferentes tratamentos aos 150 dias. Barras contrastam os tratamentos com controle. Letras referem-se ao teste de Tukey ($p < 0,05$), ausência de letras refere-se a falta de significância entre os tratamentos.

Os estudos de fluorescência da curva de luz se iniciaram através de observações realizadas por KAUTSKY, H. e HIRSCH (1931), onde foi constatado que em uma transição de escuro para a luz a intensidade de fluorescência inicial aumenta, seguida por um declínio até chegar a um nível constante. Para ocorrência do aumento da fitomassa em cultivos, tal fato depende principalmente do desenvolvimento da área foliar (dossel), e do período de desenvolvimento, que a interceptação luminosa está associada (PEDREIRA e PEDREIRA, 2007). Embora tenham ocorrido diferenças na taxa de assimilação líquida de CO₂ (Figura 2A) entre os tratamentos, essas podem repercutir em diferenças na produtividade final em escalas silviculturais, afetada pela incorporação de biomassa nas plantas, demonstrando-se que é mais determinante na produtividade do que a atividade fotossintética (DALASTRA et al., 2014).

Os resultados para *A* (Figura 2B) foram significativamente diferentes com maior rendimento associado ao tratamento AH e menor ao IM, com médias 12,52 e 8,9 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente. Do ponto de vista fisiológico, a taxa fotossintética responde diretamente a fatores ambientais como luz, concentrações de CO₂ do ambiente e temperatura, ou indiretamente a fatores como a umidade do ar e umidade do solo, através dos efeitos do controle estomático (TAIZ e ZEIGER, 2007). A razão do menor rendimento ser associado ao tratamento IM é abordada por GONÇALVES et al. (2010), pois a inibição da fotossíntese induzida pelo estresse fisiológico/hídrico pode ser devida à limitação estomática em função da presença dos microrganismos, como verificado em quatro diferentes espécies de gramíneas por GHANNOUM et al. (2003). Porém, no presente trabalho, verificou-se que tanto *g_s* como *E* apresentaram reduções superiores às observadas em *A* sob as mesmas condições para o tratamento IM, sendo possível afirmar que nas trocas gasosas o fator fisiológico *A*, foi afetado pelo tratamento IM. Dado este antagônico ao tratamento AH que favoreceu o desenvolvimento das mudas podendo ser utilizado em conjunto como bioinsumo para a espécie conforme média de 15% superior no tratamento IM+AH com 10,46 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

A redução de A pode ser associada, segundo CAMPELO et al. (2015), ao déficit hídrico que ocorrem por diversas razões, tais como g_s ao fluxo de CO_2 , danos ao aparato fotoquímico da fotossíntese. Estes autores observaram que para as espécies mogno e ipê-rosa, por exemplo, verificou-se redução do C_i apenas no mês de novembro, enquanto para o guanandi verificou-se redução nos meses de novembro (manhã e tarde) e fevereiro (tarde), o que também pode ter contribuído para a redução nas taxas de fotossíntese. A redução do g_s no tratamento IM em 41% pode ser associada às observações de SOUSA et al. (2019) que afirmam que aumentos na temperatura foliar, ou mesmo presença do estresse em função das bactérias, podem ser ligados tanto à condutância reduzida dos estômatos, como às taxas de transpiração. Para eles, a evaporação da água do mesófilo das folhas provoca o resfriamento das folhas, portanto, a perda latente de calor pela transpiração é fundamental para que as plantas consigam manter a temperatura foliar dentro de limites que não causem danos, justificando a redução do g_s no tratamento IM. Para manter a função e o metabolismo normal, as plantas desenvolveram mecanismos fisiológicos para manter o turgor tecidual e a abertura estomática, de modo a maximizar a eficiência fotossintética (MASHILO et al., 2017).

Houve redução na C_i (Figura 2D), no entanto, os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si. A provável associação desses resultados pode ser feita em função do fechamento estomático, conforme relato de DALASTRA et al. (2014). Estes autores obtiveram respostas de curto prazo de plantas de café submetidas à atmosfera enriquecida de CO_2 em condições diversas, apontam para o efeito mitigador do CO_2 sobre o déficit hídrico, por meio do aumento das taxas fotossintéticas e manutenção no acúmulo de carboidratos nas folhas e raízes do cafeeiro (SANCHES et al., 2018). Assim independentemente da disponibilidade hídrica, pois todos os tratamentos receberam a mesma frequência de irrigação, o comportamento metabólico das plantas nos tratamentos Controle, AH e EHSA para a C_i foi equivalente, sendo afetado apenas os tratamentos com

microrganismos. No entanto SILVA et al. (2015) ao realizar testes de trocas gasosas em plantas, observaram aumento linear do C_i na ordem de 24,14% à medida que se aumentaram as lâminas de irrigação e a disponibilidade hídrica, a justificativa associa-se ao tipo de experimento que não inclui microrganismos nem SH, mas exclusivamente o deficit hídrico no comportamento das plantas avaliadas.

A redução da g_s pode limitar a taxa de retenção de CO_2 e, conseqüentemente, a concentração C_i diminui nos espaços intercelulares devido ao consumo de CO_2 pela atividade fotossintética (DALEY et al., 2008). Os resultados para o g_s (Figura 2C) não foram significativamente diferentes sendo as médias dos tratamentos AH com $0,28 \mu\text{olm}^2\text{s}^{-1}$ o melhor tratamento e IM o menor com $0,13 \mu\text{olm}^2\text{s}^{-1}$. Esses resultados podem ser baseados no fato de que os AH são considerados a fração mais bioativa das SH, apresentando maior rendimento e produtividade nos diferentes níveis de organização dos vegetais interferindo em sua fisiologia (BALDOTTO e BALDOTTO, 2014; BUSATO et al., 2017; SABAH e OUKI, 2017; ZANDONADI et al., 2018). O estresse causado pelos microrganismos pode ser considerado uma restrição à produção e estabilidade das plantas (HEINEMANN, 2010), como exemplo, diversos mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves nos metabolismos primário e secundário, influenciando de forma direta em seu crescimento, e conseqüente comprometimento na produção em sistemas florestais (STANGARLIN et al., 2011).

Os resultados para EUA apresentaram diferença significativa. Verificou-se que a deficiência hídrica foi 27,94% maior para o tratamento IM (Figura 2F). Além dos mecanismos intrínsecos de tolerância a diferentes tipos de estresse abiótico, as plantas podem associar-se a microrganismos do solo para suportar condições adversas (PAGANO et al., 2008). Para BARROS et al. (2018), mais de 80% das plantas terrestres realizam associações

simbióticas com microrganismos. Para eles, a simbiose pode minimizar os efeitos negativos da deficiência hídrica através do aumento da captação de água. Fato esses que divergiram nesse experimento para as bactérias testadas que elevaram os níveis de estresse das plantas e, conseqüentemente, elevando as taxas de utilização hídrica, interferindo, assim, também, na aquisição e translocação de nutrientes.

