

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Resposta de Plantas de Arroz a Aplicação de Ácido  
Húmico e Bactérias Promotoras de Crescimento**

**Maura Santos Reis de Andrade da silva**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**RESPOSTA DE PLANTAS DE ARROZ A APLICAÇÃO DE ÁCIDO  
HÚMICO E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO**

**MAURA SANTOS REIS DE ANDRADE DA SILVA**

*Sob a Orientação da Pesquisadora  
Vera Lucia Divan Baldani*

*e Co-orientação do Pesquisador  
Orlando Carlos Huertas Tavares*

Dissertação submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Mestra**, no Curso de Pós-Graduação em  
Agronomia, Área de Concentração em  
Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pela autora

da Silva, Maura Santos Reis de Andrade, 1992-  
d586r Resposta de Plantas de Arroz a Aplicação de Ácido Húmico  
e Bactérias Promotoras de Crescimento / Maura Santos Reis  
de Andrade da Silva. - 2018.  
54 f.: Il.

Orientadora: Vera Lucia Divan Baldani.  
Coorientador: Orlando Carlos Huertas Tavares.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Agronomia –  
Ciência do Solo, 2018.

1. Inoculação. Sistema radicular. Vermicomposto. Análise de  
crescimento vegetal.. I. Baldani, Vera Lucia Divan, 1954-,  
orient. II. Tavares, Orlando Carlos Huertas, 1979-, coorient.  
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós-  
Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**MAURA SANTOS REIS DE ANDRADE DA SILVA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2018.

---

Vera Lucia Divan Baldani. Dra. Embrapa Agrobiologia  
(Orientadora)

---

Márcia Soares Vidal. Dra Embrapa Agrobiologia

---

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ

“My name is on the palm of Your hand  
And Your hands, they hold the stars.”

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico a Deus e a minha família.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu Pai de amor! Obrigada pelos “sins” e “nãos” recebidos, sei que seus planos são lindos e que sua vontade é boa, perfeita e agradável.

A minha mãe, que é a pessoa mais forte que eu conheço! Obrigada por cada oração, conselho e principalmente, amor.

As minhas irmãs, Camilla, Carol e Natália. Obrigada pelo carinho, amor e apoio.

A minha tia Isanir, que é minha segunda mãe! Ao meu pai, pelo incentivo, apoio, amor e torcida.

Ao Roberto Carlos, pela amizade, ajuda e conselhos.

As minhas amigas, Bebelly e Liandra Paula, por essa linda amizade e parceria.

Aos meus amigos ruralinos, Bia, Douglath, Fernando e Matheus Afonso, pela ajuda indescritível.

Ao Wilson, Claudinho e Lúcio, meus grandes amigos. Obrigada por tudo!

A Adriana e Marcelo, por toda ajuda, biscoitos e café! Rsrs

Agradeço a todo o grupo Lableg, Lgb da Embrapa e ao Laboratório de química biológica e Nutrição de plantas da Rural.

Aos meus amigos da Embrapa Agrobiologia e da UFRRJ.

A minha orientadora, Vera Baldani por todo auxílio e zelo.

Aos professores: Berbara, Andrés e Leandro pela disponibilidade e por ceder o espaço para as análises.

Ao meu co-orientado Orlando, por toda ajuda e ensinamento.

Ao Ederson da Conceição, exemplo de ser humano e profissional. Obrigada, obrigada e obrigada!

A todos os componentes da secretaria de pós-graduação, em especial ao Marquinhos.

Aos meus professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, à Coordenação do Curso e todos os seus funcionários .

À EMBRAPA Agrobiologia e todo corpo de funcionários, pelo acolhimento e toda infra-estrutura oferecida durante os anos que permaneci como bolsista de iniciação científica e Mestrado.

E a CAPES, pelo auxílio.

## **BIOGRAFIA**

Maura Santos Reis de Andrade da Silva nasceu aos 22 dias do mês de março de 1992, no bairro Campo Grande, município e Estado do Rio de Janeiro. Filha de Ubiranilce Santos Reis e João Batista de Andrade da Silva, concluiu em 2010 o ensino médio e técnico no antigo CEFETQ, atual IFRJ. Estagiou por um ano (2011) no Laboratório de Análise de Águas da Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM). Em 2012, ingressou no curso de Ciências Biológicas no Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), foi bolsista de iniciação científica do CNPq e posteriormente da FAPERJ de janeiro de 2013 a fevereiro de 2016, quando obteve a titulação de bacharela em Ciências Biológicas. Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado na UFRRJ, junto ao Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo, desenvolvendo análises experimentais na Embrapa Agrobiologia-CNPAB e na UFRRJ, sob orientação da Dr<sup>a</sup>.Vera Lúcia Divan Baldani, co-orientação do Dr. Orlando Carlos Huertas Tavares e colaboração do Dr. Ederson da Conceição Jesus.

## RESUMO GERAL

DA SILVA, Maura Santos Reis de Andrade. **Resposta de plantas de arroz a aplicação de ácido húmico e bactérias promotoras de crescimento.** 2018. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2018.

A diferença quanto à capacidade de absorção de nutrientes entre distintas espécies de plantas está relacionada à variação na magnitude do sistema radicular e/ou na cinética de absorção de nutrientes. O uso mais eficiente destes elementos pelas plantas retrata menor perda destes por percolação, volatilização (N) ou com a drenagem de água, ao absorvê-los efetivamente mais rápido e em maior quantidade. A distribuição espacial do sistema radicular determina a habilidade da planta em explorar eficientemente estes recursos, que em muitos ambientes são pouco disponíveis. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com bactérias promotoras de crescimento (BPCV) e também pela aplicação de ácido húmico (AH) sobre a morfologia do sistema radicular e a influência deste no incremento de fitomassa das plantas de arroz, em solução nutritiva. A dissertação foi dividida em dois capítulos: no primeiro capítulo o estudo avaliou alterações morfológicas e de fitomassa das plantas de arroz por meio da inoculação com BPCV em solução nutritiva de Hoagland, sendo estas: *Escherichia coli*, *Azospirillum brasiliense* sp 245, *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5, *Gluconacetobacter diazotrophicus* lao-; no segundo capítulo avaliou-se a resposta morfológica de plantas de arroz na presença e na ausência de ácidos húmicos em solução nutritiva durante onze avaliações, de modo a caracterizar os componentes fisiológicos, diferenças no acúmulo e a distribuição de massa seca do arroz em resposta à aplicação de ácido húmico por meio da análise quantitativa de crescimento vegetal. No Capítulo I, a massa fresca e massa seca da parte aérea e diâmetro médio apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A inoculação da estirpe *G. diazotrophicus* PAL 5 proporcionou maior crescimento das plantas de arroz, e a *E. coli* promoveu engrossamento da raiz. No Capítulo II, os componentes fisiológicos: taxas de crescimento absoluto e de crescimento relativo e, taxa de assimilação líquida, foram superiores nas plantas tratadas com ácido húmico, devido as diferenças no acúmulo e distribuição de massa seca das plantas. Em ambos os experimentos os tratamentos influenciaram a morfologia do sistema radicular o que repercutiu em alterações no incremento de fitomassa na planta. As bactérias promotoras de crescimento vegetal promovem estímulos sobre os parâmetros morfológicos do sistema radicular e incrementa a fitomassa das plantas de arroz. As propriedades bioativas do ácido húmico de vermicomposto promove a formação de um sistema radicular maior, que possivelmente melhora a captação de água e nutrientes pelas plantas da solução nutritiva, proporcionando um crescimento mais rápido e vigoroso das plântulas de arroz.

**Palavras-chave:** Inoculação. Sistema radicular. Vermicomposto. Análise de crescimento vegetal.

## GENERAL ABSTRACT

DA SILVA, Maura Santos Reis de Andrade da Silva. **Resposta das plantas de arroz a aplicação de ácido húmico e bactérias promotoras de crescimento.** 2018. 54p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2018.

The difference in nutrient absorption capacity between different plant species is related to the variation in the magnitude of the root system and / or the kinetics of nutrient absorption. The more efficient use of nutrients by plants shows less loss of these by percolation, volatilization (N) or water drainage, by absorbing them effectively faster and in greater quantity. The spatial distribution of the root system determines the ability of the plant to efficiently exploit these resources, which in many environments are found in low availability. The objective of this work was to evaluate the morphological alterations of the root system and its influence on the increment of phytomass of rice plants by inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) and also by the application of humic acid (HA) nutritious solution. The thesis was divided into two chapters: in the first chapter the study evaluated morphological and phytomass changes of rice plants by inoculation with PGPB in Hoagland nutrient solution, *Escherichia coli*, *Azospirillum brasiliense* sp 245, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5, *Gluconacetobacter diazotrophicus* lao-; in the second chapter the morphophysiological response of rice plants in the presence and absence of humic acids in nutrient solution during eleven evaluations was evaluated in order to characterize the physiological components, differences in the accumulation and the distribution of dry mass of the rice in response to the application of humic acid by quantitative analysis of plant growth. In Chapter I, fresh weight and dry mass of shoot and mean diameter showed significant differences between treatments. Inoculation of the *G. diazotrophicus* PAL 5 strain resulted in higher growth of rice plants, and *E. coli* promoted root thickening. In Chapter II, the physiological components: rates of absolute growth and relative growth and net assimilation rate were higher in humic acid treated plants, due to differences in accumulation and distribution of dry mass of plants. In both experiments the treatments influenced the morphology of the root system which had repercussions on changes in the phytomass increment in the plant. The plant growth promoting bacteria stimulate the morphological parameters of the root system and increase the phytomass of the rice plants. The bioactive properties of vermicompost humic acid promotes the formation of a larger root system, which possibly improves the uptake of water and nutrients by the plants of the nutrient solution, providing a faster and more vigorous growth of the rice seedlings.

**Keywords:** Inoculation. Root system. Vermicompost. Plant growth analysis.

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Coeficiente de determinação ( $R^2$ ), coeficientes estimados ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) e probabilidades (p-valor) dos ajustes de regressão do tipo logístico com 3 parâmetros para Massa Seca Total (MST) e Área Foliar (AF) das plantas de arroz var. Piaui tratadas com e sem ácido húmico.

..... 32

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferentes tipos de interações entre raízes de plantas e bactérias promotoras de crescimento vegetal presentes no solo (Esquema adaptado de Souza et al., 2015).....6
- Figura 2.** massa fresca de parte aérea e de raiz e massa seca de parte aérea e de raiz de plantas de arroz não inoculadas (Cont) e inoculadas, com as bactérias: *G. diazotrophicus* PAL 5 (Gluc), *Azospirillum brasilense* sp 245 (Az), *G. diazotrophicus* lao- (Gm) e *E. coli* (Ec). As letras representam médias que diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade...14
- Figura 3.** Número de pontas, volume total de raiz, diâmetro médio de raízes e comprimento total das raízes de arroz não inoculadas (Cont) e inoculadas, com as seguintes bactérias: *G. diazotrophicus* PAL 5 (Gluc), *Azospirillum brasilense* sp 245(Az), *G. diazotrophicus* lao- (Gm) e *E. coli* (Ec). As letras representam médias que diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....15
- Figura 4.** Comprimento de raiz com diâmetro entre 1,0-1,5 mm de plantas de arroz não inoculadas (Cont) e inoculadas, com as bactérias: *G. diazotrophicus* PAL 5 (Gluc), *Azospirillum brasilense* sp 245(Az), *G. diazotrophicus* lao- (Gm) e *E. coli* (Ec). As letras representam médias que diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ....16
- Figura 5.** Matriz de correlação de Pearson para dados de parte aérea raiz e para parâmetros morfológicos radiculares de plantas de arroz inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL 5, *Azospirillum brasilense* sp 245, *G. diazotrophicus* lao- e *E. coli* e para não inoculadas. 16
- Figura 6.** Esquema do experimento para avaliação do crescimento, coleta de plantas a cada 24 horas para determinação da massa da matéria seca, área foliar e parâmetros morfológicos da raiz. Troca de solução de Hoagland com e sem adição de ácido húmico ocorreu às 24, 96,168 e 240 horas.....24
- Figura 7.** Massa Seca da Parte Aérea de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(\*) e 5%(\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....27
- Figura 8.** Massa seca total, massa seca da bainha, massa seca de raiz e massa seca foliar de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(\*) e 5%(\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....28
- Figura 9.** Razão raiz parte aerea de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(\*) e 5%(\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....29
- Figura 10.** Área foliar de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(\*) e 5%(\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....30
- Figura 11.** Razão de Área foliar de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(\*) e 5%(\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....31
- Figura 12.** Área foliar específica de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta.

Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(*) e 5%(**) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....	32
<b>Figura 13.</b> Taxa de crescimento absoluto (TCA) e taxa de crescimento relativo (TCR) de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta (a partir de 24 horas após aplicação dos tratamentos). ....	33
<b>Figura 14.</b> Correlação entre a área foliar e a massa seca total de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta (a partir de 24 horas após aplicação dos tratamentos). ....	33
<b>Figura 15.</b> Taxa de assimilação líquida de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta (a partir de 24 horas após aplicação dos tratamentos). ....	35
<b>Figura 16.</b> Diâmetro médio da raiz de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(*) e 5%(**) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....	35
<b>Figura 17.</b> Comprimento radicular total e comprimentos nas classes de raízes superfinas, finas e grossas de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(*) e 5%(**) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....	36
<b>Figura 18.</b> Área de superfície radicular total e comprimentos nas classes de raízes superfinas, finas e grossas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(*) e 5%(**) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....	37
<b>Figura 19.</b> Número de bifurcações das raízes de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(*) e 5%(**) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....	38
<b>Figura 20.</b> Volume radicular total e comprimentos nas classes de raízes superfinas, finas e grossas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, sob diferentes épocas de coleta (a partir de 24 horas após aplicação dos tratamentos). Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(*) e 5%(**) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....	39
<b>Figura 21.</b> Número total de pontas e classes de raízes superfinas, finas e grossas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, sob diferentes épocas de coleta (a partir de 24 horas após aplicação dos tratamentos). Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (*) e 5%(**) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers. ....	40
<b>Figura 22.</b> Matriz de correlação de Pearson para dados de folhas, bainha e raiz de plântulas de arroz tratadas ou não com AH. ....	41
<b>Figura 23.</b> Heatmap com análise de agrupamento. A coluna corresponde à época de coleta com e sem aplicação de ácido húmico e a linha, aos parâmetros avaliados para folha, bainha e raiz. A intensidade da cor vermelha é proporcional à associação positiva, já a intensidade da coloração azul a associação negativa e a cor branca, quando não há associação. ....	42



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AF</b>	Área foliar
<b>AFE</b>	Área foliar específica
<b>AS</b>	Área de Superfície total
<b>AS1</b>	Área de Superfície de raízes superfinais
<b>AS2</b>	Área de Superfície de raízes finas
<b>AS3</b>	Área de Superfície de raízes grossas
<b>B</b>	Número de bifurcações
<b>C</b>	Comprimento Total de raízes
<b>C1</b>	Comprimento de raízes superfinais
<b>C2</b>	Comprimento de raízes finas
<b>C3</b>	Comprimento de raízes grossas
<b>D</b>	Diâmetro
<b>MSbainha</b>	Massa Seca da Bainha
<b>MSfoliar</b>	Massa seca foliar
<b>Msraiz</b>	Massa Seca da Raiz
<b>MST</b>	Massa seca total
<b>P</b>	Número de pontas total
<b>P1</b>	Número de pontas de raízes superfinais
<b>P2</b>	Número de pontas finas
<b>P3</b>	Número de pontas de raízes grossas
<b>PA</b>	Parte aérea
<b>Rrpa</b>	Razão raiz Parte Aérea
<b>RAF</b>	Razão área foliar
<b>RPF</b>	Razão peso foliar
<b>V</b>	Volume total
<b>V1</b>	Volume Total de raízes superfinais
<b>V2</b>	Volume Total de raízes finas
<b>V3</b>	Volume Total de raízes grossas

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Vermicompostagem e Substâncias Húmicas .....	3
2.2. Análise de Crescimento de Plantas .....	5
2.3. Bactérias Promotoras de Crescimento .....	6
3. CAPÍTULO I ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO SISTEMA RADICULAR E PRODUÇÃO DE MASSA EM PLANTAS DE ARROZ POR BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL .....	8
3.1. RESUMO .....	9
3.2. ABSTRACT .....	10
3.3. INTRODUÇÃO .....	10
3.4. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
3.4.1. Preparo dos inóculos .....	12
3.4.2. Experimento em condições de hidroponia .....	12
3.5. RESULTADOS .....	14
3.6. CONCLUSÕES .....	18
4. CAPÍTULO II ANÁLISE QUANTITATIVA DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS DE ARROZ TRATADAS COM ÁCIDO HÚMICO .....	19
4.1. RESUMO .....	20
4.2. ABSTRACT .....	21
4.3. INTRODUÇÃO .....	22
4.4. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.4.1. Caracterização espectroscópica de ( <sup>13</sup> C-CP MAS NMR) e composição elementar dos ácidos húmicos de vermicomposto .....	23
4.4.2. Condução do experimento .....	23
4.4.3. Processamento das amostras .....	24
4.4.4. Análise quantitativa do crescimento .....	24
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.5.1. Massa seca da parte aérea .....	27
4.5.2. Partição de massa seca .....	27
4.5.3. Relação raiz:parte aérea (Rrpa) .....	29
4.5.4. Área foliar .....	30
4.5.5. Razão área foliar .....	30
4.5.6. Área foliar específica (AFE) .....	31
4.5.7. Taxa de crescimento absoluto (TCA) e taxa de crescimento relativo (TCR) .....	32
4.5.8. Taxa de assimilação líquida (TAL) .....	33
4.5.9. Efeito de AH sobre parâmetros radiculares .....	35
4.6 CONCLUSÕES .....	43
5. CONCLUSÕES GERAIS .....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O sistema agrícola moderno mantém altos níveis de produção mediante o uso intensivo de fertilizantes e recursos naturais. A condução dessas práticas tem chamado a atenção para a necessidade de um novo modelo de cultivo que minimize os impactos gerados e preserve o elevado padrão de produção. Dentre os insumos como alternativas sustentáveis que possuem efeitos diretos e indiretos sobre o crescimento vegetal, destacam-se os produtos à base de Substâncias Húmicas (SH) (CANELLAS & OLIVARES, 2014), ácidos húmicos e ácidos fulvicos (CANELLAS et al., 2015), vermicomposto (AGUIAR et al., 2013), carvão bioativo (biochar) (MONTERUMICI et al., 2015), fungos micorrizicos arbusculares (ROUPHAEL et al., 2015), inoculantes para espécies leguminosas [*Bradyrhizobium* da soja] (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001) e não leguminosas [*Herbaspirillum* e *Azospirillum*; *Nitrospirillum amazonense*] (EMBRAPA, 2016; EMBRAPA, 2018) e de bactérias promotoras do crescimento vegetal com potencial na horticultura (RUZZI & AROCA, 2015).