Um aumento da incidência de estresses abióticos impactam negativamente o crescimento e a produtividade das plantas em função da carência de água no solo (ETESAMI e MAHESHWARI , 2018). Para estes autores, o crescimento da planta sob as condições de estresse será menor do que as condições de não-estresse, sendo necessário reduzir os efeitos adversos do estresse das plantas, pois tais condições não podem ser generalizadas, sendo o papel das interações de microrganismos vegetais benéficos e de grande importância econômica na produção silvicultural (PARIONA-LLANOS et al., 2010).

Os resultados para *E* (Figura 2E) apresentaram diferença significativa, sendo a média para o melhor tratamento AH 5,47 $\mu\text{ol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e para o tratamento IM apresentando o menor resultado em média 2,75 $\mu\text{ol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A maior transpiração é benéfica, pois esse fator está diretamente correlacionado com a taxa fotossintética (RAMÍREZ e HERRERA, 2017). A *EUA* é um importante mecanismo de adaptação fisiológica para melhorar a produtividade das culturas em condições de limitação hídrica (MEDRANO et al., 2015). No presente estudo, o *EUA* quando comparado ao controle, o tratamento IM+EHSa foi o único tratamento inferior ao controle com 4%. Em comparação a estes resultados SILVA et al. (2011) observaram em citros que o genótipo mais tolerante à salinidade aumentou a *EUA*, mantendo esta durante o período de exposição ao estresse salino. Assim, a presença das bactérias demonstra que as plantas de guanandi tiveram percepção do estresse hídrico, e que o aumento da *EUA* foi um bom indicador. Para SHIMAZAKI et al. (2007), a perda de água pelas plantas é regulada pela atividade das células-guardas, o tratamento IM foi eficaz para *E*

reduzindo em 38% a perda de água quando comparado controle, em que o aumento na transpiração das plantas, se deve, sobretudo, à inabilidade em absorver água suficiente para repor aquela consumida no processo transpiratório (FERRAZ et al., 2012; FERRAZ et al., 2014).

A redução de E é uma estratégia em que a planta desempenha em resposta a perda de água (ANDRADE et al., 2018), portanto, associa-se os resultados do guanandi avaliados a uma taxa de transporte de elétrons melhorada, como a fotorrespiração durante o estresse hídrico (MASHILO et al., 2018) em função da atividade bacteriana nos tecidos vegetais. Para MANDAL e JOSHI (2014), a maioria das espécies invasoras, como *Chromolaena*, exibem um crescimento vegetativo abundante quando a água é abundante, mas durante o estresse hídrico causado por desnutrição ou patógenos, o fechamento dos estômatos resulta em diminuição da condutância foliar, fotossíntese e transpiração (NAIDOO e NAIDOO, 2018).

Dentro dessa perspectiva de resposta ao tratamento IM ALVES et al. (2011), afirmam que parâmetros relacionados às trocas gasosas podem ser considerados indicadores não invasivos de resposta fotossintética sob condições de estresse biótico induzido pela presença de microrganismos. Para esse tipo de efeito, STERLING e MELGAREJO (2018) comprovaram que a análise desses indicadores mostraram que a infecção por microrganismos endofíticos patogênicos, ou não, causam reduções nas taxas fotossintéticas, podendo ser esses resultados aqui encontrados alterações em função da regulação negativa ou dano do aparelho fotossintético devido à ação bacteriana.

A diminuição da transpiração foliar reforça a ideia do estresse promovido por diversos fatores, causando desbalanço metabólico, levando assim ao colapso e desarranjo na formação e manutenção das estruturas da planta (MACHADO et al., 2010). INOUE (1988) observou que a transpiração é um fenômeno bastante influenciado pelas condições do ambiente, principalmente a temperatura e o déficit de saturação do ar. Para ele, sob idênticas condições,

diferenças neste parâmetro podem indicar um mecanismo estomático mais ou menos eficiente, implicando na economicidade de água pela planta, este é um parâmetro que expressa o potencial de assimilação de carbono em relação ao consumo de água através da transpiração (STROBL et al., 2017). É possível dessa forma recomendar SH na agricultura; com desenvolvimento do seu uso como sinergistas para melhorar a eficiência do uso de fertilizantes e a atividade de inoculantes microbianos (ROSE et al., 2014).

3.4.3. Análise biométrica do desenvolvimento das mudas de guanandi

Não houve diferença para as variáveis NF, DR, CRP, CPA, NRL e AF (Tabela 5). Já para DC, MFA, MSA, MFR e MSR observaram-se diferenças, sendo o tratamento IM+AH aquele com melhor rendimento para as variáveis avaliadas.

Tabela 5 - Efeito da adição de AH e EHSA e inóculo microbiano e da combinação de ambos sobre o desenvolvimento de mudas de guanandi.

Variável	Controle	IM	AH	EHSA	IM+AH	IM+EHSA
Nº Folhas (nº)	9,42±0,82 a	9,00±1,12 a	8,74±1,36 a	9,58±0,89 a	9,26±1,22 a	9,84±0,62 a
C.P. aérea (cm)	23,59±1,65 a	23,89±1,65 a	21,50±2,17 a	23,81±1,63 a	25,06±2,31 a	23,46±1,02 a
Nº Raiz Lateral	52,47±7,71 a	61,05±5,64 a	60,37±5,93 a	59,21±6,29 a	65,47±8,48 a	60,68±3,69 a
Raiz Principal (cm)	27,94±3,46 a	31,35±3,60 a	29,32±2,62 a	28,72±2,24 a	32,59±3,56 a	28,97±1,29 a
D. Caule (mm)	5,10±0,40 b	5,26±0,46 b	5,62±0,53 ba	5,38±0,52 ba	6,21±0,47 a	5,18±0,23 b
D. Raiz (mm)	4,26±0,28 a	4,27±0,36 a	3,95±0,35 a	4,27±0,40 a	4,51±0,41 a	4,11±0,20 a
Área Foliar (cm ²)	9,07±1,03 a	8,44±1,15 a	8,40±1,26 a	8,99±1,29 a	8,92±1,33 a	7,69±0,44 a
M. Fresca Aérea(g)	4,11±0,44 ba	4,17±0,61 ba	3,91±0,58 b	4,27±0,64 ba	5,21±0,76 a	3,97±0,24 b
M. Fresca Raiz (g)	6,58±0,63 b	7,17±1,21 b	6,65±0,76 b	6,77±0,96 b	9,12±1,00 a	6,58±0,52 b
M. Seca Aérea (g)	1,37±0,17 b	1,47±0,20 ba	1,32±0,19 b	1,43±0,22 b	1,86±0,28 a	1,31±0,09 b
M. SecaRaiz (g)	1,35±0,14 b	1,51±0,24 b	1,41±0,18 b	1,41±0,22 b	2,09±0,30 a	1,49±0,11 b

Valores referem-se à média seguida do desvio padrão. Letras comparam a mesma variável entre tratamentos, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras diferentes em cada linha são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O resultado médio encontrado para DC (Tabela 3), no tratamento IM+AH, foi 21,76% maior quando comparado ao controle. NERY et al. (2016), ao analisarem a distribuição percentual da alocação de biomassa nos diferentes órgãos das plantas, verificaram que, em média, 45% de fotoassimilados foram alocados para as raízes em todos os níveis de sombreamento por eles avaliados. Os efeitos apresentados pelos tratamentos podem estar associados à presença de compostos semelhantes às auxinas nas SH, contribuindo para o crescimento das plantas, especialmente do sistema radicular (CANELLAS et al., 2002; BUSATO et al., 2010). Esses resultados demonstram o efeito benéfico destes bioestimulantes pois, em corroboração com este trabalho NERY et al. (2016) obteve cerca de 20% a 25% da biomassa seca produzida pelas plantas de guanandi, sendo alocadas para o caule, não havendo diferenças entre os tratamentos por eles testados.