O uso na promoção de crescimento vegetal de SH tem atraído a atenção de agricultores e empresários com a abertura ascendente para a comercialização de produtos à base dessas substâncias. No entanto, grande parte desses produtos extrai SH de fontes não renováveis. Uma alternativa é a aquisição de matéria húmica oriunda da transformação de resíduos orgânicos por microrganismos e minhocas, requerido como vermicompostagem. O produto gerado é o húmus de minhoca naturalmente enriquecido com ácidos húmicos (AH) e com atribuição para promoção do crescimento vegetal, especialmente do sistema radicular (CANELLAS et al., 2002; AGUIAR et al., 2013). A utilização de BPCV como insumo biológico também não é nenhuma novidade. Trabalhos iniciados pela Doutora Johanna Döbereiner já disseriam o potencial de bactérias na promoção direta e indireta do crescimento vegetal (BALDANI et al., 1983), porém o uso de inoculantes para poáceas ainda é incipiente frente a extensão do mercado brasileiro.

O termo “bioestimulante” é relativamente novo e sua aplicação na comunidade científica ainda é obscura. Uma definição ampla foi introduzida por du Jardin (2012) onde, bioestimulantes vegetais são constituídos por substâncias (com exceção de nutrientes e pesticidas), que quando aplicados a plantas, sementes ou substratos, apresentam capacidade de alterar processos fisiológicos em plantas, favorecendo o crescimento como também aumentando a resposta frente a estresse. Dentro deste contexto, as substâncias húmicas e bactérias promotoras de crescimento vegetal se caracterizam como dois grandes grupos de bioestimulantes vegetais.

Tanto SH e BPCV possuem efeitos semelhantes frente à ação no crescimento de plantas e mitigação dos efeitos adversos ocasionados por estresse. Já foi relatado que ambos possuem ação sobre a morfologia radicular e também na nutrição de plantas. (HALPERN et al., 2015; MATUSZAK-SLAMANI et al., 2017; OLIVARES et al., 2017). O que os coloca como importantes biotecnologias a serem exploradas em prol da melhoria de produção das culturas, especialmente em condições de estresse.

As respostas aos insumos biológicos dependem em grande parte da interação planta-ambiente. Por outro lado, os insumos minerais possuem ação direta e têm respostas mais expressivas e fáceis de serem interpretadas e recomendadas. Um dos grandes obstáculos atualmente é a aquisição de alternativas para a produção agrícola menos agressiva ao ambiente. A necessidade por mais informações e trabalhos sob essa ótica traz a relevância a este trabalho, que se justifica pela busca da melhor compreensão do efeito de promoção do crescimento radicular característico de ácido húmico e também de bactérias promotoras de crescimento

frente aos possíveis incrementos gerados por essas biotecnologias a aquisição de biomassa e seu potencial uso como insumo agrícola.

O estudo foi desenvolvido em dois capítulos, o primeiro capítulo avaliou as alterações morfológicas do sistema radicular e produção de massa em plantas de arroz por bactérias promotoras de crescimento vegetal e o segundo, a análise quantitativa do crescimento das plantas de arroz tratadas com ácido húmico

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar as alterações morfológicas do sistema radicular e o incremento de fitomassa das plantas de arroz por meio da inoculação com bactérias promotoras de crescimento e também pela aplicação de ácido húmico em solução nutritiva.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar as alterações morfológicas do sistema radicular, bem como o incremento de fitomassa de plantas arroz por meio da inoculação com bactérias promotoras de crescimento;
- Caracterizar os componentes fisiológicos, as diferenças no acúmulo e a distribuição de massa seca do arroz em resposta à aplicação de ácido húmico por meio da análise quantitativa de crescimento;
- Avaliar as mudanças dos parâmetros morfológicos do sistema radicular do arroz em resposta às aplicações de ácido húmico;

Como hipóteses temos que:

- A inoculação com as bactérias promotoras de crescimento estimula o desenvolvimento radicular e da parte aérea das plantas, com diferenças de desempenho entre as diferentes estirpes de bactérias avaliadas;
- A estirpe de bactéria promotora de crescimento deficiente na produção de ácido indolacético tem um desempenho inferior às estirpes selvagens de bactérias, com menor promoção do desenvolvimento das plantas;
- A aplicação de ácido húmico estimula o crescimento radicular e da parte aérea das plantas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Vermicompostagem e Substâncias Húmicas

Considerada um importante constituinte do ecossistema, a matéria orgânica atua em várias propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, sendo fundamental para o adequado funcionamento deste (DICK et al., 2007).

A vermicompostagem é uma técnica grandemente utilizada para a estabilização rápida da matéria orgânica (ALMEIDA, 1991). Durante a vermicompostagem, a minhoca ingere e digere resíduos orgânicos, expelindo excrementos com formas especiais chamados coprólitos (em inglês “casting”), constituídos de agregados de terra e matéria orgânica digerida. Os coprólitos abrangem nutrientes de plantas em maior concentração do que no solo onde se localizam. Isto se deve ao fato do coprólito do solo estar misturado com matéria orgânica e mais as secreções intestinais e urinárias. O material excretado encontra-se em estado mais avançado de decomposição, o que facilita a absorção dos nutrientes pelas raízes.

A produção de ácido húmico é acelerada devido à digestão das folhas e a semi-decomposição provocada pelas minhocas. A reação dos coprólitos é sempre mais neutra do que a dos solos originais, mesmo que estes sejam ácidos ou básicos. Os coprólitos são pobres em argila e ricos em matéria orgânica, nitratos, fósforos, potássio, cálcio e magnésio. Apresentam alta capacidade de troca catiônica (CTC), saturação por bases e elevada umidade equivalente (KIEHL, 1985).

Em sistemas de vermicompostagem, a matéria orgânica em decomposição apresenta uma matriz heterogênea de componentes orgânicos com características contrastantes. O vermicomposto, em relação ao composto convencional, apresenta maior estabilização dos resíduos orgânicos que, ao longo do trato digestivo das minhocas, participam de reações enzimáticas, transformando, rapidamente, os resíduos em grande quantidade de substâncias húmicas (SH) (ALMEIDA, 1991).

As substâncias húmicas constituem um dos principais componentes da matéria orgânica do solo e são amplamente distribuídas pelo planeta, presentes tanto em ambientes terrestres como aquático. Englobam as frações em fase avançada de decomposição, sem, no entanto, apresentar vestígios morfológicos do material que as originou (DICK et al., 2007) Apresentam-se também como fonte de nutrientes para as plantas, disponibilizando carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S). Originam-se a partir da degradação química e biológica de resíduos de plantas, animais e também da atividade microbiana (SCHNITZER, 1978; STEVENSON, 1994).

A síntese das substâncias húmicas tem sido objeto de muitas investigações. Schnitzer (1978) enumera quatro teorias para a formação desses materiais, a saber:

**a) Hipótese das transformações das plantas:** As frações de tecidos vegetais resistentes à degradação microbiana, tais como tecidos lignificados, são alteradas superficialmente no solo para formar as substâncias húmicas. A composição das SH's é influenciada pela natureza do material vegetal de origem. Durante os primeiros estágios de humificação, os AH's de alto peso molecular e as huminas são formados; estes são seguidamente degradados em AF's e, por último, em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O;

**b) Hipótese da polimerização química:** O material vegetal é degradado por microrganismos em moléculas mais simples, as quais são utilizadas por estes como fonte de carbono e energia. Os microrganismos sintetizam fenóis e aminoácidos, que são secretados para o ambiente, onde são oxidados e, posteriormente, polimerizados em substâncias húmicas. A natureza do material vegetal original não tem efeito sobre o tipo de substância húmica que é formada;

**c) Hipótese da autólise celular:** As substâncias húmicas são geradas da autólise de células vegetais e microbianas mortas. Os resíduos das células (açúcares, aminoácidos, fenóis e outros compostos aromáticos) são condensados e polimerizados através da reação com radicais livres;

**d) Hipótese de síntese microbiana:** Os microrganismos utilizam o tecido vegetal como fonte de carbono e energia para sintetizar ‘intercelularmente’ matéria húmica de alto peso molecular. Após a morte desses microrganismos essas substâncias são liberadas ao solo. Assim, as substâncias de elevado peso molecular representam os primeiros estádios de humificação, seguidos pela degradação microbiana extracelular para AH, AF e, finalmente para CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.

O estabelecimento da teoria mais válida sobre a síntese das SH é um tema ainda discutido, sendo provável que os processos possam ocorrer simultaneamente, embora sob certas condições um possa sobrepor o outro. No entanto, as quatro teorias sugerem que o material mais complexo (substâncias de alto peso molecular) é formado primeiro e que este é então degradado, mais possivelmente por oxidação, em material de baixo peso molecular, formando primeiro os AH e, em seguida, os AF.

As SH apresentam natureza complexa e ainda pouco conhecida. As características estruturais diferem devido à origem do material, método de extração e até mesmo pelas diferentes concentrações em que se encontram. Os efeitos sobre as plantas também podem diferir entre espécies vegetais, assim como responder de forma distinta em cada estádio de desenvolvimento (SANTOS & CAMARGO, 1999).

Geralmente, as SH são fracionadas em função de sua solubilidade em diferentes faixas de pH, sendo: ácidos fúlvicos (solúveis em meio ácido e alcalino), ácidos húmicos (solúveis em meio alcalino) e huminas (fração insolúvel) (KONONOVA, 1982; STEVENSON, 1994; GUERRA, 2008; IHSS, 2017). Os ácidos húmicos são particularmente definidos operacionalmente como a fração das SH solúveis que precipita pela acidificação do extrato alcalino oriundo da primeira etapa da extração convencional (CANELLAS & SANTOS, 2005), os AH são mais polimerizados e aromatizados do que os AF (PRIMO et al., 2011).

PICCOLO et al. (1999) postulam que os ácidos húmicos são formados por uma mistura heterogênea de pequenas moléculas reunidas num arranjo supramolecular estabilizado por forças relativamente fracas (ligações do tipo van de Waals,  $\pi$ - $\pi$ , CH- $\pi$ ). Essas ligações podem ser quebradas, reversivelmente, na presença de baixas concentrações de ácidos orgânicos (NARDI et al., 2000; COZZOLINO et al., 2001). Esse menor agregado corresponderia à célula estrutural mínima das substâncias húmicas, sobre a qual desenvolve-se, paulatinamente, a macroestrutura através da adição de camadas sobre esta célula básica, num arranjo semelhante ao supraestrutural (ORLOV et al. 1985).

Através da mineralização e decomposição da matéria orgânica, as SH além de fornecerem nutrientes, podem estimular diretamente o crescimento e a produtividade de plantas, como o aumento da emissão de raízes laterais e pelos radiculares em plântulas de milho e da atividade das H<sup>+</sup>-ATPase conforme observado por Canellas et al., (2002) e Canellas & Santos (2005).

Os efeitos mais evidentes exercidos por SH são as respostas no crescimento das plantas. Nos últimos anos, estudos, têm confirmado as observações feitas neste sentido com resultados que elucidam diferentes parâmetros e tratamentos com SH, extraído de muitas fontes naturais e antropogênicas, testados contra um número de espécies de plantas superiores (NARDI et al, 2009).

Diversas pesquisas discorrem acerca da capacidade das substâncias húmicas (SH), obtidas de diversas origens, em modificar o crescimento, morfologia e arquitetura radicular. Tais efeitos promovidos pela SH poderiam ser divididos dentro de dois diferentes tipos

principais, a saber: efeitos morfológicos sobre a raiz individual (número de células, tamanho celular, tipo de célula, raiz lateral, ou pelos absorventes) (VAUGHAN & MALCOLM, 1985; CANELLAS et al., 2002; SCHMIDT et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007) e efeitos morfológicos sobre a raiz inteira (arquitetura radicular, ramificação e densidade de raízes principais secundárias, e espessura da raiz) ( CANELLAS & OLIVARES, 2014; GARCIA et al., 2016, TAVARES et al., 2017). Muscolo et al. (2007) concluíram que a interação entre o sistema radicular e o material húmico na rizosfera é possível quando moléculas húmicas na solução do solo são bastante pequenas para fluir dentro do apoplasto e alcançar a membrana plasmática. Amostras húmicas de pequeno tamanho molecular, geralmente, são mais biologicamente ativas do que qualquer outro material de maior tamanho (PICCOLO et al., 1992; NARDI et al., 2007).

Canellas et al. (2010), ao estudarem a distribuição e função do tamanho molecular das frações de AH isolados de vermicomposto, mostraram que estas induziram a proliferação da emergência de raízes laterais nas raízes de milho, além de veicular um aumento na área de superfície da raiz. As diferentes frações de ácidos húmicos alteraram a arquitetura radicular e afetaram o padrão de crescimento da raiz, promovendo um tamanho maior de raiz, raízes mais ramificadas, e/ou pelos radiculares com maior área de superfície. Esses resultados corroboram a hipótese de que o efeito de estimulação sobre o crescimento radicular vegetal sofre alterações como as que ocorrem na presença de auxinas (CANELLAS et al., 2016). 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 (CANELLAS et al., 2002; ZANDONADI et al., 2006; ELENA et al., 2009; TAVARES et al., 2017).

## 2.2. Análise de Crescimento de Plantas

A análise de crescimento representa o primeiro passo na interpretação e análise da produção primária, é um método para estimar a produção fotossintética líquida de populações ou comunidades de plantas, empregando práticas de colheitas diretas combinadas com técnicas matemáticas para investigação da produtividade ou biomassa, entre espécies, população ou comunidade, avaliando diferentes genótipos e fenótipos. E desse modo, mensurando os possíveis efeitos edáficos, climáticos e de tempo sobre agroecossistemas.

Uma das vantagens da análise de crescimento é que se trata de um método simples e fácil de ser aplicado, sendo baseado em fatores primários, que podem ser obtidos facilmente, sem grande demanda ou sofisticação de equipamentos de laboratório. Os aparelhos básicos empregados nessa metodologia são balanças, estufa de ventilação forçada e medidor de área foliar. Esses dados primários são usualmente a fitomassa seca de cada planta (LOPES & LIMA, 2015).

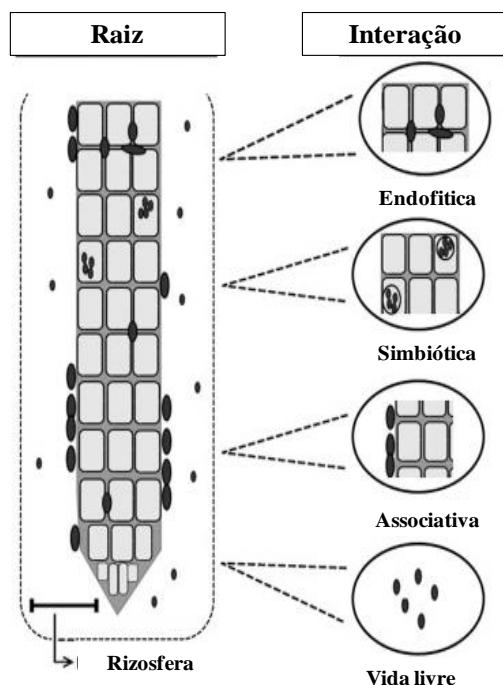
Duas grandezas básicas são requeridas para obtenção da análise de crescimento: a quantidade de material vegetal seco e a matéria seca do sistema assimilatório vegetal, comumente a área foliar. Estas grandezas são adquiridas através de coletas sucessivas em diferentes estádios de ontogenia vegetal. Os componentes do crescimento vegetal podem ser explicados através de diferentes equações, estes componentes são conhecidos como taxa de crescimento. Há duas técnicas principais empregadas para o cálculo destas taxas, a "clássica" ou "tradicional" e a "funcional". Na primeira, as taxas são calculadas em intervalos de tempo fixados por duas amostras sucessivas ao longo do ciclo, utilizando formulas previamente deduzidas. Na segunda, há a adaptação de funções matemáticas aos dados originais, e destes são derivados os índices de crescimento (ARAÚJO & ROSSIELLO, 2013).

Segundo Hunt (1982), as distintas taxas utilizadas na análise de crescimento vegetal podem ser resumidas em três tipos básicos: taxa de crescimento relativo (TCR), que expressa a quantidade de material vegetal produzido por quantidade de material existente, durante um

intervalo de tempo; taxa de crescimento absoluto (TCA), que expressa a variação de uma grandeza (crescimento, por exemplo) em um determinado período; e a taxa de assimilação líquida (TAL), que expressa o incremento de massa de matéria seca por unidade de área foliar existente na planta (PEIXOTO & PEIXOTO, 2004).

### 2.3. Bactérias Promotoras de Crescimento: produção de AIA

A rizosfera pode ser definida como ambiente no qual o sistema radicular possui intensa influência sobre os processos mediados por microrganismos, constituindo-se de uma região do solo adjunta às raízes das plantas que se estende a poucos milímetros do rizoplano, apresentando grande importância nas interações planta-microrganismos (LYNCH, 1990). Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) constituem um grupo de microrganismos diversificado e benéfico capaz de aumentar o crescimento das plantas, protegê-las de estresses bióticos e abióticos. As BPCVs incluem aquelas que possuem vida livre, que formam relações simbióticas específicas com plantas (ex. *Rhizobia* spp. e *Frankia* spp), as associadas e as endofíticas (Figura 1) (SOUZA et al., 2015).



**Figura 1.** Diferentes tipos de interações entre raízes de plantas e bactérias promotoras de crescimento vegetal presentes no solo (Esquema adaptado de Souza et al., 2015).

As BPCVs possuem dois modos de ação frente à promoção de crescimento: atuam diretamente, através do fornecimento de recursos ou modulando os níveis de hormônios vegetais. E no modo indireto, reduzindo ou impedindo os efeitos deletérios de patógenos sobre crescimento e desenvolvimento das plantas (GLICK, 2012).

A produção de fitormônios por bactérias pode estimular o crescimento vegetal, as auxinas em especial o AIA sintetizado por estes microrganismos pode estar envolvido em diferentes níveis na interação planta-bactéria (GLICK, 2012). A resposta da planta a presença de AIA varia, o AIA liberado pela bactéria atua em conjunto com AIA produzido pela planta, de modo que o impacto gerado por esse fitormônio possa ser positivo ou negativo dependendo do balanço hormonal entre o AIA exógeno e endógeno e também, pela sensibilidade do tecido vegetal. Como no caso de plantas de pepino, que apresentaram maior crescimento quando

inoculadas com a estirpe selvagem de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (produtoras de AIA) do que quando inoculadas com a cepa superprodutora de AIA (DUCA et al., 2014). Em experimento com milho utilizando diferentes estirpes geneticamente modificadas, a contribuição da biossíntese de auxinas por *Azospirillum brasiliense* na alteração da morfologia radicular foi avaliada. A inoculação com estirpes selvagens de *A. brasiliense* Sp7 e Sp 245 culminou na diminuição da raiz principal e aumento de pêlos radiculares, estes efeitos não foram observados quando se utilizou as estirpes mutantes (DOBBELAERE et al., 1999). Por outro lado, a inoculação de *Pseudomonas fluorescent* BSP53a que superproduzem AIA afetou positivamente o desenvolvimento de estacas em groselheira-preta, com efeito mais acentuado no peso e na morfologia do sistema radicular, sugerindo o efeito estimulante ao AIA adicional da bactéria (DUBEIKOVSKY et al., 1993). Além disso, o tamanho populacional desses microrganismos afeta a quantidade de AIA compelido a planta e, por conseguinte, pode influenciar na promoção ou inibição do crescimento da planta pela bactéria (DUCA et al., 2014). Já foi relatado que além do efeito direto a promoção de crescimento, bactérias produtoras de AIA podem atuar na inibição de patógenos. A *Pseudomonas putida* 1290, além de sintetizar também é capaz de catabolizar AIA. Em experimento com co-inoculação em raízes de rabanete, está estirpe reduziu os efeitos deletérios de altas concentrações de AIA produzidos por bactérias fitopatogênicas. Acendendo a importância de microrganismos que catabolizam AIA na prevenção do ataque de patógenos (LEVEAU & LINDOW, 2005).

### **3. CAPÍTULO I**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO SISTEMA RADICULAR E  
PRODUÇÃO DE MASSA EM PLANTAS DE ARROZ POR BACTÉRIAS  
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL**

### 3.1. RESUMO

A rizosfera compreende a região do solo que apresenta grande influência das raízes, onde ocorre o máximo desenvolvimento e atividade das comunidades microbianas, incluindo microrganismos capazes de promover o crescimento vegetal. Entre estes últimos, as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) colonizam raízes e atuam por mecanismos diretos e indiretos no aumento do crescimento das plantas. A modificação na morfologia de raízes por essas bactérias implica muita das vezes no aprimoramento da ramificação das raízes laterais e no desenvolvimento de pelos radiculares, melhorando a nutrição de planta e influenciando sua fisiologia. O objetivo do trabalho foi avaliar a resposta morfológica do sistema radicular de plântulas de arroz frente à inoculação com *Escherichia coli*, *Azospirillum brasiliense* sp 245, *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5, *Gluconacetobacter diazotrophicus* lao- em solução nutritiva de Hoagland. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições para cada tratamento. Ao final do experimento foram avaliados os seguintes parâmetros: massa fresca de parte aérea e raiz, massa seca de raiz e parte aérea, comprimento, área de superfície, diâmetro médio, volume e número de pontas. A massa fresca e massa seca da parte aérea e diâmetro médio apresentaram diferença significativas entre os tratamentos. A inoculação da estirpe *G. diazotrophicus* PAL 5 proporcionou maior crescimento das plantas de arroz. Por outro lado, a *E. coli* promoveu engrossamento da raiz.

**Palavras chave:** *G. diazotrophicus* PAL 5. Massa seca. Diâmetro radicular.

### **3.2. ABSTRACT**

The rhizosphere comprises the soil region that shows great influence of the roots, where the maximum development and activity of the microbial communities occurs, including microorganisms capable of promoting plant growth. Among the latter, growth-promoting bacteria (PGPB) colonize roots and act by direct and indirect mechanisms in increasing plant growth. The modification in root morphology by these bacteria often implies the improvement of lateral root branching and the development of root hair, improving plant nutrition and influencing its physiology. The objective of this work was to evaluate the morphological response of the root system of rice seedlings against the inoculation with *Escherichia coli*, *Azospirillum brasilense* sp 245, *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain PAL 5, *Gluconacetobacter diazotrophicus* lao- in nutrient solution from Hoagland. The experimental design was completely randomized with eight replicates for each treatment. At the end of the experiment, the following parameters were evaluated: Fresh weight of shoot and root, dry mass of root and shoot, length, surface area, mean diameter, volume and number of tips. The fresh weight and dry mass of the aerial part and average diameter showed a significant difference between the treatments. Inoculation of the *G. diazotrophicus* PAL 5 strain resulted in higher growth of rice plants. On the other hand, *E. coli* promoted thickening of the root.

**Key words:** *G. diazotrophicus* PAL 5. Dry mass. Root diameter.

### **3.3. INTRODUÇÃO**

Além do papel na fixação da planta ao solo, absorção de água e de íons, armazenamento de nutrientes e crescimento do vegetal, o sistema radicular está em contato direto com populações microbianas do solo (BERG & SMALLA, 2009). As raízes das plantas liberam uma grande diversidade de nutrientes orgânicos e sinais moleculares que atraem populações microbianas, especialmente aquelas capazes de metabolizar compostos exsudados e de se proliferar neste habitat (VACHERON et al., 2013). A arquitetura do sistema radicular é de grande importância para a exploração eficiente de recursos no solo e para a sobrevivência das plantas sob condições menos favoráveis. A plasticidade do sistema radicular é devida a fatores genéticos, abióticos e bióticos, incluindo neste último, a ação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (OSMONT, SIBOUT, & HARDTKE, 2007; ÖTVÖS & BENKOVÁ, 2017).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são um grupo de microrganismos que colonizam as raízes das plantas e conferem benefícios ao crescimento e ao desenvolvimento vegetal, através de efeitos diretos e indiretos. Os efeitos incluem o aumento da aquisição de nutrientes para a planta, produção de fitohormônios e controle ou inibição da atividade de patógenos. Diferentes gêneros bacterianos, como *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Serratia* abrigam estirpes específicas relatadas como BPCV (VACHERON et al., 2013; PODILE & KISHORE, 2007).

As BPCV sintetizam fitohormônios, os quais estão relacionados com o padrão de crescimento das raízes, resultando em raízes mais ramificadas e/ou com maior área de superfície. O ácido indol-3-acético (AIA) é comumente produzido por essas bactérias, o que parece conferir às plantas raízes mais desenvolvidas. Outros hormônios vegetais também são produzidos pelas BPCV, porém geralmente não na mesma proporção que o AIA (VESSEY, 2003).

BPCV tais como *Azospirillum irakense* e *Herbaspirillum seropedicae* já foram relatadas como moduladoras da arquitetura radicular em arroz (SEKAR, et al., 2000, BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012). Chamam et al. (2013) e Rodrigues et al. (2016) mostraram o efeito da inoculação de *Azospirillum lipoferum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5 sobre o aumento do número de raízes, o comprimento total da raiz e a superfície radicular de arroz, respectivamente. Estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5 selvagens e seu mutante que produz 95% menos AIA foram testadas frente inoculação em arroz. Plantas inoculadas com a estirpe selvagem apresentaram desenvolvimento radicular significativamente maior que a estirpe mutante, reforçando o papel desse fitohormônio na morfologia radicular (RODRIGUES et al, 2016). Já em estudos desenvolvidos por Dobbelaere, et al (1999), foi observado que a aplicação de *Azospirillum brasilense* Sp245 e Sp7 resultou no aumento de pelos radiculares e diminuição da raiz primária, efeito característico da auxina.

A melhoria da morfologia radicular é uma das alternativas para a manutenção da produtividade de arroz em diferentes solos e sob condições desfavoráveis (PAEZ-GARCIA et al., 2015). No entanto, apesar de experimentos em campo retratarem a condição real das raízes dentro do contexto agrícola, estudar o sistema radicular sob esta dinâmica é difícil devido à falta de metodologias que forneçam resolução para observação e, a entraves presentes na amostragem, uma vez que há perda de material durante a extração.

Para tanto, abordagens em condições mais controladas como a utilização de experimentação em hidroponia, pode superar essas limitações e permitir o estudo mais efetivo sobre características da raiz (XU, et al., 2013).

Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com diferentes bactérias sobre as alterações morfológicas do sistema radicular, bem como o incremento de fitomassa de plantas arroz em solução nutritiva.

### 3.4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1. Estirpes de bactérias e condições de cultivo

Foram utilizadas nesse experimento as seguintes estirpes: a PAL 5, que é o tipo da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GILLIS et al., 1989); a *Gluconacetobacter diazotrophicus* lao-, que é um mutante da estirpe PAL 5, deficiente na produção de ácido indolacético devido a uma mutação no gene L-amino ácido oxidase (*lao*) (RODRIGUES et al., 2016); *Azospirillum brasiliense* sp 245, uma estirpe isolada de trigo e comprovada como promotora do crescimento de plantas (BALDANI et al., 1983); e *Escherichia coli* DH10b, uma estirpe utilizada como vetor em ensaios de biologia molecular (GRANT et al., 1990).

Os inóculos de *G. diazotrophicus* estirpe PAL 5 lao- foi cedida pelo laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia. A estirpe *A. brasiliense* sp 245 e *G. diazotrophicus* PAL 5 estão depositadas no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) na Embrapa Agrobiologia.

Todas as estirpes foram cultivadas em meio DYGS (BALDANI et al., 2014) a 30 °C por 48 horas em 150 rpm, a *G. diazotrophicus* estirpe PAL 5 lao- foi cultivada nas mesmas condições mas com o antibiótico canamicina . O inóculo de *E. coli* DH10b foi preparado em meio Lb, a 37 °C por 24 horas, a 150 rpm.

#### 3.4.2. Experimento de arroz em condição de hidroponia

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições para cada tratamento. Os tratamentos consistiram na aplicação individual de cada bactéria: *E. coli*, *A. brasiliense* sp 245, *G. diazotrophicus* PAL 5 , *G. diazotrophicus* lao- e em um controle sem inoculação.

As sementes de arroz da variedade Piauí foram inicialmente desinfestadas em hipoclorito de sódio 2%, durante 30 minutos, sob agitação orbital e, em seguida, lavadas dez vezes em água destilada. Depois de desinfestadas, foram germinadas na superfície da lâmina de água de um vaso, sustentadas por uma gaze, de modo que estivessem bem espaçadas para que as raízes não se embaraçassesem durante seu crescimento.

Dez dias após a germinação (DAG), cada vaso plástico foi preenchido com 700 mL de solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) modificada a ½ Força Iônica . Foram alocadas quatro plântulas por vaso. Nos três primeiros dias, as plântulas foram mantidas apenas nessa solução e, após este período, foram inoculadas 5 mL de cada estirpe conforme os tratamentos indicados. O inóculo foi aplicado nas raízes na ocasião da troca de solução nutritiva. O controle recebeu meio de cultivo sem bactéria.

As plantas foram mantidas sob um regime de 12h/12h (luz/escuro) de fotoperíodo a 25 °C, em câmara de crescimento na Embrapa Agrobiologia e foram coletadas 21 DAG.

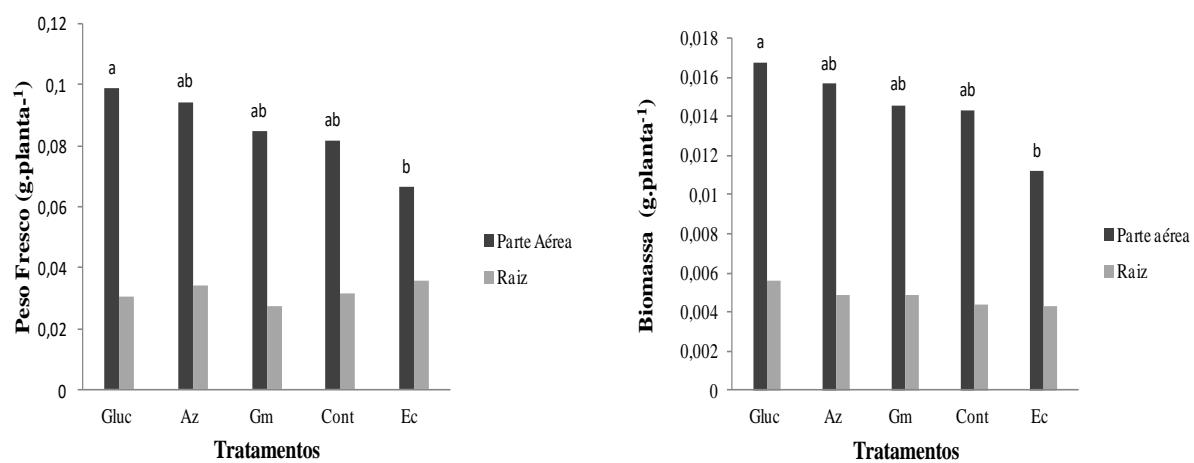
Foram determinadas a massa fresca e seca da parte aérea e da raiz. As raízes de arroz foram uniformemente distribuídas sob camada de água em bandeja transparente de acrílico 30 cm x 40 cm, para sua digitalização em resolução de 600 dpi (pontos por polegada) com um sistema de digitalização Epson Expression 10000XL com unidade de luz adicional (TPU).

Imagens das raízes foram convertidas para formato em tons de cinza de oito bits e individualmente trabalhadas de acordo com Tavares (2014), analisadas e quantificadas por diferentes parâmetros, a saber: comprimento (mm), área de superfície ( $\text{mm}^2$ ), diâmetro médio (mm), volume ( $\text{mm}^3$ ) e número de pontas, usando o software WinRhizo Arabidopsis, 2012b (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.).

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com teste F, e a normalidade dos erros foram verificados pelo teste de Shapiro-Wilk e o teste de Bartlett para a homocedasticidade das variâncias (NETER et al., 1974). As médias foram testadas por Tukey a 5% de probabilidade por meio do pacote *agricolae* (MENDIBURU, 2014). O software utilizado foi R (R CORE TEAM, 2017).

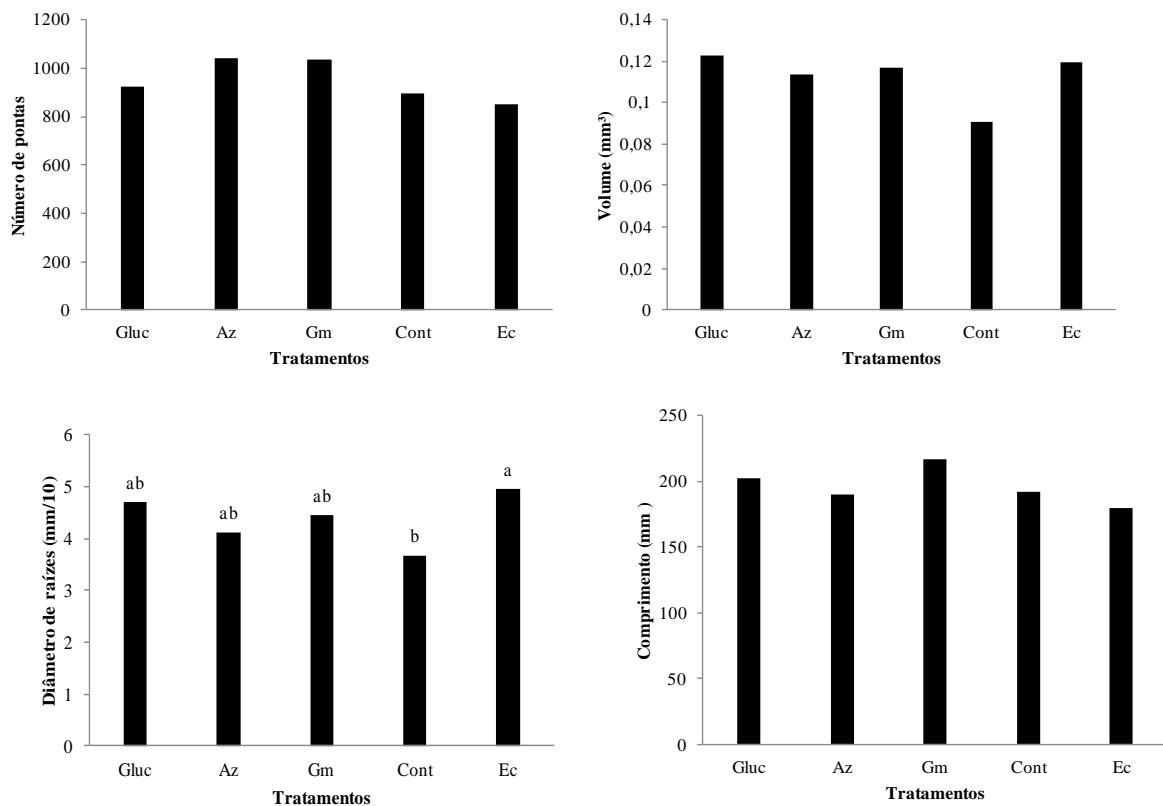
### 3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos com as bactérias promotoras de crescimento promoveram um estímulo sobre a produção da massa fresca da parte aérea das plantas de arroz (Figura 2), porém este não foi grande o suficiente para se diferenciar significativamente do controle não inoculado ( $p \leq 0,05$ ). As plantas inoculadas com a *E. coli*, apresentaram o menor incremento em parte aérea, sendo este mesmo menor que o do controle. Efeito similar foi observado sobre a massa seca. A inoculação da estirpe *G. diazotrophicus* PAL 5 promoveu o crescimento da parte aérea, diferindo-se significativamente do tratamento de inoculação com a *E. coli*. (Figura 2). Os demais tratamentos não diferiram entre si.



**Figura 2.** Massa fresca de parte aérea e de raiz e massa seca de parte aérea e de raiz de plantas de arroz não inoculadas (Cont) e inoculadas, com as bactérias: *G. diazotrophicus* PAL 5 (Gluc), *Azospirillum brasilense* sp 245 (Az), *G. diazotrophicus* lao- (Gm) e *E. coli* (Ec). As letras representam médias que diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os tratamentos não estimularam significativamente o número de pontas, o volume e o comprimento total das raízes. Por outro lado, o tratamento com *E. coli* proporcionou maior diâmetro de raízes se comparado ao controle sem inoculação (Figura 3), que apresentou o menor diâmetro de raízes dentre todos os tratamentos.