Essas diferenças revelam que a espécie apresenta plasticidade anatômica, adaptando-se a diferentes condições ambientais, como observado anteriormente para outras espécies florestais (LIMA JR. et al., 2006; NERY et al., 2016). O Tratamento IM+EHSA para as variáveis MSA, CPA e DR apresentou resultados inferiores ao controle 4%, 1% e 4%, respectivamente. Já para o IM, a variável NF foi a única inferior ao controle, sendo 4%. Os dois tratamentos com bactérias IM e IM+EHSA apresentaram 11% e 10% mais MSR do que o controle, estando de acordo com os resultados de ROESCH et al. (2006), pois com relação ao acúmulo de matéria seca nas raízes, a análise estatística demonstrou similaridade entre os três tratamentos inoculados por estes autores. Já SPOLAOR et al. (2016) diverge dos resultados, pois para estes autores o desdobramento da interação inoculação *versus* doses de N ou bioestimulantes realizado, apesar de não ter sido significativo, na interação de ambos em seus experimentos a adição de N-fertilizante em cobertura no solo não proporcionou nenhum

incremento de produtividade aos tratamentos, sugerindo que essas tecnologias são competitivas e não aditivas.

Os valores de MSA e MSR para o tratamento IM+AH foram 35,77% e 54,81% maiores quando comparados ao controle. Isso se baseia no fato de que as SH são consideradas recalcitrantes à atividade microbiana, sendo possível usá-las para introduzir microrganismos benéficos no campo (CANELLAS et al., 2015). Considerando-se o guanandi, este apresenta lento desenvolvimento por se tratar de uma espécie florestal, este tipo de trabalho favorece as tecnologias silviculturais com benefícios na tecnologia de produção. PARTIDA-MARTÍNEZ e HEIL (2011) afirmam que os incrementos produtivos resultantes dessas interações somente poderão ocorrer se os microrganismos proporcionarem benefícios que excedam o custo metabólico das plantas. Os AH e EHSA sozinhos ou em conjunto com IM atuaram como bioestimulantes nas plantas de guanandi, de forma positiva, pois, na maior parte das variáveis avaliadas, foram capazes de promover o aumento dos tecidos e órgãos vegetais (CANELLAS et al., 2002; FAÇANHA et al., 2002). Segundo FREITAS, et al. (2014), isso ocorre pelo fato de que a bioatividade das SH tem-se concentrado nas frações solúveis em água ou de baixo peso molecular, porque essas substâncias podem acessar mais facilmente possíveis receptores na superfície da membrana plasmática ou o interior da célula, sendo que a dimensão molecular não é decisiva na bioatividade das SH (CANELLAS et al., 2019).

O NRL para o tratamento IM+AH foi 19,86% maior quando comparado ao controle. Estes resultados podem estar associados ao fato de que o crescimento vegetal pode variar conforme sua origem, e seus efeitos indiretos mediados pela ação das SH na rizosfera (porosidade, textura de agregação, respiração, pool de nutrientes biodisponíveis, atividade da microbiota e assim por diante), enquanto que os efeitos diretos são aqueles ligados à ação das SH no desenvolvimento da planta a partir de sua interação com as membranas celulares na

superfície da raiz (OLAETXEA et al., 2017). Ambos os tratamentos IM e IM+EHSA apresentaram um aumento de 16% para o NRL. O NRL favorece a produção de mudas de guanandi, uma vez que se trata de uma das etapas mais importantes no processo produtivo voltado para os SAFs, para fornecer plantas com qualidade comercial e competitiva. De acordo com BORCIONI et al. (2016) e ZANDONADI et al. (2016), o NRL aumenta a área superficial radicular, refletindo de forma direta na rizosfera, representando um benefício do tratamento com SH. Diante dos dados apresentados, comprova-se que o uso de SH e IM como bioestimulantes vêm demonstrando alterações positivas no desenvolvimento de algumas culturas melhorando aspectos como fisiologia, absorção de nutrientes e metabolismo (SANTOS et al., 2017).

Assim como ocorre na presença de auxinas, a aplicação de AH resulta em indução de raízes e expansão celular, associada ao aumento da atividade bioquímica e expressão dos genes que codificam para as ATPases (ZANDONADI et al., 2007). Os resultados confirmam a hipótese de que o efeito de estimulação sobre o crescimento vegetal é, pelo menos em parte, benéfico para o desenvolvimento da espécie aumentando o seu rendimento durante os 150 dias de avaliação.

4. Conclusões

Os objetivos do estudo foram alcançados, mostrando que a aplicação de AH e EHSA com bactérias evidenciou alterações em todos os tratamentos. A hipótese de que as medidas biométricas das plantas, e o conteúdo de nutrientes, a taxa fotossintética e a eficiência de uso da água fossem positivamente alteradas com a aplicação conjunta dos AH e MPCV foi alcançada, sendo que a aplicação de AH em conjunto com microrganismos, promoveu um aumento médio de 35,77% e 54,81% da massa seca, o mesmo foi observado com relação ao diâmetro do caule, com um aumento de 21,76% de incremento. Destacou-se que o tratamento

IM acarretou deficiência hídrica nas mudas, reduzindo em 27,94% a quantidade de água e redução do *gs* em 41% e *A* 9%. Diante destes resultados, é possível afirmar que a combinação do efeito de promoção do crescimento biométrico característico das SH com a inoculação de bactérias foi favorável à aplicação isolada, estimulando, assim, o uso desse bioestimulante em sistemas agroflorestais e produção madeireira.

5. Referências

Adil Aydin, Turan, C.K. and M., 2012. Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. *African J. Agric. Reseach* 7, 1073–1086. doi:10.5897/ajar10.274

Aguiar, N. de O., 2011. Características químicas e bioatividade de ácidos húmicos isolados de vermicompostos em diferentes estádios de maturação. Univ. Estadual do Norte Flum. Darcy Ribeiro Campos.