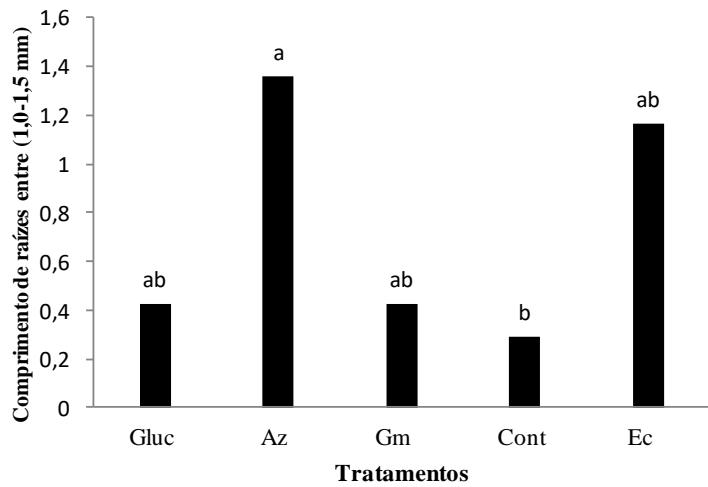
**Figura 3.** Número de pontas, volume total de raiz, diâmetro médio de raízes e comprimento total das raízes de arroz não inoculadas (Cont) e inoculadas, com as seguintes bactérias: *G. diazotrophicus* PAL 5 (Gluc), *Azospirillum brasilense* sp 245(Az), *G. diazotrophicus* lao- (Gm) e *E. coli* (Ec). As letras representam médias que diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O comprimento de raízes superfinais (diâmetro entre 1,0-1,5 mm) (TAVARES, 2014) foi estimulado quando as plantas de arroz foram inoculadas com *A. brasilense* sp 245 (Figura 4). O tratamento sem inoculação apresentou menor comprimento de raízes superfinais. Os demais tratamentos não diferiram.

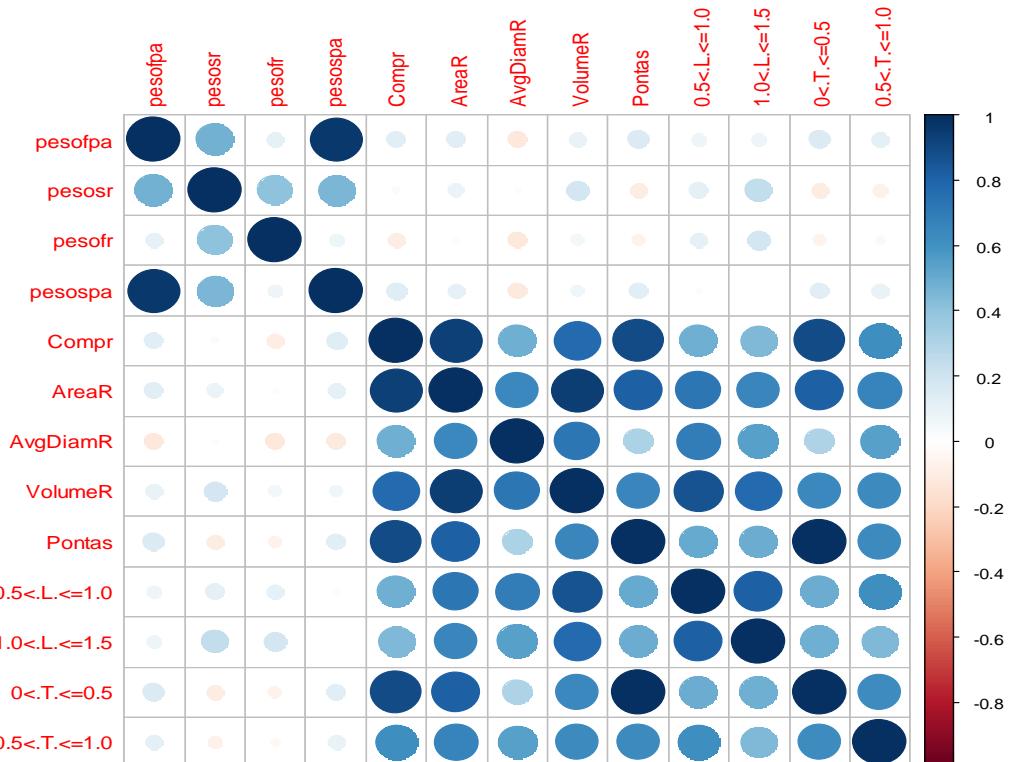
A massa fresca da raiz apresentou baixo grau de associação com a massa seca de raiz (Figura 5).

Já a massa fresca da parte aérea apresentou correlação alta, positiva e significativa com a massa seca da parte aérea. Além disso, tanto a massa fresca quanto seca, apresentou baixo grau de associação com os parâmetros morfológicos da raiz (Figura 5).

A correlação entre comprimento e área de superfície, foi alta, positiva e significativa ( $p<0,01$ ), assim como a correlação entre o comprimento com número de pontas e com a classe de raízes superfinais ( $0 < T \leq 0,5$ ). O comprimento também apresentou correlação positiva e significativa com volume e diâmetro de raiz, sendo o último com grau fraco de associação. A classe de raízes superfinais também apresentou correlação alta, positiva e significativa com o número de pontas e com a área de superfície. O volume apresentou alta, positiva e significativa correlação com a área de superfície. Este apresentou também correlação com o diâmetro médio, sendo ela mais fraca em relação ao volume com o comprimento e área de raiz.



**Figura 4.** Comprimento de raiz com diâmetro entre 1,0-1,5 mm de plantas de arroz não inoculadas (Cont) e inoculadas, com as bactérias: *G. diazotrophicus* PAL 5 (Gluc), *Azospirillum brasiliense* sp 245(Az), *G. diazotrophicus* lao- (Gm) e *E. coli* (Ec). As letras representam médias que diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 5.** Matriz de correlação de Pearson para dados de parte aérea raiz e para parâmetros morfológicos radiculares de plantas de arroz inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL 5, *Azospirillum brasiliense* sp 245, *G. diazotrophicus* lao- e *E. coli* e para não inoculadas.

A avaliação da promoção do crescimento das plântulas de arroz através da alteração morfológica no sistema radicular, bem como a massa fresca e massa seca da parte aérea e de raiz mostraram um efeito da inoculação da estirpe *G. diazotrophicus* PAL 5 na promoção de crescimento da parte área, diferindo significativamente do tratamento inoculado com *E. coli*. Enquanto os demais tratamentos (Az, Gm e Cont) não diferiram entre si.

Rodrigues et al. (2016), em um experimento de inoculação do arroz, verificaram que houve menor desenvolvimento das raízes (comprimento, superfície, número de pontas e ramificação) como consequência da inoculação com *G. diazotrophicus* lao- se comparada à inoculação com a estirpe selvagem. Contudo, o mesmo comportamento não foi observado no presente estudo. De fato, as plantas inoculadas com a estirpe PAL 5 e com a estirpe lao- obtiveram o mesmo número de pontas, volume, diâmetro e comprimento de raízes.

Uma possível explicação é devido a diferença no delineamento experimental (presença e ausência de n na solução de Hoaglang) e pelos diferentes tempos de avaliação. Rodrigues et al. (2016) verificaram efeitos significativos no desenvolvimento inicial da planta, aos 3 e 7 dias, enquanto no presente trabalho avaliou-se as mesmas variáveis 21 dias após a germinação.

Embora não tenha ocorrido diferença no que diz respeito às raízes, ainda assim observou-se uma menor produção de massa fresca e seca quando a planta foi inoculada com a *G. diazotrophicus* mutante em comparação com a selvagem (Figura 1). A análise estatística mostra ambiguidade, o que não permite dizer que houve uma diferença significativa entre esses dois tratamentos, porém, vê-se que uma menor produção de biomassa foi estimulada pela estirpe mutante. O tratamento com a *G. diazotrophicus* PAL 5 foi o único que se destacou do pior tratamento, o inoculado com *E. coli*. Isto demonstra que essa estirpe tem potencial para estimular o crescimento do arroz, mesmo tendo sido originalmente isolada de cana-de-açúcar (GILLIS et al., 1989). Na cana-de-acúcar, a *G. diazotrophicus* PAL 5 é capaz de promover o aumento de raízes laterais e adventícias, conforme verificado em experimento hidropônico sem nitrogênio em cana-de-açúcar micropagada (GALVÃO, 2012).

Sevilla et al. (2001) observaram que em experimento em câmara de crescimento com cana de açúcar em condição de nitrogênio limitante, plantas inoculada com estirpe PAL 5 e a mutante MAd3A ( nif –) apresentaram comportamentos diferentes. As plantas inoculadas com PAL 5 apresentaram maior conteúdo de N do que plantas inoculadas com a mutante ou sem inoculação, indicando que o N fixado durante a associação da planta com a estirpe PAL 5 melhora o desempenho da planta. Quando N não era limitante, a estimulação do crescimento foi observada em plantas inoculadas com ambas as bactérias, sugerindo um efeito adicional de *G. diazotrophicus* à FBN.

O *Azospirillum brasilense* já é conhecido de longa data como capaz de promover o crescimento de plantas (BALDANI et al., 1983; BODDEY et al., 1986), o que inclui plantas de arroz (ISAWA et al., 2010; de SALAMONE et al., 2012; GARCIA et al., 2016). Aqui, essa bactéria, no caso a estirpe *A. brasilense* Sp245, foi a que mais estimulou o crescimento de raízes finas dentre as bactérias inoculadas. Ela também estimulou acúmulo de biomassa, embora este não tenha sido grande o suficiente para se diferir do controle.

A *E. coli* mostrou ter efeito sobre as plantas de arroz, com um aumento no número de raízes grossas e finas. Esta espécie já foi relatada como sendo promotora do crescimento de plantas (WALKER et al., 2013), promovendo ganho de biomassa de raízes em plântulas de milho cultivadas em solo não esterilizado. Esses dados indicam que a planta também é capaz de responder a bactérias que não são originárias do solo.

### **3.6. CONCLUSÕES**

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal promoveu alterações dos parâmetros morfológicos do sistema radicular e no incremento de fitomassa das plantas arroz em solução nutritiva.

A inoculação da estirpe *G. diazotrophicus* PAL 5 proporcionou maior crescimento das plantas de arroz. Por outro lado, a *E. coli* promoveu engrossamento da raiz.

## **4. CAPÍTULO II**

### **ANÁLISE QUANTITATIVA DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS DE ARROZ TRATADAS COM ÁCIDO HÚMICO**

#### **4.1. RESUMO**

Os efeitos das substâncias húmicas (SH) em plantas são diversos e complexos, há trabalhos que mostram a ação de ácido húmico – que compõe uma das frações das SH- no estímulo do crescimento e número de raízes em plantas de arroz, bem no feito sobre o metabolismo das plantas. Tendo em vista a bioatividade de AH em plantas, o trabalho teve como objetivo caracterizar os componentes fisiológicos de plântulas e parâmetros morfológicos do sistema radicular de arroz com e sem aplicação de AH. O estudo foi realizado em câmara de crescimento no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, o delineamento foi inteiramente casualizado com onze coletas a cada 24 horas. Os tratamentos consistiram da aplicação de ácido húmico extraído com KOH na dose de 80mg AH L<sup>-1</sup>, com 12 repetições por tratamento. As diferentes características de raízes mensuradas foram: comprimento total, área total de superfície, volume total e número total de pontas, número de ramificações e diâmetro médio das raízes, bem como dentro das classes de diâmetro (raízes superfinais, finas e grossas). A partir das funções ajustadas foram derivadas as taxas de crescimento absoluto, taxa de crescimento relativo, taxa de assimilação líquida e adicionalmente a área foliar específica, razão de área foliar, relação raiz:parte aérea. A aplicação de ácido húmico estimulou o crescimento e o metabolismo das plantas de arroz, demonstrado pelos aumentos nas taxas avaliadas, no acúmulo de biomassa total, da parte aérea e no desenvolvimento radicular (comprimento, área e volume de raízes).

**Palavras-chave:** Análise de crescimento. Bioatividade de AH. Sistema radicular.

## 4.2. ABSTRACT

The effects of humic substances (SH) on plants are diverse and complex, there are studies that show the action of humic acid - which makes up one of the SH - fractions in the growth stimulus and number of roots in rice plants, the metabolism of plants. Considering the bioactivity of AH in plants, the objective of this work was to characterize the physiological components of seedlings and morphological parameters of the root system of rice with and without AH application. The study was carried out in a growth chamber in the Department of Soils of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, the design was completely randomized with eleven collections every 24 hours. The treatments consisted of the application of humic acid extracted with KOH at the dose of 80mg AH L-1, with 12 replicates per treatment. The different root characteristics measured were: total length, total surface area, total volume and total number of roots, number of branches and mean root diameter, as well as within diameter classes (superfine, fine and coarse roots). The absolute growth rates, relative growth rate, net assimilation rate, and the specific leaf area, leaf area ratio, root ratio: aerial part were derived from the adjusted functions. The application of humic acid stimulated the growth and metabolism of rice plants, demonstrated by the increases in the evaluated rates, in the accumulation of total biomass of the aerial part and in the root development (length, area and volume of roots).

**Key words:** Growth analysis. Bioactivity of AH. Root system.

### 4.3. INTRODUÇÃO

As raízes são órgãos que, além de responsáveis pela ancoragem das plantas, estão envolvidos nas mais diversas atividades vitais destas, tais como na absorção e assimilação de nutrientes, na aquisição de água e na síntese de hormônios vegetais, ácidos orgânicos e aminoácidos, além de representarem o local de interação com os organismos benéficos e patogênicos na rizosfera (DEN HERDER et al., 2010; PAEZ-GARCIA et al., 2015). Sua morfologia e fisiologia estão intimamente associadas ao crescimento, desenvolvimento e produtividade da planta, especialmente sob condições adversas (SERRAJ et al., 2004; LYNCH, 2007).

A habilidade de adaptação do sistema radicular, através de mudanças morfológicas e fisiológicas às condições do ambiente, é dada pela plasticidade fenotípica (LÓPEZ-BUCIO et al., 2002). Neste contexto, as plantas que apresentam maior plasticidade são mais competitivas (FAN et al., 2003). Assim, a adaptação e produção das plantas em diferentes ambientes é o resultado da interação entre as raízes e os componentes abióticos e bióticos do solo. Estas interações representam o principal meio pelo qual as plantas extraem recursos como água e nutrientes do solo.

A capacidade produtiva de um genótipo pode ser determinada pela técnica de análise de crescimento que, em síntese, é um método para estimar a produção fotossintética líquida de populações ou comunidades de plantas, utilizando práticas de colheitas diretas combinadas com cálculos matemáticos para a investigação da produtividade de agroecossistemas (LOPES & LIMA, 2015) ou em condições controladas (FRANÇA et al., 1999; 2008).

Sabendo-se que as substâncias húmicas (SH) atuam sobre a morfologia, fisiologia e biologia molecular das raízes (TREVISAN et al., 2010, ZANDONADI et al., 2007, JANNIN et al., 2012), contribuindo para melhorar a eficiência de utilização dos recursos pelas culturas e tolerar melhor os efeitos ambientais adversos (BERBARA & GARCIA, 2014).

Em relação ao aumento da aquisição de nutriente, foi observado o efeito de ácidos húmicos (AH) extraído de vermicomposto na alteração de parâmetros cinéticos de absorção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, bem como nos genes de alta e baixa afinidade para transporte de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, e sobre as isoformas de H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática, aumentando a absorção desse nutriente sob baixo e alto suprimento (TAVARES et al., 2017). Como também a ação de AH na regulação da expressão de genes de enzimas de assimilação de N aumentando a síntese de aminoácidos e proteínas solúveis em folhas (VACCARO et al., 2015).

Alterações no sistema radicular e maior rapidez na absorção de nutrientes são características altamente desejáveis as culturas. Como relatado acima, tais atributos podem ser obtidos quando se aplica AH.

A técnica de análise de crescimento possibilita descrever de forma quantitativa o comportamento diferenciado da mesma cultivar, quando esta recebe a aplicação de ácido húmico. Este trabalho objetivou caracterizar os componentes fisiológicos, as diferenças no acúmulo, distribuição de massa seca do arroz e mudanças dos parâmetros morfológicos do sistema radicular em resposta à aplicação de ácido húmico (AH) por meio da análise quantitativa do crescimento.

## 4.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1. Caracterização espectroscópica de (<sup>13</sup>C-CP MAS NMR) e composição elementar dos ácidos húmicos de vermicomposto

O ácido húmico (AH) foi cedido pelo laboratório de Biologia do Solo. Esse foi proveniente de vermicomposto de esterco bovino fornecido pela Fazendinha Agroecológica Km 47 – Seropédica. O AH foi isolado e purificado de acordo com a metodologia recomendada pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2016). A extração foi feita com KOH e a caracterização por espectroscopia (RMN) e CHN (TAVARES, 2014). A distribuição relativa de carbono em regiões de deslocamento químico (ppm) dos espectros de <sup>13</sup>C-CPMAS-RMN, apresentou C-alquil-H,R (19,79%), Metoxilas e C-alquil-O,N (12,5%), C-alquil-O (13,54%), C-alquil-di-O (anomérico) (6,25%), C-aromático- H,R (19,79%), C-aromático-O,N (8,33%), C-carboxila-H,R (10,42%), C-carbonila (9,38%), com grau de aromaticidade (28,13%) e alifaticidade (71,88%), índice de hidrofobicidade (0,66%) e quantidade relativa de carbono (34,9%), nitrogênio (3,39%), hidrogênio (4,58%), Razão Carbono/Nitrogênio (10,31) e Matéria Orgânica (60,2%) em base seca de ácido húmico extraído com KOH. Tais atividades foram desenvolvidas previamente ao experimento no laboratório de Biologia do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

### 4.4.2. Condução do experimento

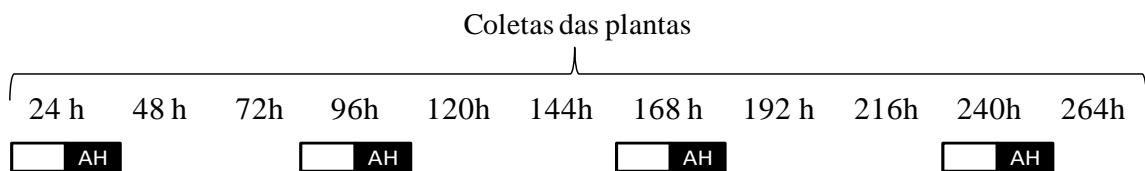
O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2 x 11, tendo como fatores a aplicação de ácido húmico (com ácido húmico e sem ácido húmico) e onze épocas de coleta, totalizando vinte e quatro tratamentos. Cada tratamento possuiu seis repetições, totalizando 144 vasos. Cada repetição possuia quatro plântulas de arroz.