Aguiar, N. O., Novotny, E.H., Oliveira, A.L., Rumjanek, V.M., Olivares, F.L., Canellas, L.P., 2013. Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. *J. Geochemical Explor.* 129, 95–102. doi:10.1016/j.gexplo.2012.10.005

Aguiar, Natália O, Olivares, F.L., Novotny, E.H., Dobbss, L.B., Balmori, D.M., Santos-Júnior, L.G., Chagas, J.G., Façanha, A.R., Canellas, L.P., 2013. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant Soil* 362, 161–174. doi:10.1007/s11104-012-1277-5

Alves, A.A., Guimarães, L.M. da S., Chaves, A.R. de M., DaMatta, F.M., Alfenas, A.C., 2011. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in

response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiol. Plant.* 33, 1831–1839.
doi:10.1007/s11738-011-0722-z

Andrade, J.R. de, Maia Júnior, S. de O., Silva, R.F.B. da, Barbosa, J.W. da S., Nascimento, R. do, Alencar, A.E.V. de, 2018. Trocas Gasosas Em Genótipos De Feijão-Caupi Irrigados Com Água Salina. *Rev. Bras. Agric. Irrig.* 12, 2653–2660.
doi:10.7127/rbai.v12n300829

Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Olivares, F.L., Viana, A.P., Bressan-Smith, R., 2010. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 34, 349–360. doi:10.1590/S0100-06832010000200008

Baldotto, M.A., Baldotto, L.E.B., 2014. Ácidos húmicos. *Rev. Ceres* 61, 856–881.
doi:10.1590/0034-737x201461000011

Barros, V., Frosi, G., Santos, M., Ramos, D.G., Falcão, H.M., Santos, M.G., 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi improve photosynthetic energy use efficiency and decrease foliar construction cost under recurrent water deficit in woody evergreen species. *Plant Physiol. Biochem.* 127, 469–477. doi:10.1016/J.PLAPHY.2018.04.016

Bernades, Jarbas;Reis, Janaina; Rodrigues, J., 2011. Efeito da aplicação de substância húmica em mudas de tomateiro. *Gl. Sci. Technol* 4, 92–99.

Borcioni, E., Mógor, Á.F., Pinto, F., 2016. Aplicação de ácido fúlvico em mudas influenciando o crescimento radicular e produtividade de alface americana 1. *Rev. Cienc. Agron.* 47, 509–515. doi:10.5935/1806-6690.20160061

Botero, W.G., 2010. Substâncias húmicas: Interações com nutrientes e contaminantes. 75 f. : il. Araraquara : [s.n], 2010

Budziak, C.R., Maia, C.M.B.F., Mangrich, A.S., 2004. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. *Quim. Nova* 27, 399–403.

Busato, Jader Galba, de Carvalho, C.M., Zandonadi, D.B., Sodré, F.F., Mol, A.R., de Oliveira, A.L., Navarro, R.D., 2017. Recycling of wastes from fish beneficiation by composting: chemical characteristics of the compost and efficiency of their humic acids in stimulating the growth of lettuce. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 35811–35820. doi:10.1007/s11356-017-0795-3

Busato, J.G., Zandonadi, D.B., Dobbss, L.B., Façanha, A.R., Canellas, L.P., 2010. Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. *Sci. Agric.* 67, 206–212. doi:10.1590/S0103-90162010000200012

Busato, Jader G., Zandonadi, D.B., Mól, A.R., Souza, R.S., Aguiar, K.P., Júnior, F.B.R., Olivares, F.L., 2017. Compost biofortification with diazotrophic and P-solubilizing bacteria improves maturation process and P availability. *J. Sci. Food Agric.* 97, 949–955. doi:10.1002/jsfa.7819

Campelo, D.H. de, Araújo, J.D.M., Neves, A.L.R., Lacerda, C.F., Sousa, J.A., Correia, D., Bezerra, A.M.E., 2015. Leaf gas exchange and efficiency of photosystem II in adult plants of six forest species as function of the water supply in the soil. *Rev. Arvore* 39, 973–983. doi:10.1590/0100-67622015000500020

Canellas, L.P., Balmori, D.M., Médici, L.O., Aguiar, N.O., Campostrini, E., Rosa, R.C.C., Façanha, A.R., Olivares, F.L., 2013. A combination of humic substances and

Herbaspirillum seropedicae inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil* 366, 119–132. doi:10.1007/s11104-012-1382-5

Canellas, L.P., Olivares, F.L., 2017. Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid. *Plant Soil* 417, 403–413. doi:10.1007/s11104-017-3267-0

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Jones, D.L., Nebbioso, A., Mazzei, P., Piccolo, A., 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 196, 15–27. doi:10.1016/J.SCIENTA.2015.09.013

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Canellas, N.O.A., Mazzei, P., Piccolo, A., 2019. Humic acids increase the maize seedlings exudation yield. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 6, 1–14. doi:10.1186/s40538-018-0139-7

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R., 2002. Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H(+)-ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiol.* 130, 1951–1957. doi:10.1104/pp.007088

Canellas, L.P., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Spaccini, R., Olivares, F.L., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R., 2010. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere* 78, 457–466. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.018

Canellas, L.P., Santos, G. de A., Rumjanek, V.M., Moraes, A.A., Guridi, F., 2001. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 36, 1529–1538. doi:10.1590/S0100-204X2001001200010

Canellas, L.P., Velloso, A.C.X., Santos, G.D. a., 2005. Modelos estruturais de substâncias húmicas, *Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*.

Celi, L., Schnitzer, M., Nègre, M., 1997. Analysis of carboxyl groups in soil humic acids by a wet chemical method, fourier-transform infrared spectrophotometry, and solution-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. A comparative study. *Soil Sci.* 162, 189–197. doi:10.1097/00010694-199703000-00004

Chen, B., Li, Y., Guo, Y., Zhu, L., Schnoor, J.L., 2008. Role of the extradante lipids and polymeric lipids in sorption of organic contaminants onto plant cuticles. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1517–1523. doi:10.1021/es7023725

Colla, G., Roupael, Y., 2015. Biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 196, 1–2. doi:10.1016/j.scienta.2015.10.044

Cotta, J.A. de O., 2019. Ácidos húmicos: A dinâmica de mineralização durante biorremediação por vermicompostagem de solos contaminados por diesel. *Res., Soc. Dev.* 8, 1–20.

Conceição, P.M. da, Vieira, H.D., Canellas, L.P., Marques, R.B., Olivares, F.L., 2008. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 43, 545–548. doi:10.1590/S0100-204X2008000400015

Dalastra, G.M., De Moraes Echer, M., GuimarÃes, V.F., Hachmann, T.L., Inagaki, A.M., 2014. Trocas gasosas e produtividade de três cultivares de meloeiro conduzidas com um e dois frutos por planta. *Bragantia* 73, 365–371. doi:10.1590/1678-4499.206

Daley, P.F., Raschke, K., Ball, J.T., Berry, J.A., 2008. Topography of Photosynthetic Activity of Leaves Obtained from Video Images of Chlorophyll Fluorescence. *Plant Physiol.* 90, 1233–1238. doi:10.1104/pp.90.4.1233

De Souza, F., Bragança, S.R., 2017. Extraction and characterization of humic acid from coal for the application as dispersant of ceramic powders. *J. Mater. Res. Technol.* doi:10.1016/J.JMRT.2017.08.008

Dendisová, M., Jenišťová, A., Parchaňská-Kokaislová, A., Matějka, P., Prokopec, V., Švecová, M., 2018. The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review. *Anal. Chim. Acta* 1031, 1–14. doi:10.1016/j.aca.2018.05.046

Deshmukh, A.P., Simpson, A.J., Hadad, C.M., Hatcher, P.G., 2005. Insights into the structure of cutin and cutan from *Agave americana* leaf cuticle using HRMAS NMR spectroscopy. *Org. Geochem.* 36, 1072–1085. doi:10.1016/J.ORGGEOCHEM.2005.02.005

Dias, B. de O., Silva, C.A., Soares, E.M.B., Bettiol, W., Guerreiro, M.C., Belizário, M.H., 2009. Infravermelho na caracterização de ácidos húmicos de latossolo sob efeito de uso contínuo de lodo de esgoto. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 33, 885–894. doi:10.1590/S0100-06832009000400013

Dignac, M.-F., Knicker, H., Kögel-Knabner, I., 2002. Effect of N content and soil texture on the decomposition of organic matter in forest soils as revealed by solid-state CPMAS NMR spectroscopy. *Org. Geochem.* 33, 1715–1726. doi:10.1016/S0146-6380(02)00172-9

Dobbss, L.B., Barroso, A.L.P., Ramos, A.C., Torrico, K.S.N., Arçari, F.S. de S., Zandonadi, D.B., 2016. Bioactivity of mangrove humic materials on *Rizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* seedlings, Brazil. *African J. Biotechnol.*

Dobbss, L.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Peres, L.E.P., Azevedo, M., Spaccini, R., Piccolo, A., Façanha, A.R., 2010. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3681–3688. doi:10.1021/jf904385c

Dobbss, L.B., dos Santos, T.C., Pittarello, M., de Souza, S.B., Ramos, A.C., Busato, J.G., 2018. Alleviation of iron toxicity in *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) by humic substances. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 9416–9425. doi:10.1007/s11356-018-1193-1

Dobbss, L.B., Rumjaneck, V.M., Altoé, M., Carlos, A., Velloso, X., Canellas, L.P., 2009. Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de latossolos brasileiros. *R. Bras. Ciências do Solo* 51–63. doi:10.1590/S0100-06832009000100006

Doskočil, L., Burdíková-Szewieczková, J., Enev, V., Kalina, L., Wasserbauer, J., 2018. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *Fuel* 213, 123–132. doi:10.1016/J.FUEL.2017.10.114

Driouich, A., Follet-Gueye, M.L., Vitré-Gibouin, M., Hawes, M., 2013. Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 489–495. doi:10.1016/j.pbi.2013.06.010

Du Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 196, 3–14. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.021

Ebeling, A.G., dos Anjos, L.H.C., Perez, D.V., Pereira, M.G., de Freitas Gomes, F.W., 2011. Atributos químicos, carbono orgânico e substâncias húmicas em organossolos háplicos de várias regiões do Brasil. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 35, 325–336. doi:10.1590/S0100-06832011000200004

Embrapa, 2009. Manual de análises químicas de solos , plantas e fertilizantes Manual de análises químicas de solos , plantas e fertilizantes. 2. ed. rev. ampl. - Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica.

Etesami, H., Maheshwari, D.K., 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 225–246. doi:10.1016/J.ECOENV.2018.03.013

European Biostimulants Industry Council, 2018. European Biostimulants Industry Council | Promoting the biostimulant industry and the role of plant biostimulants in making agriculture more sustainable.

Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G. de A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz-Filho, R., Oliveira, M.A. de, Canellas, L.P., 2002. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 37, 1301–1310. doi:10.1590/S0100-204X2002000900014

Fan, H. mei, Wang, X. wen, Sun, Xia, Li, Y. ying, Sun, Xian zhi, Zheng, C. shu, 2014. Effects of humic acid derived from sediments on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in chrysanthemum. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 177, 118–123. doi:10.1016/j.scienta.2014.05.010

Ferraz, R.L. de S., De Macêdo Beltrão, N.E., De Melo, A.S., Magalhães, I.D., Fernandes, P.D., Do Socorro Rocha, M., 2014. Trocas gasosas e eficiência fotoquímica de cultivares de algodoeiro herbáceo sob aplicação de silício foliar. *Semin. Agrar.* 35, 735–748. doi:10.5433/1679-0359.2014v35n2p735

Ferraz, R.L. de S., Melo, A.S. de, Suassuna, J.F., Brito, M.E.B. de, Fernandes, P.D., Júnior, E. da S.N., 2012. Trocas gasosas e eficiência fotossintética em ecótipos de feijoeiro cultivados no semiárido. *Agropec. Trop* 42, 181–188.

Freitas, G.A. de, Rodrigues, L.U., Santos, A.C.M. dos, Carneiro, J.S. da S., Silva, T.T.D.R.R. da, 2014. Influência de frações de ácidos húmicos na produção de mudas de alface 1 130–139.

Freitas Pires, C.R., de Oliveira Lima, L.C., de Barros Vilas Boas, E.V., Alves, R.R., 2009. Qualidade textural de tomates cultivados em substratos orgânicos submetidos à aplicação de substâncias húmicas. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 44, 1467–1472.

Ghannoum, O., Conroy, J.P., Driscoll, S.P., Paul, M.J., Foyer, C.H., Lawlor, D.W., 2003. Nonstomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C4 grasses. *New Phytol.* 159, 599–608. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00835.x

Gonçalves, E.R., Ferreira, V.M., Silva, J. V, Endres, L., Barbosa, T.P., Duarte, W.D.G., 2010. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica 1 Gas exchange and chlorophyll a fluorescence of sugarcane varieties submitted to water stress. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* 14, 378–386.

Griffith, S.M., Schnitzerz, M., 1975. Analytical Characteristics of Humic and Fulvic Acids Extracted from Tropical Volcanic Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 766–770.

Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhar-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S., 1993. Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A F. Lab. manual, Chapman Hall, London. 193. doi:10.1007/978-94-011-1566-7

Hatcher, P.G., 1987. Chemical structural studies of natural lignin by dipolar dephasing solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance. *Org. Geochem.* 11, 31–39. doi:10.1016/0146-6380(87)90049-0

Hatcher, P.G., Maciel, G.E., Dennis, L.W., 1981. Aliphatic structures of humic acids: a clue to their origin. *Org. Geochem.* 3, 43-48.

Heinemann, A.B., 2010. Caracterização dos padrões dos de do arroz (ciclo curto e médio) no estado de Goiás e suas conseqüências para o melhoramento genético. *Ciênc. agrotec.* 29–36. dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000100003.

Inoue, M.T., 1988. Fotossíntese e Transpiração de Clones de *Eucalyptus grandis* E E. *saligna* 40, 15–20.