Os vasos plásticos foram pintados externamente com tinta alumínio e vedados com tampas de isopor, tendo sua superfície revestida por papel alumínio. Essas tampas continham quatro orifícios, nos quais quatro plântulas foram postas e fixadas por tiras de espumas que envolviam a região do colo. A solução nutritiva foi trocada a cada três dias e, em função da espécie cultivada, não foi necessário proceder a aeração. Os vasos foram dispostos no interior da câmara de crescimento em três bancadas, a cada coleta os vasos remanescentes foram remanejados entre as bancadas, a fim de se aumentar o espaçamento e proceder a casualização.

As sementes de arroz da variedade Piauí foram inicialmente desinfestadas em hipoclorito de sódio 2%, durante 30 minutos, sob agitação orbital e, em seguida, lavadas dez vezes em água destilada. Depois de desinfestadas, as sementes foram colocadas para germinar em superfície de lâmina de água destilada, sustentada por uma gaze, em vaso, de modo que estivessem bem espaçadas para que as raízes não se embaraçasse durante seu crescimento. Sete dias após a germinação (DAG), as plântulas foram selecionadas por uniformidade e tamanho e, então transferidas para vasos plásticos com capacidade de 0,7 L, tendo-se o cuidado de remover o endosperma remanescente. A água destilada foi substituída pela solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) formulada a  $\frac{1}{8}$  da força iônica (FI) com o propósito de submeter as plântulas a um período de pré-adaptação neste ambiente. Aos 14 DAG, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos preenchidos com solução a  $\frac{1}{4}$  FI. Trocas de solução para  $\frac{1}{2}$  FI foram realizadas a cada três dias ao longo do experimento. A cada troca de solução nutritiva, a nova solução tinha seu pH ajustado para valores de 5,5-5,6 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N antes da aplicação dos micronutrientes.

As plantas foram mantidas sob um regime de 14h/10 h (luz/escuro) de fotoperíodo com  $480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fluxo de fóton fotossintético, umidade do ar relativa de 70% e temperaturas de 28 °C/24 °C (dia/noite), em câmara de crescimento, no Departamento de Solos da UFRRJ. Os tratamentos consistiram na aplicação ou não de ácido húmico (AH) na dose de 80 mg AH L<sup>-1</sup>, que é a maior dose de indução conforme definido por Tavares et al. (2014). A cada troca de solução ocorreu a reaplicação de ácido húmico nos vasos correspondentes.

Ao longo do crescimento das plantas após o transplantio, foram realizadas coletas durante onze dias para a determinação da massa da matéria seca, a área foliar e parâmetros morfológicos da raiz. As coletas foram realizadas a cada 24 horas e, em cada amostragem, as plantas foram separadas em folha, bainha e raiz. A área foliar foi estimada utilizando-se um medidor fotoelétrico (LI-3000, Li-Cor). As raízes foram armazenadas em tubos para centrifugação de 50 mL, contendo álcool 50% a -20°C, para análises no software WinRhizo Arabidopsis, 2012b (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.). Posteriormente, o material vegetal foi seco em estufa com circulação forçada de ar entre 65°C e 70°C, e a massa determinada em balança de precisão.



**Figura 6.** Esquema do experimento para avaliação do crescimento, coleta de plantas a cada 24 horas para determinação da massa da matéria seca, área foliar e parâmetros morfológicos da raiz. Troca de solução de Hoagland com e sem adição de ácido húmico ocorreu às 24, 96, 168 e 240 horas.

#### 4.4.3. Processamento das amostras

As raízes de arroz foram uniformemente distribuídas sob camada de água em bandeja transparente de acrílico 30 cm x 40 cm, para digitalização em resolução de 600 dpi (pontos por polegada) em sistema de digitalização Epson Expression 10000XL com unidade de luz adicional (TPU). Imagens das raízes foram convertidas para formato em tons de cinza de oito bits e individualmente trabalhadas de acordo com Tavares (2014), analisadas e quantificadas por diferentes parâmetros, a saber: comprimento (mm), área de superfície (mm<sup>2</sup>), diâmetro médio (mm), volume (mm<sup>3</sup>) e número de pontas dentro das classes de raízes superfinais ( $0,5 < d < 1,5$  milímetros), finas ( $1,5 < d < 3,5$  milímetros) e grossas ( $d > 3,5$  milímetros), usando o software WinRhizo Arabidopsis, 2012b (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.).

Foi adotado o método não estatístico Regent para realizar medições da morfologia radicular em WinRhizo (ARSENault et al., 1995; Régent Instruments, 2012). Os limites das imagens foram definidos e então importados para o software WinRHIZO para análise de caracteres de raiz e quantificação. As imagens foram analisadas usando um grid de calibração como uma escala de referência e alterou-se as configurações de entrada para raízes pálidas em um fundo preto (SOUSA et al, 2012; Régent Instruments, 2012; TAVARES, 2014). Em seguida os dados foram analisados através do XLRhizo (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.). Esses macros adicionam análise e comandos gráficos de raiz aos comandos padrão do Excel (Microsoft Corp.) para análise de arquivos de dados produzido pelo WinRhizo.

#### 4.4.4. Análise quantitativa do crescimento

A análise do crescimento vegetal foi feita em função de massa seca total e área foliar. Os dados originais foram ajustados por meio de regressão não-linear, derivando-se as taxas de

crescimento, obtendo-se estimativas de valores instantâneos das taxas (ARAUJO & ROSSILO, 2013). Assim, dentre os vários modelos propostos por Hunt (1982), optou-se por trabalhar com o modelo Logístico a partir de processos iterativos (ARAUJO, 2013). A seleção do modelo foi baseada na significância dos coeficientes estimados, o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) conjuntamente com a tendência global de variação temporal da variável mensurada (FRANCA, 1995). É um modelo assintótico, tendendo a um valor máximo. A partir da função Logística para massa seca e índice de área foliar, foram obtidas as taxas de crescimento absoluto (TCA), crescimento relativo (TCR) e de assimilação líquida (TAL), calculadas segundo as seguintes expressões:

$$C = \frac{\alpha}{1 \pm \beta \times e^{(-\kappa \times T)}} \quad (g) \quad (\text{eq. 1})$$

$$TCA = \frac{\alpha \times \beta \times \kappa \times e^{(-\kappa \times T)}}{1 \pm \beta \times e^{(-\kappa \times T)^2}} \quad (\text{g.hora}^{-1}) \quad (\text{eq. 2})$$

$$TCR = \frac{\beta \times \kappa \times e^{(-\kappa \times T)}}{1 \pm \beta \times e^{(-\kappa \times T)}} \quad (\text{g.g}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}) \quad (\text{eq. 3})$$

$$TAL = \frac{1}{A} \times \frac{dW}{dT} \quad (\text{g.m}^{-2} \cdot \text{hora}^{-1}) \quad (\text{eq. 4})$$

Assim,  $C$  corresponde aos dados observados,  $T$  ao tempo nas horas após a aplicação dos tratamentos e,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  aos coeficientes obtidos por regressão. O modelo logístico foi escolhido devido as significância dos coeficientes estimados ao  $R^2$  observado (maior que 70%), e ao significado biológico apropriado das curvas obtidas. A taxa de crescimento absoluto (TCA) exprime a velocidade de produção de biomassa por unidade de tempo. A taxa de crescimento relativo (TCR) exprime a velocidade de produção de biomassa por unidade de material preexistente (HUNT, 1981).

Os demais componentes do crescimento vegetal também foram calculados como razão de área foliar (RAF), razão de peso foliar (RPF), área foliar específica (AFE) segundo Silva et al., (2000), França et al. (2008), Araújo (2013). Foram ajustadas funções matemáticas aos dados primários de área foliar e massa seca, por processo iterativo utilizando o pacote DRC (RITZ & STREBIG, 2016). O software utilizado foi o R (R CORE TEAM, 2016):

$$RAF = \frac{A}{W} \quad (\text{m}^{-2} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (\text{eq. 5})$$

$$RPF = \frac{Lw}{W} \quad (\text{g.g}^{-1}) \quad (\text{eq. 6})$$

$$AFE = \frac{A}{Lw} \quad (\text{m}^{-2} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (\text{eq. 7})$$

onde:  $W$  = Massa seca total;  $Lw$  = Massa seca de folhas;  $A$  = Área foliar.

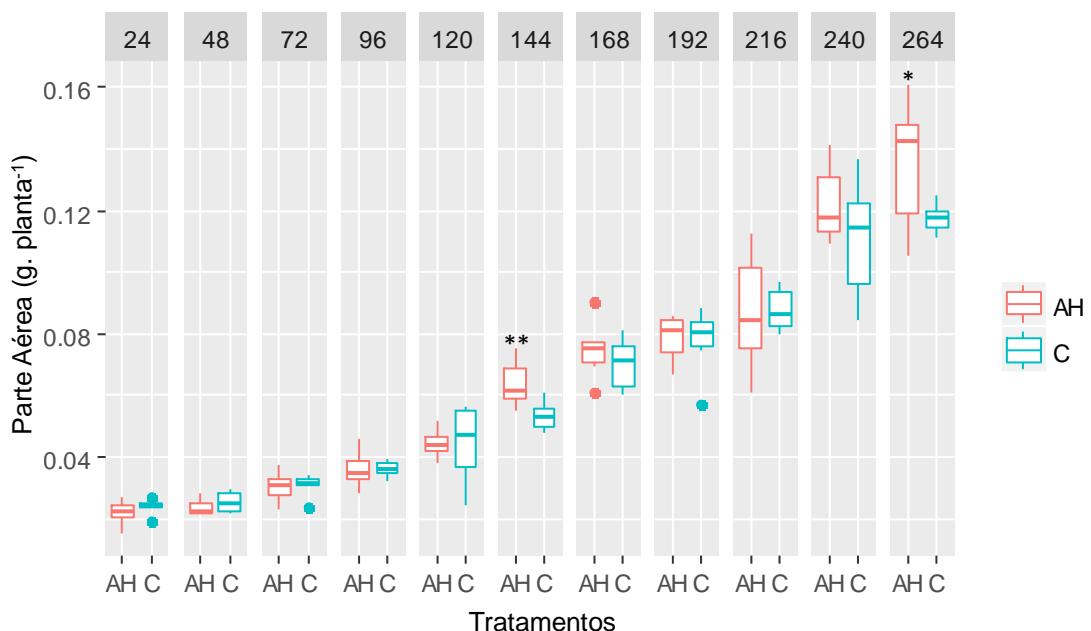
Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com teste F. A normalidade dos erros, foram verificados pelo teste de Shapiro-Wilk e o teste de Bartlett para a homocedasticidade das variâncias (NETER et al., 1974). Os dados foram apresentados como boxplot com as significâncias do teste F, utilizando o pacote ggplot2 (WICKHAM & CHANG, 2017).



## 4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1. Massa seca da parte aérea

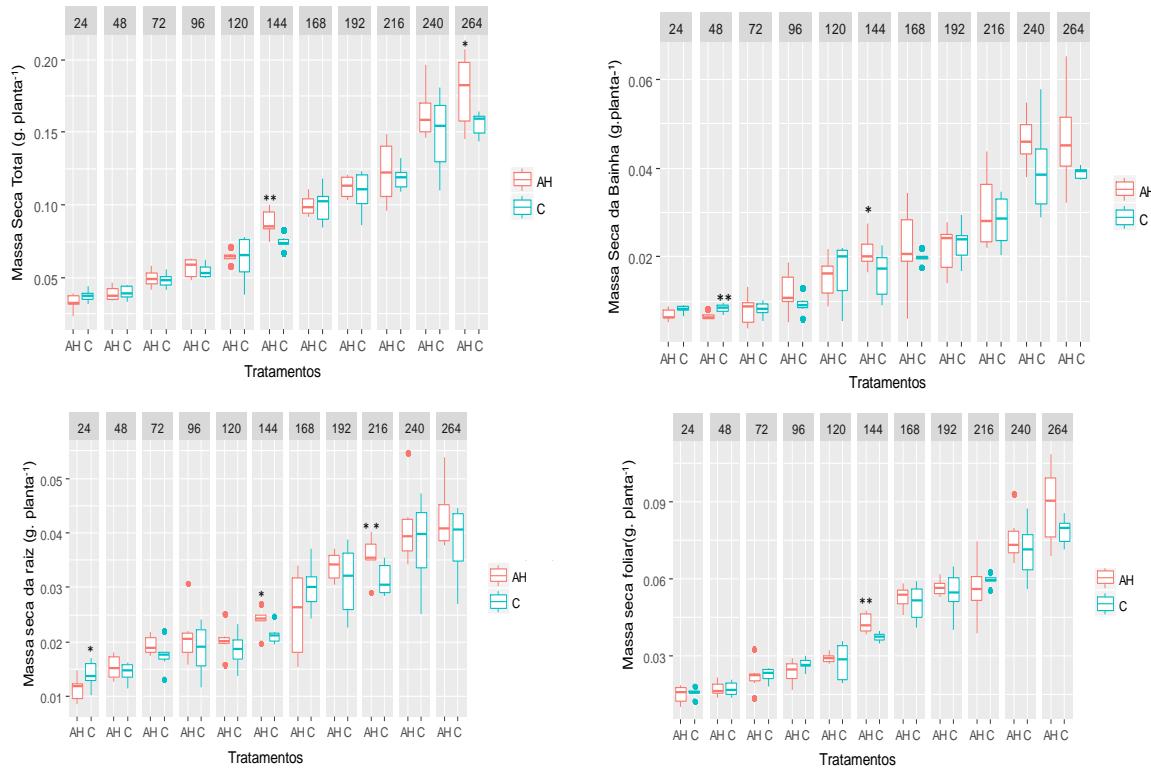
A massa seca da parte aérea (Figura 7) de ambos os tratamentos ao longo do tempo se porta ascendente, e as 144 horas há o primeiro momento de diferença significativa entre os tratamentos, no período de 192 e 216 horas, há uma aparente estagnação. Após esse intervalo a massa da parte aérea é estimulada e as 264 horas o tratamento com AH se destaca novamente.



**Figura 7.** Massa Seca da Parte Aérea de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (\*) e 5% (\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

### 4.5.2. Partição de massa seca

A Figura 8 mostra a distribuição do acúmulo de massa seca total (MST) e nas porções vegetativas da planta nos distintos tratamentos ao longo de 264 horas. Observa-se que em todos os gráficos a distribuição de matéria seca dispõe de forma similar e crescente, a massa seca da folha (MSF) foi a que mais contribuiu para a massa seca total, seguida da massa seca da bainha (MSB) e da massa seca de raiz (MSR).



**Figura 8.** Massa seca total, massa seca da bainha, massa seca de raiz e massa seca foliar de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (\*) e 5% (\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

A produção de massa seca durante o presente estudo aparentemente é mais lenta nos primeiros dias de vida da plântula de arroz, e é possível observar uma tendência no incremento da bainha, indicando que a planta investe em armazenamento de reserva.

Em experimento com duas cultivares de arroz (Comum Branco e IAC-4440) França (1995) observou que aos 25 DAP (dias após plantio) o maior acúmulo de massa foi observado nas folhas e que seguiu diminuindo ao longo do tempo em função do perfilhamento, com consequente incremento de massa seca no colmo. Aos 35 DAP aparentemente ocorreu a inversão do dreno de carbono preferencialmente para os colmos, onde ocorre a maior concentração de massa seca durante o tempo em que o experimento foi conduzido. No presente trabalho também se observou uma maior contribuição das folhas para massa total, porém até os 11 dias de crescimento das plantas de arroz. Este padrão parece se inverter a partir da fase reprodutiva, como foi observado para as cultivares do tipo tradicional (Caiapó), moderno (Maravilha) e intermediário (BRS Primavera), que apresentaram acúmulo de matéria seca no colmo + bainha superior às folhas, a partir da fase reprodutiva até o final do ciclo das cultivares (ALVAREZ et al., 2012). Os resultados sugerem que há translocação de grande parte dos fotoassimilados do colmo, bainha e folhas para a formação da panícula, que no final do ciclo, tem maior participação na matéria seca total foi a maior, dentre as estruturas avaliadas. O que indica comportamento diferenciado em relação à translocação de fotoassimilados de acordo com a fase de crescimento vegetal, apresentando uma tendência, de maior estímulo foliar, bainha ou colmo até a formação da panícula.

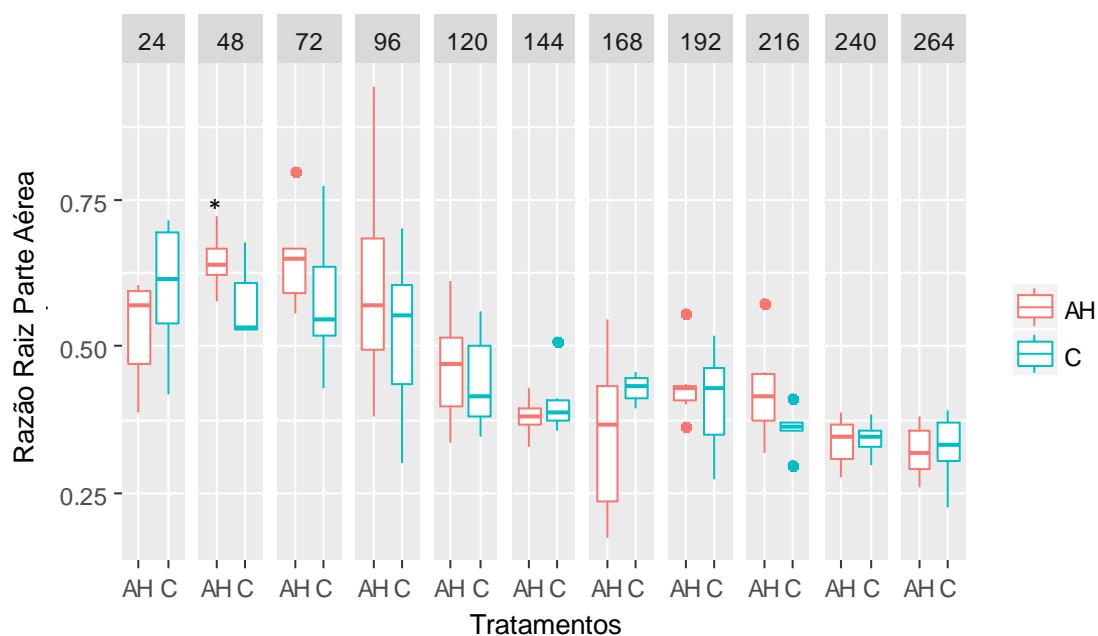
As plântulas que receberam aplicação de AH se destacaram significativamente frente à testemunha, as 144 horas, em todas as massas secas mensuradas (Figura 8).