Jarbas, T., Cunha, F., Madari, B.E., Benites, V.D.M., Pasqualoto, L., Novotny, E.H., Moutta, R.D.O., Marques, P., 2007. Fracionamento químico da matéria orgânica e características de ácidos húmicos de solos com horizonte a antrópico da amazônia (Terra Preta) anthropogenic dark earth soils of brazilian amazonic region. *Acta Amaz.* 37, 91–98.

Johnson, Chris E, Smernik, R.J., Siccama, Thomas G, Kiemle, David K, Xu, Zhihong, Vogt, Daniel J, Johnson, C E, Siccama, T G, Kiemle, D K, Xu, Z, Vogt, D J, 2005. Using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy for the study of northern hardwood tissues. *Can. J. For. Res* 35, 1821–1831. doi:10.1139/X05-122

Kautsky, H., & Hirsch, A., 1931. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. Die Naturwissenschaften 188, 964.

Kayhanian, M., Tchobanoglous, G., 1993. Innovative two-stage process for the recovery of energy and compost from the organic fraction of municipal solid waste (MSW). Water Sci. Technol.

Lima Jr., É. de C., Alvarenga, A.A. De, Castro, E.M. De, Vieira, C.V., Barbosa, J.P.R.A.D., 2006. Aspectos fisioanatomicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* submetidas a diferentes níveis de sombreamento. Rev. Árvore 30, 33–41. doi:10.1590/S0100-67622006000100005

Lu, X.Q., Hanna, J. V., Johnson, W.D., 2000. Source indicators of humic substances: An elemental composition, solid state ¹³C CP/MAS NMR and Py-GC/MS study. Appl. Geochemistry 15, 1019–1033. doi:10.1016/S0883-2927(99)00103-1

Lv, B., Xing, M., Yang, J., Qi, W., Lu, Y., 2013. Chemical and spectroscopic characterization of water extractable organic matter during vermicomposting of cattle dung. Bioresour. Technol. 132, 320–326. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.006

Machado, A.F.L., Ferreira, L.R., Tuffi-Santos, L.D., Ferreira, F.A., Viana, R.G., Machado, M.S., Freitas, F.C.L., 2010. Photosynthetic efficiency and water use in eucalyptus plants sprayed with glyphosate. Planta Daninha 28, 319–327. doi:10.1590/S0100-83582010000200011

Maji, D., Misra, P., Singh, S., Kalra, A., 2017. Humic acid rich vermicompost promotes plant growth by improving microbial community structure of soil as well as root nodulation and mycorrhizal colonization in the roots of *Pisum sativum*. Appl. Soil Ecol. 110, 97–108. doi:10.1016/j.apsoil.2016.10.008

Mandal, G., Joshi, S.P., 2014. Invasion establishment and habitat suitability of *Chromolaena odorata* (L.) King and Robinson over time and space in the western Himalayan forests of India. *J. Asia-Pacific Biodivers.* 7, 391–400. doi:10.1016/j.japb.2014.09.002

Marketsandmarkets, 2017. Biostimulants Market by Active Ingredient (Humic Substances, Amino Acids, Seaweed Extracts, Microbial Amendments), Crop Type (Fruits & Vegetables, Cereals, Turf & Ornamentals), Application Method, Form, and Region – Global Forecast to 2025. Disponível em <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biostimulant-market-1081.html>.

Marques Júnior, R.B., Canellas, L.P., Silva, L.G. da, Olivares, F.L., 2008. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 32, 1121–1128. doi:10.1590/S0100-06832008000300020

Martinez-Balmori, D., Spaccini, R., Aguiar, N.O., Novotny, E.H., Olivares, F.L., Canellas, L.P., 2014. Molecular characteristics of humic acids isolated from vermicomposts and their relationship to bioactivity. *J. Agric. Food Chem.* 62, 11412–11419. doi:10.1021/jf504629c

Martinotto, F., Martinotto, C., Coelho, M. de F.B., e Azevedo, R.A.B., e Albuquerque, M.C. de F. e., 2012. Sobrevivência e crescimento inicial de espécies arbóreas nativas do Cerrado em consórcio com mandioca. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 47, 22–29. doi:10.1590/S0100-204X2012000100004

Mashilo, J., Odindo, A.O., Shimelis, H.A., Musenge, P., Tesfay, S.Z., Magwaza, L.S., 2018. Photosynthetic response of bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] to

drought stress: Relationship between cucurbitacins accumulation and drought tolerance. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 231, 133–143. doi:10.1016/j.scienta.2017.12.027

Mashilo, J., Odindo, A.O., Shimelis, H.A., Musenge, P., Tesfay, S.Z., Magwaza, L.S., 2017. Drought tolerance of selected bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] landraces assessed by leaf gas exchange and photosynthetic efficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 120, 75–87. doi:10.1016/j.plaphy.2017.09.022

Matteoli, F.P., Passarelli-Araujo, H., Reis, R.J.A., Da Rocha, L.O., De Souza, E.M., Aravind, L., Olivares, F.L., Venancio, T.M., 2018. Genome sequencing and assessment of plant growth-promoting properties of a *Serratia marcescens* strain isolated from vermicompost. *BMC Genomics* 19, 1–19. doi:10.1186/s12864-018-5130-y

Medrano, H., Tomás, M., Martorell, S., Flexas, J., Hernández, E., Rosselló, J., Pou, A., Escalona, J.M., Bota, J., 2015. From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies: Limitations of leaf WUE as a selection target. *Crop J.* 3, 220–228. doi:10.1016/j.cj.2015.04.002

Mendonça, E. S., Rowell, D. L. (1996). Mineral and organic fractions of two oxisols and their influence on the effective cation-exchange capacity. *Soil Science Society of America Journal*, 60:1888-1892.

Meirelles, A.F.M., Baldotto, M.A., Baldotto, L.E.B., 2017. Produtividade da alface (*Lactuca sativa* L.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas, em condições de campo. *Rev. Ceres* 64, 553–556. doi:10.1590/0034-737X201764050014

Melo, P. da, A., Olivares, F.L., Médici, L.O., Torres-Neto, A., Dobbss, L.B., Canellas, L.P., 2017. Mixed rhizobia and *Herbaspirillum seropedicae* inoculations with humic acid-like

substances improve water-stress recovery in common beans. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4. doi:10.1186/s40538-017-0090-z

Melo, R.O. de, de Oliveira, H.P., Silveira, K.C., Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., 2018. Initial performance of maize in response to humic acids and plant growth-promoting bacteria. *Rev. Ceres* 65, 271–277. doi:10.1590/0034-737X201865030007

Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O., 2006. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*, 2º Edição, 729p. Universidade Federal de Lavras.

Naidoo, G., Naidoo, K.K., 2018. Drought stress effects on gas exchange and water relations of the invasive weed *Chromolaena odorata*. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 248, 1–9. doi:10.1016/j.flora.2018.08.008

Nery, F.C., Prudente, D.D.O., Alvarenga, A.A. De, Paiva, R., Nery, C., 2016. Desenvolvimento de mudas de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) sob diferentes condições de sombreamento. *Rev. Bras. Biociências* v. 14, n.3, 187–192.