Em área experimental com quadro inicial de degradação, foi aplicado substância húmica (SH) em *Brachiaria brizantha* cv. , as doses de SH influenciaram na relação folha/colmo, apresentando comportamento linear negativo, onde o aumento da concentração de substâncias húmicas induziu a maior diferenciação dos colmos, reduzindo a relação folha/colmo (FREITAS, 2014).

A massa seca foliar e de bainha de plantas com AH apresentaram tendência superior à testemunha às 264 horas. A massa de raiz diferiu às 216 horas.

#### 4.5.3. Relação raiz:parte aérea (Rrpa)

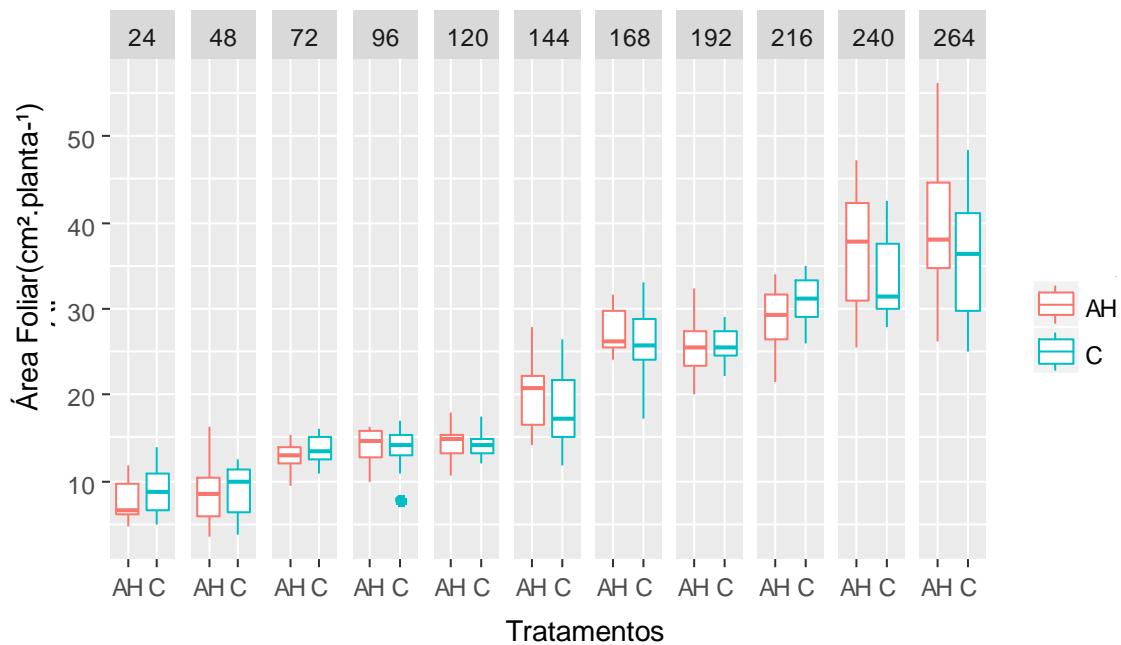
A Figura 9 mostra a relação da raiz pela parte aérea entre os tratamentos com e sem aplicação de AH. É possível observar que no início há maior investimento em raiz para ambos os tratamentos, com diferença significativa as 48 horas para plantas com AH. Após esse período é observado o deslocamento de investimento para parte aérea. França (1995) observou o mesmo comportamento em período de 95 dias após plantio (DAP) para duas cultivares de arroz, IAC e Comum Branco, em períodos nutricionais ótimos. Sendo observado grande investimento em parte aérea destinado aos colmos, para as duas cultivares.



**Figura 9.** Razão raiz parte aérea de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (\*) e 5% (\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

#### 4.5.4. Área foliar

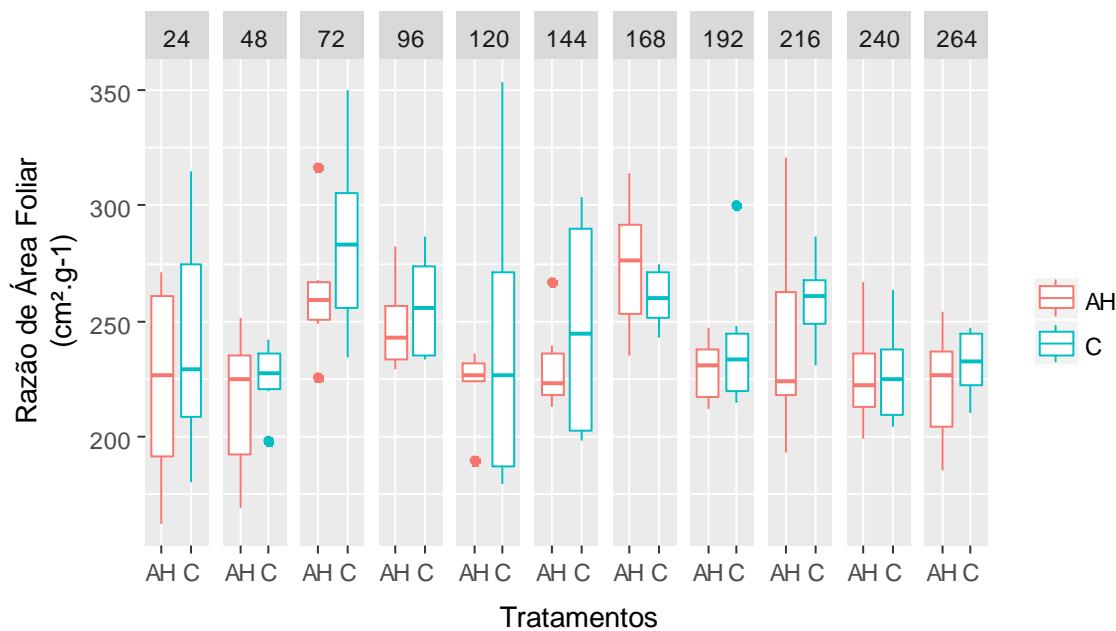
A Figura 10 retrata o comportamento da área foliar ao longo do experimento. Esta variável não diferiu significativamente entre os tratamentos, porém, as 144 horas e as 240 horas, a mediana mostrou a tendência a uma área foliar superior do tratamento com ácido húmico. É possível observar uma tendência crescente com certa constância.



**Figura 10.** Área foliar de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (\*) e 5% (\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

#### 4.5.5. Razão área foliar

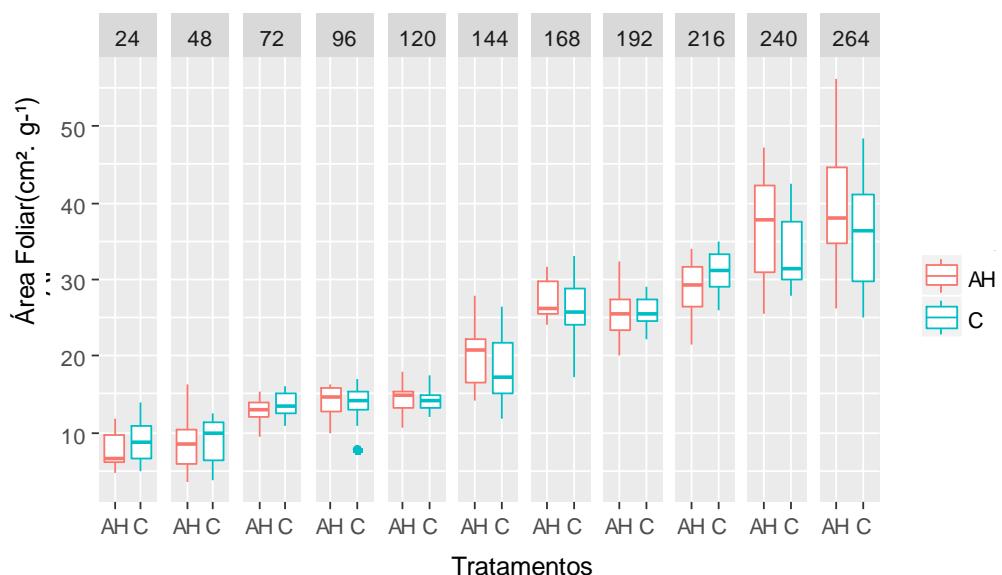
A Figura 11 representa o resultado do desdobramento dos valores da RAF a cada 24 horas após o transplantio, entre os dois tratamentos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos sobre essa variável, que se comportou oscilante durante o período avaliado. Em experimento onde o tempo de avaliação foi de 95 DAP, com a cultivar IAC e Comum Branco, foi observado comportamento decrescente de AF (área foliar) para ambas cultivares, apresentando tendência à estabilização ao final do período experimental (FRANÇA, 1995). Essa tendência decrescente indica que os produtos fotossintéticos não estão sendo alocados nas folhas, possivelmente nos colmos para sustentar a formação das panículas que se inicia neste órgão após essa fase.



**Figura 11.** Razão de Área foliar de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (\*) e 5% (\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

#### 4.5.6. Área foliar específica (AFE)

A variação de AFE durante as coletas (Figura 12) não diferiu significativamente entre tratamentos e ambos os tratamentos tiveram AFE diminuindo ao longo do tempo. Tanto a área foliar, AFE e massa seca total não diferiram significativamente entre os tratamentos, porém o comportamento da TAL diferenciou-se para ambos os tratamentos (Figura 14). Isto pode indicar que a variação não está relacionada apenas com alterações morfológicas no sistema assimilatório mas também metabólicas. Já foi relatado que substâncias húmicas conseguem aumentar o pigmento fotossintético em plantas (JANNIN et al., 2012), aumentando as taxas fotossintéticas.



**Figura 12.** Área foliar específica de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (\*) e 5%(\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

#### 4.5.7. Taxa de crescimento absoluto (TCA) e taxa de crescimento relativo (TCR)

Os coeficientes do modelo logístico ajustados aos dados primários nos dois tratamentos foram altamente significativos ( $p<0,001$ ) e são apresentados na Tabela 1. Os valores de  $R^2$  do modelo variaram de 0,92 a 0,93 para a biomassa total, de 0,90 a 0,92 para a área foliar sendo consistentemente altos, indicando um ajuste adequado aos dados primários.

**Tabela 1.** Coeficiente de determinação ( $R^2$ ), coeficientes estimados ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) e probabilidades (p-valor) dos ajustes de regressão do tipo logístico com 3 parâmetros para Massa Seca Total (MST) e Área Foliar (AF) das plantas de arroz var. Piaui tratadas com e sem ácido húmico.

		Ácido Húmico		Controle	
		Coeficiente	p-valor	Coeficiente	p-valor
MST	$\alpha$	0,73901	1,64E-05 ***	0,36831	3,24E-06 ***
	$\beta$	25,41570	2,2E-16 ***	12,42971	1,16E-10 ***
	$\kappa$	0,00794	2,2E-16 ***	0,00854	2,2E-16 ***
	$R^2$	0,93		0,92	
AF	$\alpha$	69,29880	1,76E-06 ***	57,86514	3,77E-07 ***
	$\beta$	10,33840	3,30E-08 ***	7,97549	4,68E-07 ***
	$\kappa$	0,00992	1,36E-14 ***	0,00995	2,51E-11 ***
	$R^2$	0,90		0,92	

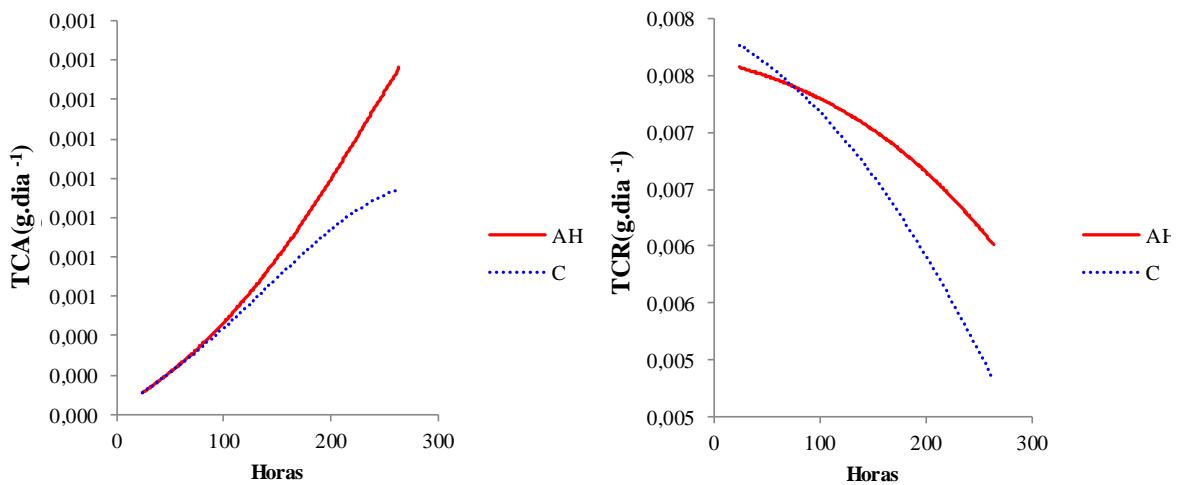
Significância: \*\*\* 0,001, \*\* 0,01, \* 0,05, . 0,1.

A TCA mostra que os ganhos diáários de massa seca total (Figura 13a), são iguais para os dois tratamentos até as 100 horas após aplicação dos tratamentos. Após esse período, as plantas tratadas com AH obtiveram as maiores taxas de crescimento até o final do experimento. A máxima TCA ocorre às 264 horas após aplicação dos tratamentos.

Na Figura 13b estão apresentadas as taxas de crescimento relativo (TCR) de plântulas de arroz da variedade Piauí com e sem aplicação de AH. Observa-se que esta taxa decresce à medida que as plantas crescem. A TCR inicial de plantas com AH apresentaram valores inferiores a sem AH (C). A partir das 100 horas os valores se tornam superiores até o final do experimento. Os distintos tratamentos apresentam diferença significativa em relação a massa total, mas não na RAF. Considerando que a interação significativa entre época de coleta e tratamento, na análise de variância dos dados de biomassa total transformados em logaritmo natural, demonstra diferenças significativas entre aplicação ou não de AH na taxa de crescimento relativo (ARAÚJO, 2003; FRANÇA et al., 2008), pode-se afirmar que o tratamento com ácido húmico (AH) apresentou menores valores da taxa de crescimento relativo até as 100 horas, quando então seus valores tornaram-se superiores ao sem AH (C) até o final do experimento (Figura 13). Isto reflete a menor produção de biomassa total das plantas tratadas com AH no início do experimento, e sua maior biomassa nos estádios posteriores (Figura 8).

a)

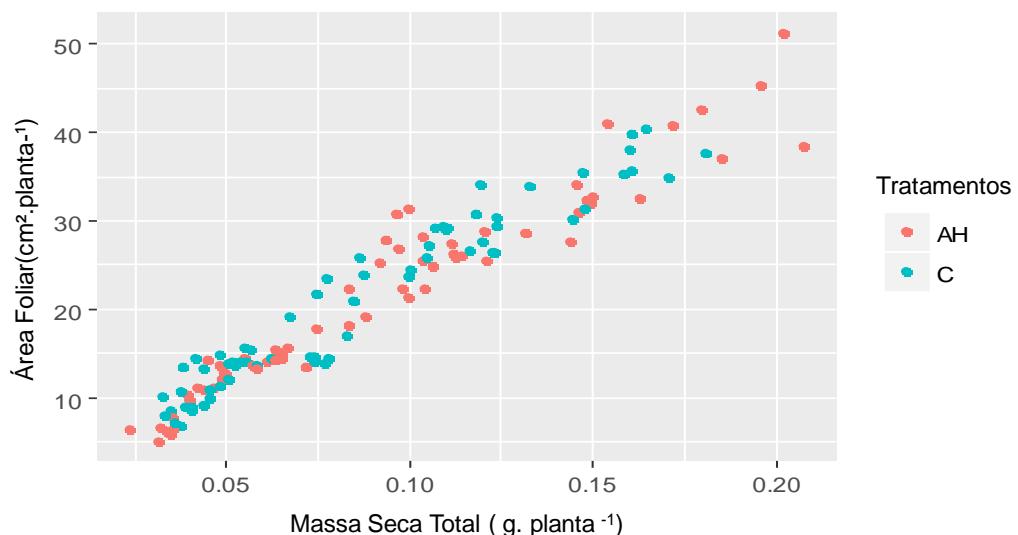
b)



**Figura 13.** Taxa de crescimento absoluto (TCA) e taxa de crescimento relativo (TCR) de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta (a partir de 24 horas após aplicação dos tratamentos).

#### 4.5.8. Taxa de assimilação líquida (TAL)

A aplicação da equação 4 para calcular a TAL, exige uma relação linear entre a área foliar e massa seca total. Portanto, a correlação entre a área foliar cresce forte e positivamente em relação a massa seca total (Figura 13), apresentando um  $r = 0,96$  para AH e  $r = 0,96$  para C, o que com destaque para tratamentos com ácido húmico que se diferenciam frente a plantas sem aplicação de AH.



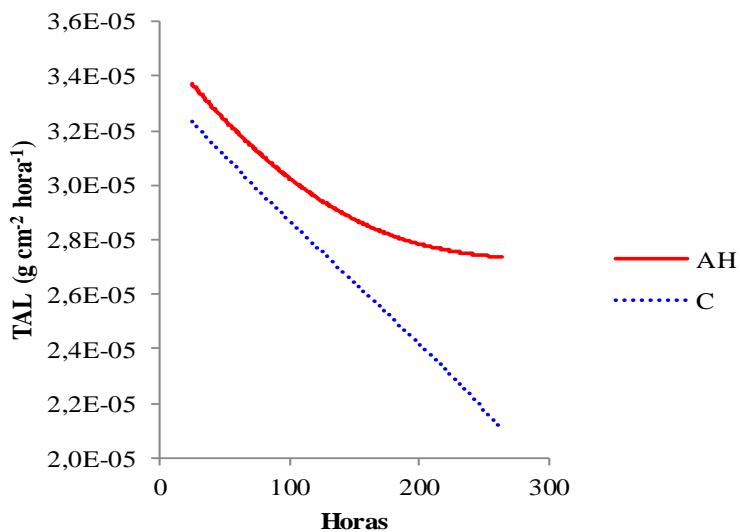
**Figura 14.** Correlação entre a área foliar e a massa seca total de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta (a partir de 24 horas após aplicação dos tratamentos).