Olaetxea, M., De Hita, D., Garcia, C.A., Fuentes, M., Baigorri, R., Mora, V., Garnica, M., Urrutia, O., Erro, J., Zamarreño, A.M., Berbara, R.L., Garcia-Mina, J.M., 2017. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root- and shoot- growth. *Appl. Soil Ecol.* doi:10.1016/J.APSOIL.2017.06.007

Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Rosa, R.C.C., Canellas, L.P., 2015. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 183, 100–108. doi:10.1016/j.scienta.2014.11.012

Olivares, F.L., Busato, J.G., de Paula, A.M., da Silva Lima, L., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., 2017. Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 1–13. doi:10.1186/s40538-017-0112-x

Oliveira, H.P. de, De Melo, R.O., Baldotto, M.A., Andrade, M.A., Baldotto, L.E.B., 2018. Performance of pre-sprouted sugarcane seedlings in response to the application of humic acid and plant growth-promoting bacteria. *Semin. Agrar.* 39, 1365–1370. doi:10.5433/1679-0359.2018v39n3p1365

Oliveira, F.D.C., 2015. Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos de maior valor agregado. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia Agrícola.

Pagano, M.C., Cabello, M.N., Bellote, A.F., Sá, N.M., Scotti, M.R., 2008. Intercropping system of tropical leguminous species and *Eucalyptus camaldulensis*, inoculated with rhizobia and/or mycorrhizal fungi in semiarid Brazil. *Agrofor. Syst.* 74, 231–242. doi:10.1007/s10457-008-9177-7

Palencia, M., 2018. Functional transformation of Fourier-transform mid-infrared spectrum for improving spectral specificity by simple algorithm based on wavelet-like functions. *J. Adv. Res.* 14, 53–62. doi:10.1016/j.jare.2018.05.009

Pariona-Llanos, R., Ibañez de Santi Ferrara, F., Soto Gonzales, H.H., Barbosa, H.R., 2010. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. *Eur. J. Soil Biol.* 46, 387–393. doi:10.1016/j.ejsobi.2010.08.003

Partida-Martínez, L.P., Heil, M., 2011. The Microbe-Free Plant: Fact or Artifact Front. Plant Sci. 2, 1–16. doi:10.3389/fpls.2011.00100

Pedreira, B.C., Pedreira, C.G.S., 2007. Fotossíntese foliar do capim-xaraés [Brachiaria brizantha (A. Rich.) Stapf. cv. Xaraés] e modelagem da assimilação potencial de dosséis sob estratégias de pastejo rotativo. Rev. Bras. Zootec.

Pertusatti, J., Prado, A.G.S., 2007. Buffer capacity of humic acid: Thermodynamic approach. J. Colloid Interface Sci. 314, 484–489. doi:10.1016/j.jcis.2007.06.006

Piccolo, A., 2002. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. pp. 57–134. doi:10.1016/S0065-2113(02)75003-7

Piccolo, A., Spaccini, R., De Martino, A., Scognamiglio, F., di Meo, V., 2019. Soil washing with solutions of humic substances from manure compost removes heavy metal contaminants as a function of humic molecular composition. Chemosphere 225, 150–156. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.019

Pinheiro, G.L., Silva, C.A., Furtini Neto, A.E., 2010. Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em resposta à aplicação de concentrações de c-ácido húmico. Rev. Bras. Ciência do Solo 34, 1217–1229. doi:10.1590/S0100-06832010000400021

Pinton, R. et al. Pyrophosphate-extractable humic substances fractions as source of iron for Fe-deficient cucumber plants . Biology Fertility Soils, v. 26, p. p.23–27, 1998.

Pittarello, M., Busato, J.G., Carletti, P., Zanetti, L.V., da Silva, J., Dobbss, L.B., 2018. Effects of different humic substances concentrations on root anatomy and Cd accumulation in

seedlings of *Avicennia germinans* (black mangrove). *Mar. Pollut. Bull.* 130, 113–122.
doi:10.1016/j.marpolbul.2018.03.005

Prado, A.G.S., Souza, S.M., Silva, W.T.L. da, Rezende, M.O. de O., 1999. Desenvolvimento de um sistema de filtração e titulação para determinação da acidez de ácidos húmicos. *Quim. Nova* 22, 894–896. doi:10.1590/s0100-40421999000600018

Ramírez, N., Herrera, A., 2017. Reproductive efficiency and photosynthetic pathway in seed plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 24, 48–60. doi:10.1016/J.PPEES.2016.12.004

Ramos, A.C., Dobbss, L.B., Santos, L.A., Fernandes, M.S., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., 2015. Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling dependent on Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2, 3. doi:10.1186/s40538-014-0030-0

Rodrigues, L.A., Alves, C.Z., Rego, C.H.Q., Silva, T.R.B. DA, Silva, J.B. DA, Rodrigues, L.A., Alves, C.Z., Rego, C.H.Q., Silva, T.R.B. DA, Silva, J.B. da, 2017. Humic Acid on Germination and Vigor of Corn Seeds¹. *Rev. Caatinga* 30, 149–154. doi:10.1590/1983-21252017v30n116rc

Rodrigues, L.U., Silva, R. R. da; Freitas, G.A. de; Santos, A.C.M. dos; Tavares, R. de. C., 2018. Ácidos húmicos no desenvolvimento inicial de alface. *Appl. Res. Agrotechnology* v.11, n.2, 101–109. doi:10.5935/PAeT.V11.N2.11

Roesch, L.F., Camargo, F. de O., Selbach, P.A., Sá, E.S. de, 2006. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. *Ciência Rural* 35, 1201–1204. doi:10.1590/s0103-84782005000500035

Rose, M.T., Patti, A.F., Little, K.R., Brown, A.L., Jackson, W.R., Cavagnaro, T.R., 2014. A Meta-Analysis and Review of Plant-Growth Response to Humic Substances: Practical Implications for Agriculture. *Adv. Agron.* 124, 37–89. doi:10.1016/B978-0-12-800138-7.00002-4

Sabah, E., Ouki, S., 2017. Sepiolite and sepiolite-bound humic acid interactions in alkaline media and the mechanism of the formation of sepiolite-humic acid complexes. *Int. J. Miner. Process.* 162, 69–80. doi:10.1016/J.MINPRO.2017.03.005

Sanches, R.F.E., Catarino, I.C.A., Braga, M.R., Silva, E.A. da, 2018. Influência da alta concentração atmosférica de CO₂(↑[CO₂]atm) × disponibilidade hídrica nas relações hídricas, trocas gasosas e acúmulo de carboidratos em *Coffea arabica* L. *Hoehnea* 44, 635–643. doi:10.1590/2236-8906-33/2017

Sanches, S.M., Campos, S.X. de, Vieira, E.M., 2007. Caracterização das frações das substâncias húmicas de diferentes tamanhos moleculares. *Eclética Química* 32, 49–56. doi:10.1590/S0100-46702007000100007

Santos, G.A., Da Silva, L.S., Canellas, L.P., Camargo, F.A., 2008. Fundamentos da matéria orgânica do solo - ecossistemas tropicais e subtropicais. V.3, 75-84.