A taxa de assimilação líquida (Figura 15) se constitui como uma estimativa da fotossíntese líquida é a medida da eficiência da área do tecido assimilatório no acúmulo de massa seca, descontados os componentes inorgânicos (EVANS, 1972; HUNT, 1978). Uma vez que qualquer incremento de massa na matéria orgânica reflete a diferença entre ganhos da fotossíntese bruta e as perdas por respiração (FITTER & HAY, 1981). Pela análise, constata-se

que os comportamentos dos tratamentos com e sem ácido húmico são diferentes. O tratamento com ácido húmico (AH) apresentou-se superior à de sem AH (C) em todo o período amostrado. Superioridade esta que pode ser considerada estatisticamente significativa, uma vez que a TAL é obtida por derivação da curva de massa seca dividida pela área foliar, sendo estas variáveis significativamente diferentes em alguns períodos entre os tratamentos, como observado por França et al., (2008) entre duas cultivares de arroz.

Na fase de plântula é possível observar o comportamento decrescente de TAL nos tratamentos ao longo do período estudado. As plantas C3 são limitadas pelo CO<sub>2</sub>, a conversão da radiação em energia é mais lenta. À medida que as folhas se expandem (aumento da área foliar) acompanhando o comportamento da matéria seca total (Figura 8), a TAL tende a cair (Figura 15).

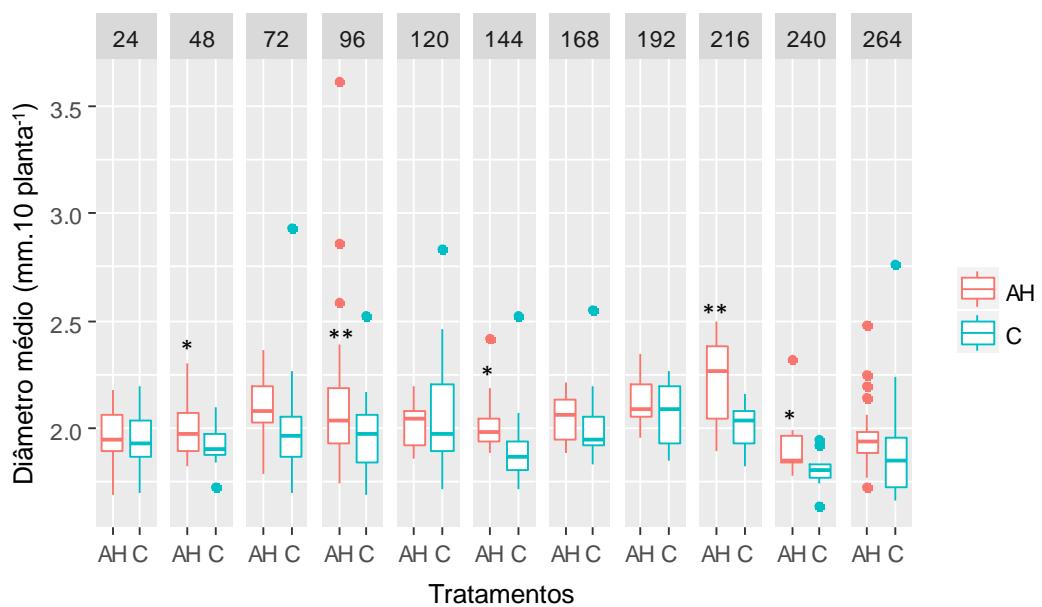
O comportamento da TAL no tratamento com AH descreve uma curva decrescente que, ao final, indica uma possível ascendência. A TAL, em plantas sem AH, se comporta de forma decrescente. É possível observar na Figura 14 que as plantas tratadas com AH possuem TAL superior a plantas sem AH, apesar de não ocorrer diferença significativa de área específica foliar. O incremento da TAL em plantas com AH pode estar associado ao efeito que substâncias húmicas possuem sobre o aumento da massa e especialmente do teor de clorofila, influenciando assim, as taxas fotossintéticas nas plantas (NARDI et al., 2002; ERTANI et al., 2013). A maior biomassa e área foliar igual pode estar associada as diferenças na TAL.



**Figura 15.** Taxa de assimilação líquida de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta (a partir de 24 horas após aplicação dos tratamentos).

#### 4.5.9. Efeito de AH sobre parâmetros radiculares

Observou-se uma tendência a um maior diâmetro médio das raízes no tratamento que recebeu AH nos diferentes tempos (Figura 16), porém esta diferença foi significativa nos tempos 48, 96, 144, 216 e 240 h.

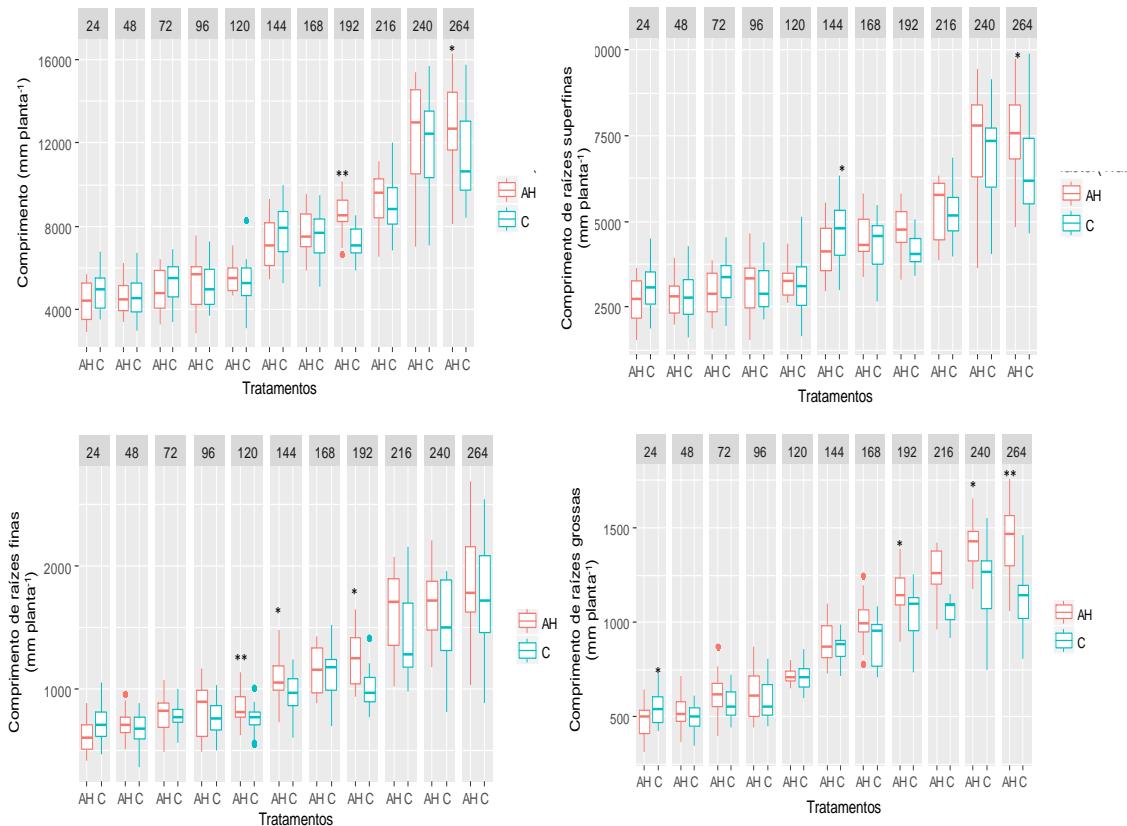


**Figura 16.** Diâmetro médio da raiz de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (\*) e 5% (\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

Os comprimentos de raízes grossas, finas e totais (Figura 16) foram estimulados pela aplicação de AH de forma mais marcante a partir das 192 horas de avaliação. O comprimento

de raízes grossas, superfinais e totais foram significativamente superior nesse tratamento aos 264 dias de avaliação. As raízes finas e superfinais contribuem mais que as grossas para o comprimento total das raízes.

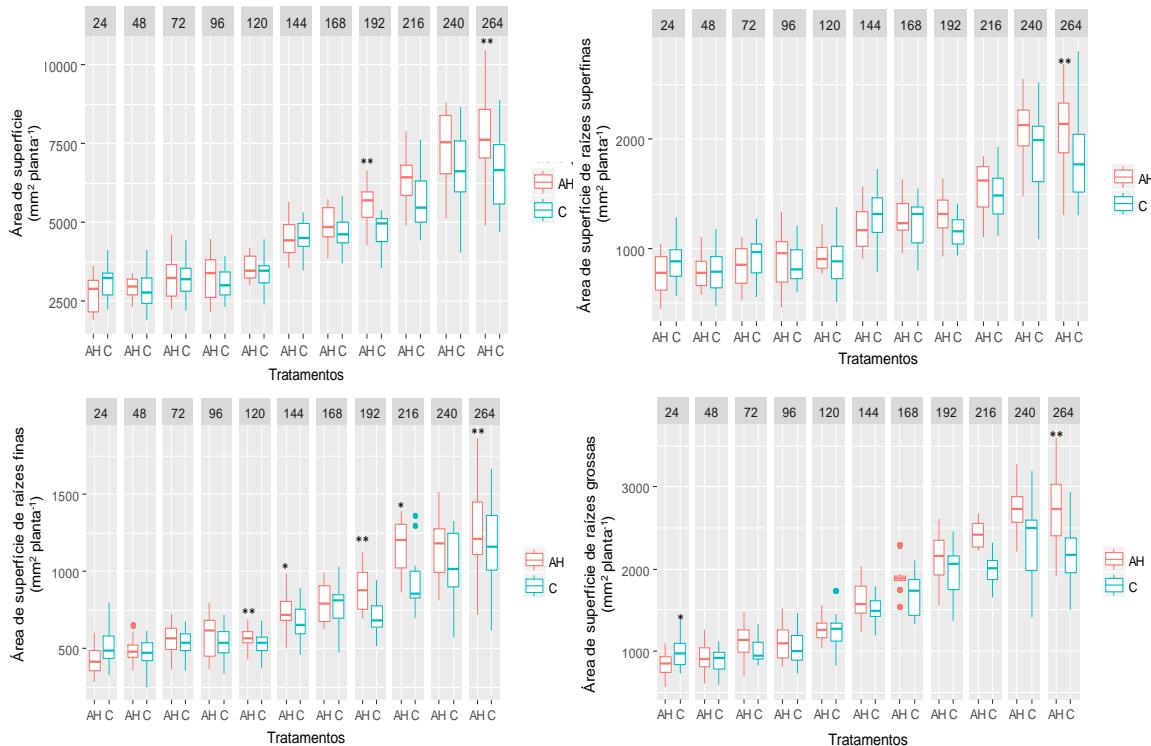
Em estudos com humato de sódio derivado de carvão, foi observado o estímulo do crescimento da raiz primária de plântulas de melão, alface e cebola, mostrando forte indução tanto em água como em solução nutritiva (VAN de VENTER et al., 1991). Além disso, em plântulas de milho tratadas, com AH, foi observado aumento do alongamento das raízes (CANELLAS et al., 2002). Em outro estudo tanto o AH proveniente de lodo de estação de tratamento como AH extraído de vermicomposto, exibiram maior indução do comprimento das raízes nas plântulas de milho e café (FAÇANHA et al., 2002).



**Figura 17.** Comprimento radicular total e comprimentos nas classes de raízes superfinais, finas e grossas de plântulas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(\*) e 5%(\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

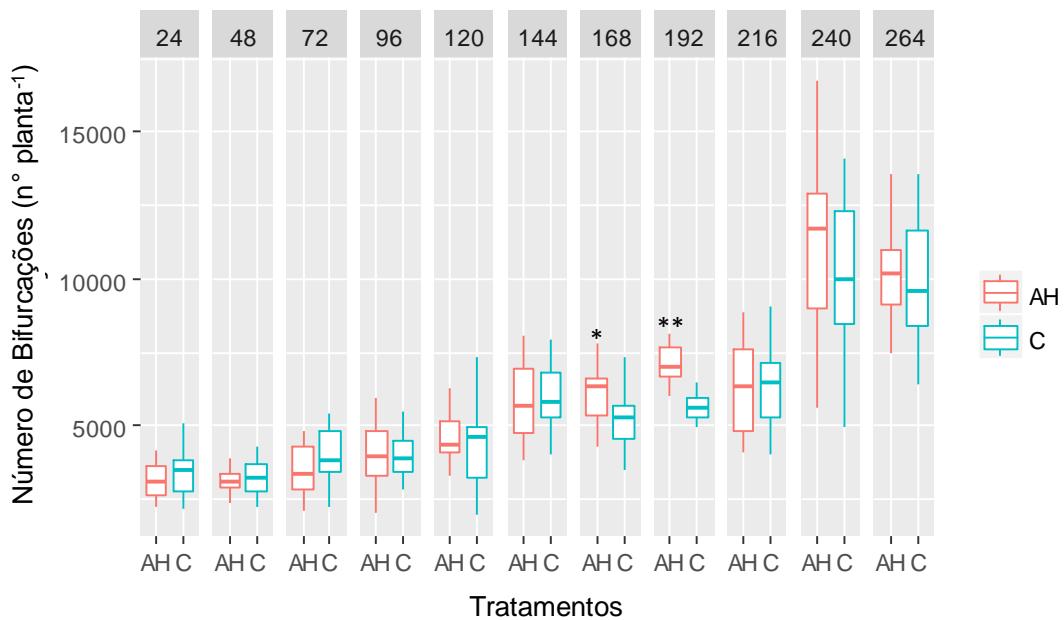
A área de superfície total e a área de superfície de raízes finas (Figura 18) apresentam estímulo inicial às 192 horas. No período de 264 horas todas as classes se comportam de forma similar, com uma superioridade significativa do tratamento de aplicação de AH. Plântulas de milho tratadas com AH de vermicomposto responderam com uma maior área de superfície radicular (CANELLAS et al., 2002), induziram o aumento no tamanho e proliferação da emergência de raízes laterais e na área de superfície da raiz (CANELLAS et al., 2010), melhor desempenho na indução da área radicular de plântulas de milho e café (FAÇANHA et al., 2002) e raízes transformadas de manjericão (LIMA, 2008), evidenciando que os benefícios no incremento da área das raízes podem permanecer por longos períodos de tempo como também

observado por Jannin et al. (2012). Em estudo de Conselvan et al. (2017), foi observado que o comprimento total da raiz e a área de superfície raízes finas de plantulas de milho foram significativamente afetados pelos AH após 48h.



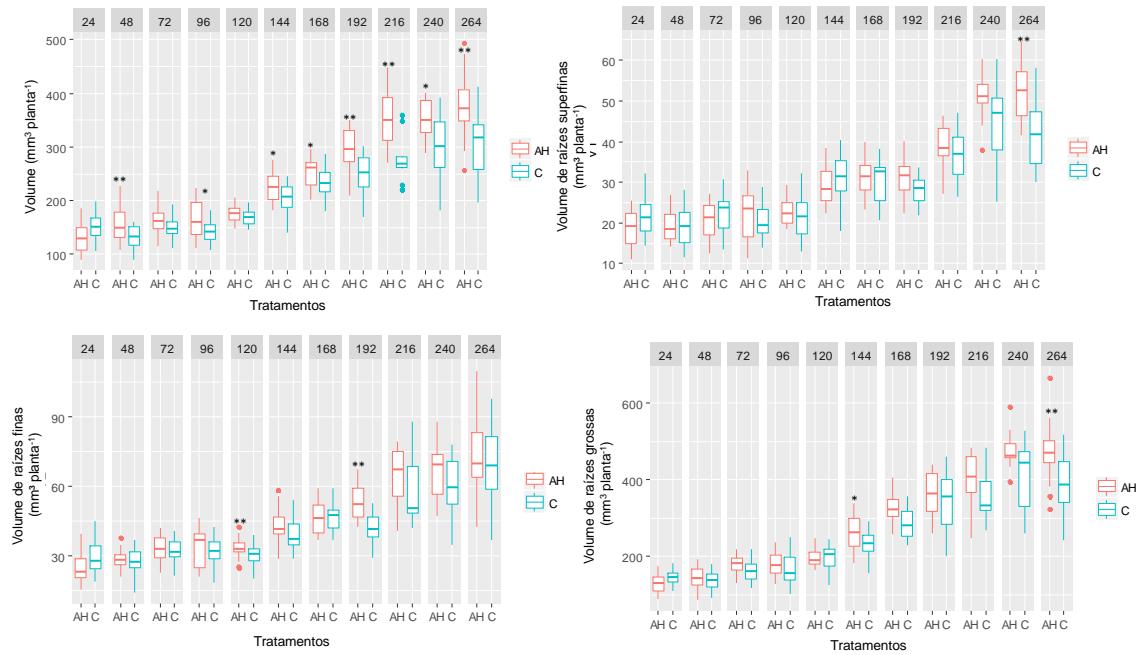
**Figura 18.** Área de superfície radicular total e comprimentos nas classes de raízes superfinais, finas e grossas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (\*) e 5% (\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

Em relação ao número de bifurcações (Figura 19), é observada uma tendência crescente ao passar do tempo, uma sutil queda às 216 horas e no tempo 240 o estímulo mais marcante ao decorrer da avaliação. Contudo, não se observou diferença significativa entre os tratamentos em nenhum dos avaliados. Em estudo de Conselvan et al. (2017), foi observado que o numero de ramificações e número de raízes finas de plantulas de milho foram significativamente afetados pelos AH após 48h.