Santos, A.C.M. dos, Rodrigues, L.U., Andrade, C.A.O. de, Carneiro, J.S. da S., Silva, R.R. da, 2017. Ácidos Húmicos E Nitrogênio Na Produção De Mudanças De Alfaca. *Rev. Bras. Tecnol. Apl. nas Ciências Agrárias* 11, 69–77. doi:10.5935/paet.v11.n1.08

Schnitzer, M., Gupta, U.C., 1965. Determination of Acidity in Soil Organic Matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 29, 274–277. doi:10.2136/sssaj1965.03615995002900030016x

Shah, Z.H., Rehman, H.M., Akhtar, T., Alsamadany, H., Hamooh, B.T., Mujtaba, T., Daur, I., Al Zahrani, Y., Alzahrani, H.A.S., Ali, S., Yang, S.H., Chung, G., 2018. Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants. *Front. Plant Sci.* 9, 1–12. doi:10.3389/fpls.2018.00263

Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S.M., Kinoshita, T., 2007. Light Regulation of Stomatal Movement. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 219–247. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434

Sierra, M.M.D., Fernandes, A.N., Szpoganicz, B., 2004. Influence of amide linkages on acidity determinations of humic substances: Testing with model-mixtures. *Talanta* 62, 687–693. doi:10.1016/j.talanta.2003.09.021

Silva, E.N. da, Ribeiro, R.V., Ferreira-Silva, S.L., Viégas, R.A., Silveira, J.A.G., 2011. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. *Sci. Agric.* 68, 62–68. doi:10.1590/s0103-90162011000100010

Silva, F.G. da, Dutra, W.F., Dutra, A.F., de Oliveira, I.M., Filgueiras, L.M.B., de Melo, A.S., 2015. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of eggplant grown under different irrigation depths. *Rev. Bras. Eng. Agric. e Ambient.* 19, 946–952. doi:10.1590/1807-1929/agriambi.v19n10p946-952

Silva, M.A.C. da, Santos, W.O. dos, Simoura, N.T., Tesch, J.A., Ruas, K.F., Colodete, C.M., Tannure, F.P., Barbirato, J. de O., Ramos, A.C., Dobbss, L.B., 2015. Ácidos húmicos de vermicomposto estimulam o crescimento in vitro de plântulas de *Cattleya warneri*(Orchidaceae). *Rodriguésia* 66, 759–768. doi:10.1590/2175-7860201566307

Simpson, A.J., Simpson, M.J., Soong, R., 2012. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and its key role in environmental research. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11488–11496. doi:10.1021/es302154w

Sousa, M.C., Marinho, C.S., Silva, M.P.S., Carvalho, W.S.G., Amaral, B.D., Assis-Gomes, M.M., Rodrigues, W.P., Campostrini, E., 2019. Effects of grafting and gradual rootstock substitution on gas exchanges of orange seedlings under high atmospheric evaporative demand. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 247, 67–74. doi:10.1016/j.scienta.2018.12.011

Souza, B. R. , Baldotto, L. E. B., Paula, A. M., Campos, F. S. , Silveira, K. C.; Marinho, P. V. , Sodre, F. F., Busato, Jader Galba, 2019 . Screening of beneficial bacteria associated with *Calophyllum brasiliense* Cambess so as to develop microbial inoculants for agriculture. *Plant Omics Journal*, v. 12, p. 93-101. doi: 10.21475/POJ.12.02.19

Spolaor, L.T., Simões, L., Gonçalves, A., Andrade, O.J., Dos Santos, P., Luiz, A., De Oliveira, M., Scapim, C.A., Bengosi Bertagna, F.A., Kuki, M.C., 2016. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. *Bragantia* 75, 33–4033. doi:10.1590/1678-4499.330

Stangarlin, J.R., Kuhn, O.J., Toledo, M. V., Portz, R.L., Schwan-Estrada, K.R.F., Pascholati, S.F., 2011. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Sci. Agrar. Parana.* 10, 18–46.

Sterling, A., Melgarejo, L.M., 2018. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence in *Hevea brasiliensis* in response to *Pseudocercospora ulei* infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 103, 143–150. doi:10.1016/j.pmpp.2018.07.006

Strobl, S., Cueva, E., Silva, B., Knuesting, J., Schorsch, M., Scheibe, R., Bendix, J., Beck, E., 2017. Water relations and photosynthetic water use efficiency as indicators of slow

climate change effects on trees in a tropical mountain forest in South Ecuador. *Ecol. Indic.* 83, 550–558. doi:10.1016/J.ECOLIND.2016.12.021

Sullivan, L.A., 1990. Soil organic matter, air encapsulation and water-stable aggregation. *J. Soil Sci.* 41, 529–534. doi:10.1111/j.1365-2389.1990.tb00084.x

Taiz, L., Zeiger, E., 2007. 6^o Edição, *Fisiologia vegetal*.

Trompowsky, P.M., De Melo Benites, V., Madari, B.E., Pimenta, A.S., Hockaday, W.C., Hatcher, P.G., 2005. Characterization of humic like substances obtained by chemical oxidation of eucalyptus charcoal. *Org. Geochem.* 36, 1480–1489. doi:10.1016/j.orggeochem.2005.08.001

Vendruscolo, E.P., Santos, O.F., Alves, C.Z., 2014. Humic substances on seed physiological quality of sorghum. *J. Agron. Sci.* 3, 169–177.

Wen, J.L., Sun, S.L., Xue, B.L., Sun, R.C., 2013. Recent advances in characterization of lignin polymer by solution-state nuclear magnetic resonance (NMR) methodology. *Materials (Basel)*. 6, 359–391. doi:10.3390/ma6010359

Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R., 2007. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta* 225, 1583–1595. doi:10.1007/s00425-006-0454-2

Zandonadi, D.B., Santos, M.P., Caixeta, L.S., Marinho, E.B., Peres, L.E.P., Facanha, A.R., 2016. Plant proton pumps as markers of biostimulant action. *Sci. Agric.* 73, 24–28. doi:10.1590/0103-9016-2015-0076

Zandonadi, D.B., Santos, M.P., Dobbss, L.B., Olivares, F.L., Canellas, L.P., Binzel, M.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R., 2010. Nitric oxide mediates humic acids-

induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta* 231, 1025–1036. doi:10.1007/s00425-010-1106-0

Zandonadi, D.B., Souza, R.B. De, Silva, J., Fontenelle, M., 2018. Produção orgânica de alface. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Hortaliças, ISSN 1677-2229; 152)

Zhang, F., Roeyers, H., 2019. Exploring brain functions in autism spectrum disorder: A systematic review on functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) studies. *Int. J. Psychophysiol.* 137, 41–53. doi:10.1016/j.ijpsycho.2019.01.003