**Figura 19.** Número de bifurcações das raízes de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, em 11 épocas de coleta. Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (\*) e 5% (\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

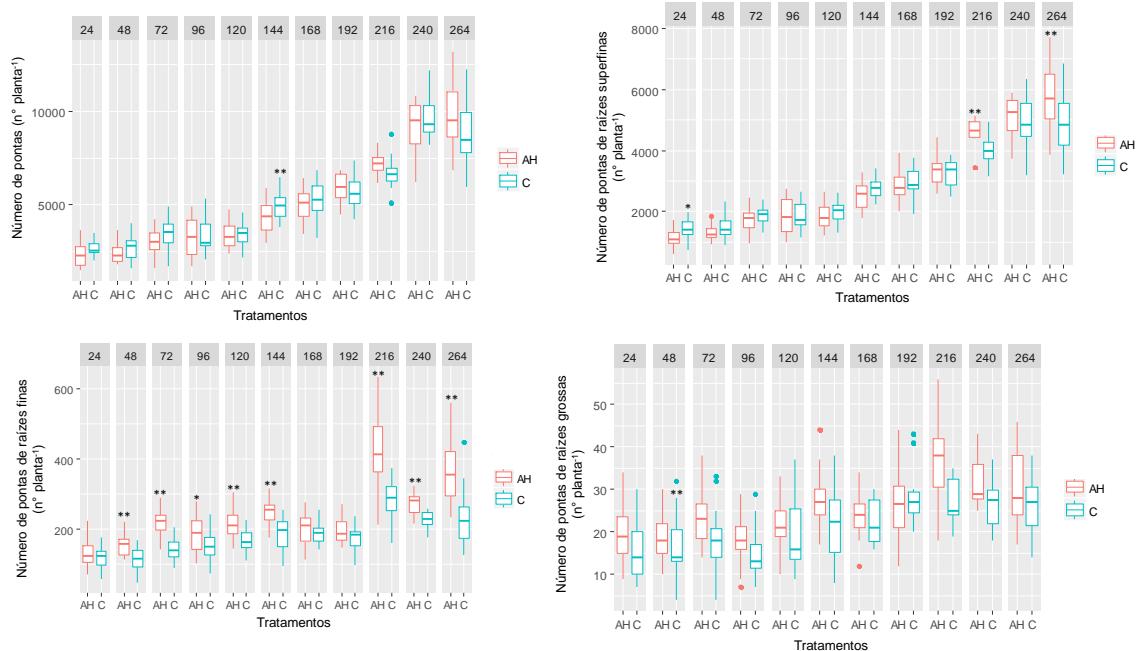
O volume total de raiz (Figura 20) se mantém de forma ascendente a partir das 120 horas e se destaca no tratamento com AH em relação a testemunha em todos os tempos posteriores, sendo significativamente maior até às 264 h. Todas as demais variáveis de volume se mostraram positivamente estimuladas pela aplicação do AH, sendo observadas diferenças significativas às 264 h para todas elas, com exceção do volume de raízes finas. Ainda assim, a Figura 21 indica um maior volume de raízes finas, embora essa diferença não tenha sido detectada como significativa. O volume dentro da classe de raízes grossas determinou o volume total da raiz e, a classe de raízes superfinais apresentou uma contribuição muito pequena. Já a classe fina respondeu aos AH, porém também contribuiu pouco em relação ao volume. Mais recentemente, foi observado em plantas de arroz que o comprimento total, área total de superfície, volume total, número de raízes laterais, apresentaram um grande estímulo do ácido húmico (GARCÍA et al., 2016, TAVARES et al., 2017).



**Figura 20.** Volume radicular total e comprimentos nas classes de raízes superfinas, finas e grossas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, sob diferentes épocas de coleta (a partir de 24 horas após aplicação dos tratamentos). Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10%(\*) e 5%(\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

O número total de pontas de raízes (Figura 21) se comportou de forma muito semelhante ao número de pontas referente a classe de raízes superfinas, respondendo de modo crescente e ressaltando a diferença em relação à planta sem aplicação de AH a partir das 216 horas. Esta classe de raízes teve contribuição sobressalente para o número de pontas totais em relação às demais classes. O número de raízes finas e superfinas foi significativamente superior às 264 h. No caso das raízes finas, a superioridade do tratamento de aplicação de AH pôde ser verificada 48 h após a aplicação. As classes de raízes grossas tiveram um padrão de variação ao longo do tempo muito parecido ao de raízes finas, porém não foram detectadas diferenças significativas, exceto às 48 h após a aplicação do AH.

O crescimento e desenvolvimento de raízes laterais, pode estar diretamente relacionado à capacidade de absorção de água e nutrientes da planta. Ácidos húmicos extraídos de diferentes fontes e extratores, aumentam o crescimento das raízes e a proliferação de raízes laterais em plântulas de milho (PINTON et al. 1999; CANELLAS et al., 2002; ZANDONADI et al., 2007), arabadopsis (DOBBSS et al., 2007) e arroz (GARCIA et al., 2016a, TAVARES et al., 2017). O número total de pontas da raiz aumentou 1,3 vezes mais nas plântulas de milho tratadas com AH proveniente de leonardita em relação as plantas controle (CONSELVAN et al., 2017).

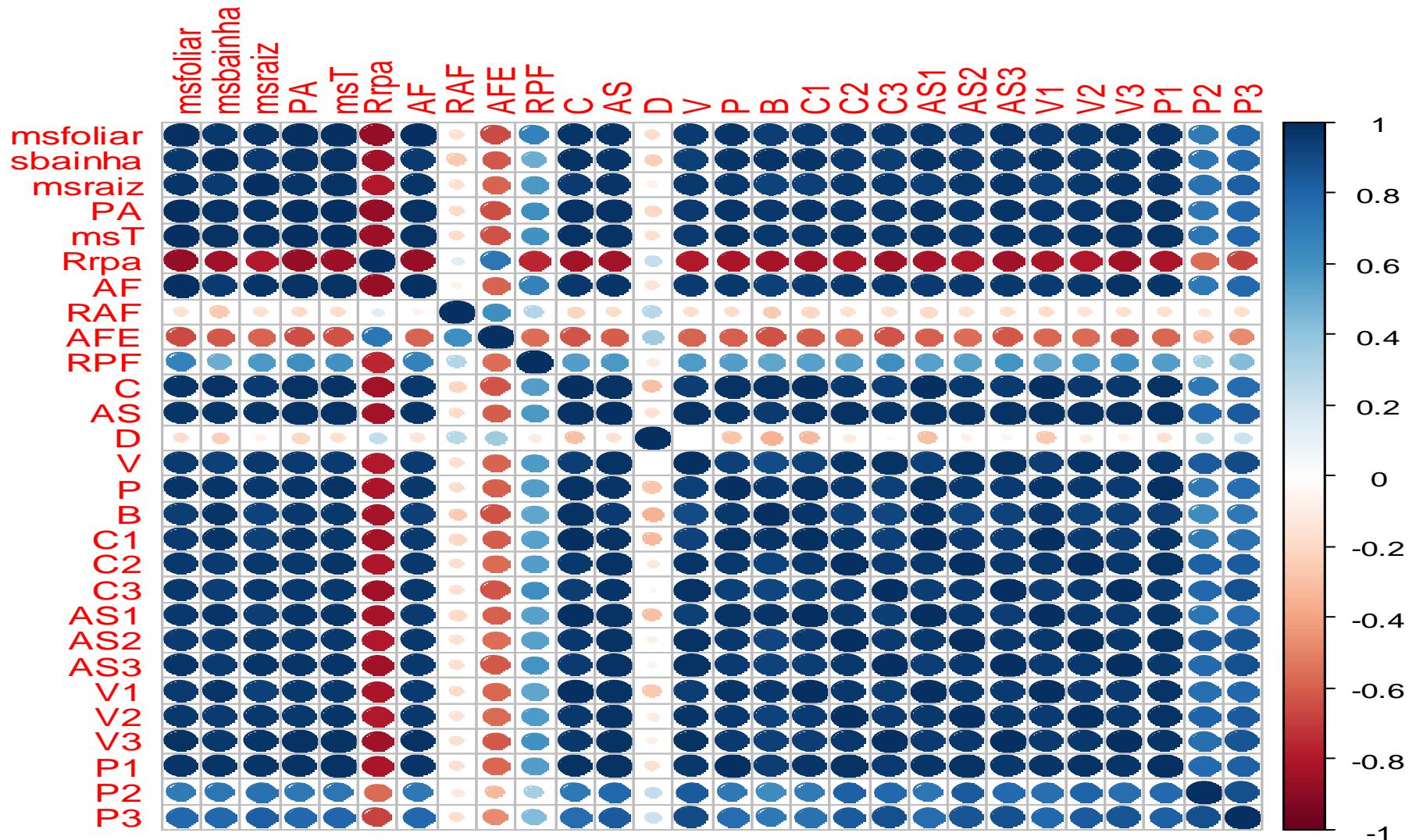


**Figura 21.** Número total de pontas e classes de raízes superfinais, finas e grossas de arroz da variedade Piauí tratadas com ácido húmico (AH) e sem ácido húmico (C) em solução nutritiva, sob diferentes épocas de coleta (a partir de 24 horas após aplicação dos tratamentos). Diferença significativa entre tratamentos pelo teste F a 10% (\*) e 5% (\*\*) de probabilidade. Pontos verdes e vermelhos acima ou a baixo dos boxplot representam outliers.

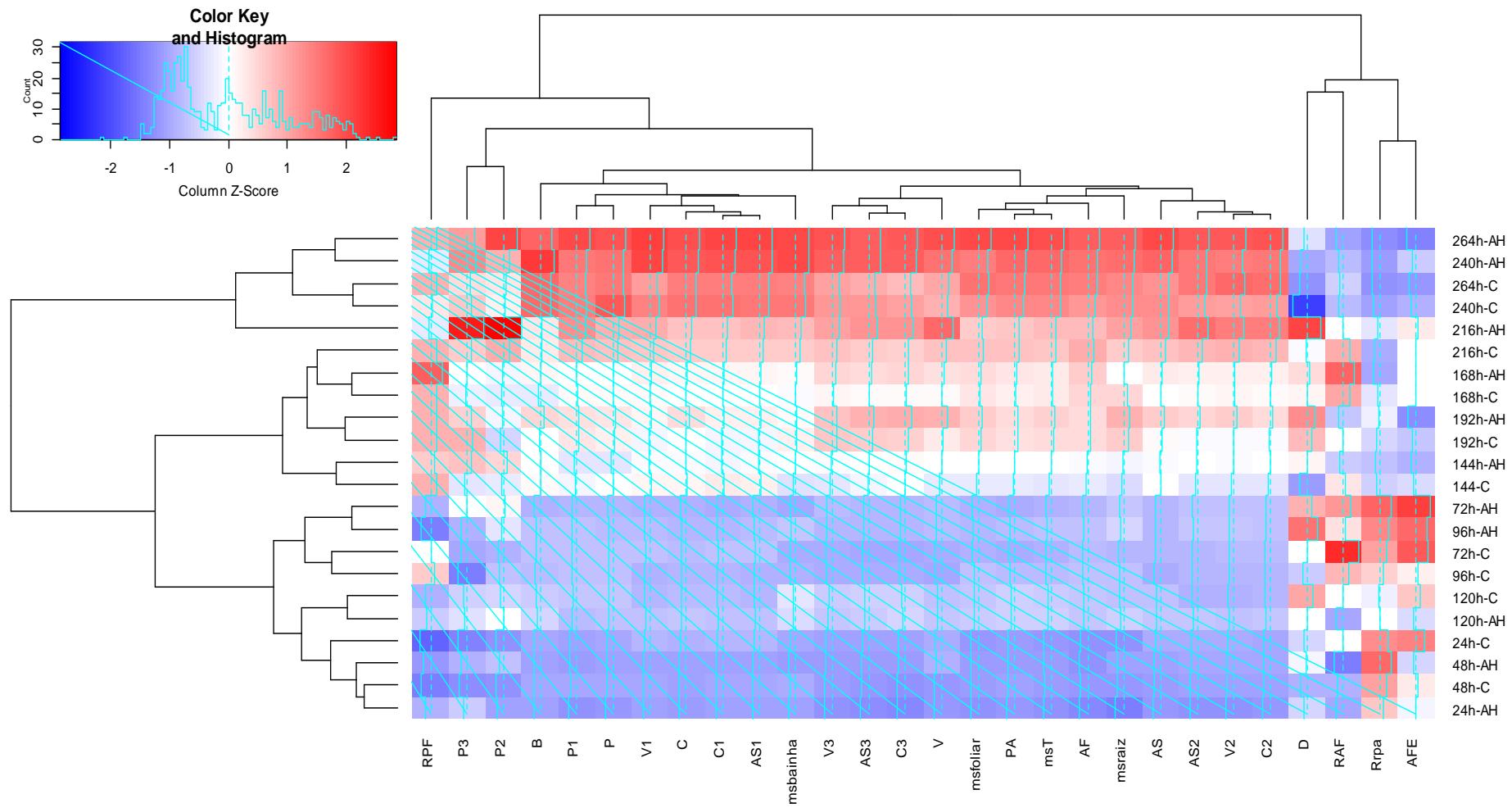
Vários estudos têm mostrado que a capacidade das SH para afetar o crescimento e a fisiologia das plantas é influenciada pelas suas características estruturais (ROSE et al., 2014; GARCÍA et al., 2016b; OLAETXEA et al., 2017).

Com a relação de Pearson (Figura 22) é possível observar que em quase todos os parâmetros há relação alta e positiva entre integrantes de parâmetros foliares, da parte aérea e de raiz. A razão raiz parte aérea (Rrpa) apresenta relação intensa e negativa com quase todos os demais parâmetros, com exceção da AFE (área foliar específica). Em relação aos parâmetros morfológicos de raiz, todos apresentam relação positiva, porém vale ressaltar que o número de pontas (simbolizado por “P”) apresenta três classes como já mencionado no tópico material e métodos. Sendo estas simbolizadas por P1, P2 e P3, em que P1 corresponde ao número de pontas dentro das classes de raízes superfinais ( $0,5 < d < 1,5$  milímetros), P2 das classes de raízes finas ( $1,5 < d < 3,5$  milímetros) e P3 das classes de raízes grossas ( $d > 3,5$  milímetros).

Tanto com a correlação de Pearson (Figura 22) e com o gráfico de agrupamento heatmap (Figura 23) é notado o comportamento diferenciado de P1 as P2 e P3. A P1 apresenta correlação mais positiva com os demais parâmetros que P2 e P3. E apresenta comportamento de agrupamento distinto novamente a P2 e P3, com maior associação nos tempos finais de coleta juntamente com quase todos os demais parâmetros morfológicos radiculares. Indicando que dentro dessa classe há um comportamento mais sinérgico aos demais parâmetros avaliados, inclusive com a massa seca da parte aérea. De modo geral, o heat map mostra que para muitos parâmetros tratados neste estudo a diferenciação dos tratamentos se deu no final da coleta, com a separação de dois grupos maiores, um em azul e outro em vermelho. Mostrando maior intensidade de associação mais intensamente a partir das 216 horas. A Rrpa é mais intensa no início da coleta do que nos tempos posteriores.



**Figura 22.** Matriz de correlação de Pearson para dados de folhas, bainha e raiz de plântulas de arroz tratadas ou não com AH.



**Figura 23.** Heatmap com análise de agrupamento. A coluna corresponde à época de coleta com e sem aplicação de ácido húmico e a linha, aos parâmetros avaliados para folha, bainha e raiz. A intensidade da cor vermelha é proporcional à associação positiva, já a intensidade da coloração azul a associação negativa e a cor branca, quando não há associação.

## **4.6 CONCLUSÕES**

A aplicação de ácido húmico estimulou o crescimento e o metabolismo das plantas de arroz, conforme demonstrado pelos aumentos nas taxas de crescimento absoluto e de crescimento relativo, no acúmulo de biomassa total e da parte aérea, na taxa de assimilação líquida e no desenvolvimento radicular (comprimento, área e volume de raízes). Esses resultados foram avaliados ao longo do período experimental.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

As bactérias promotoras de crescimento vegetal promovem estímulos sobre os parâmetros morfológicos do sistema radicular e incrementa a fitomassa das plantas de arroz. As propriedades bioativas de ácido húmico de vermicomposto estimulam a formação do sistema radicular mais encorpado o que pode estar associado a melhora na captação de água e nutrientes pelas plantas e assim, ao crescimento mais rápido das plântulas de arroz observado através da análise de crescimento. Tanto com a inoculação das bactérias como com ácido húmico é observado o estímulo de raízes superfinais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, N. 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. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. **Plant and Soil**, v.362, n.1/2, p.161-174, 2013.
- ALBUZIO, A. ; FERRARI, G.; NARDI, S. Effects of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings. **Canadian Journal of Soil Science**, v.66, p.731–736, 1986.
- ALMEIDA, D. L. **Contribuição da adubação orgânica para a fertilidade do solo**. 1991. 192f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1991.
- ANDREUX, F. Humus in world soils. In: PICCOLO, A. (Ed). **Humic Substances in Terrestrial Ecosystems**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 45–100.
- ARAÚJO, A. P. Analysis of variance of primary data on plant growth analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n.1, p. 1-10, 2003.
- ARAÚJO, A. P; ROSSILO, R. O. P. Aplicação da análise quantitativa do crescimento vegetal para avaliar a absorção e a utilização de nutrientes. In: ARAÚJO, A. P; ALVES, B. J. R. (Org.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2013. p. 293-323.
- ARSENault, J. L.; POULCUR, S.; MESSIER, C.; GUAY, R. WinRHIZO™, a root-measuring system with a unique overlap correction method. **HortScience**, v. 30, n. 4, p. 906-906, 1995.
- BADRI, D. V.; WEIR, T. L.; VAN DER LELIE, D.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 642 – 650, 2009.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233–266, 2006.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 924-929, 1983.
- BALDANI, J. I; BALDANI, V. L. D.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S; BODDEY, L.H. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**. v. 384, n. 1–2, p. 413–431, 2014.
- BERBARA, R. L.; GARCÍA, A. C. Humic substances and plant defense metabolism. In: AHMAD, PARVAIZ, WANI, MOHD RAFIQ. (Ed). **Physiological mechanisms and**

**adaptation strategies in plants under changing environment.** New York: Springer, 2014. p. 297-319.

BERG, G., & SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology.** v. 68, n.1, p. 1-13, 2009.

BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum spp.* on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, v. 95, p. 109-121, 1986.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L., PACHECO, F., ALJANABI, S. M. M., MONTEIRO, R. A., CRUZ, L. M., BAURA, V. A., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M., & WASSEM, R. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v. 356, n.1/2, 2012.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O; JONES, D. L.; NEBBIOSO, A.; MAZZEI, P. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia horticulture**, v. 30, n. 196, p. 15-27, 2015.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L; FAÇANHA, A. R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1951-1957, 2002.

CANELLAS, L. P.; PICCOLO, A.; DOBBSS, L. B.; SPACCINI, R.; OLIVARES, F. L.; ZANDONADI, D. B.; FAÇANHA, A. R. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. **Chemosphere**, v. 78, n. 4, p. 457-466, 2010.

CANELLAS, L. P; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, p. 1-11, 2014.

CANELLAS, L.P; MARTÍNEZ-BALMORI; D.; MÉDICI, L.O; AGUIAR, N.O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R.C.; FAÇANHA, A.; OLIVARES, F.L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil** v.366, p. 119-132, 2013.

CHAMAM, A., SANGUIN, H., BELLVERT, F., MEIFFREN, G., COMTE, G., WISNIEWSKI-DYÉ, F., BERTRAND, C., & PRIGENT-COMBARET, C. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum*-*Oryza sativa* association. **Phytochemistry**, v.87, p.65-77, 2013.

CONSELVAN, G. B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; DI FOGGIA, M.; NARDI, S.; CARLETTI, P. Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites. **Plant and Soil**, p. 1-16, 2017.

COUILLERO, T O.; PRIGENT-COMBARET, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; MËNNE-LOCCOZ, Y. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as

biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 505–512, 2009.

COZZOLINO, A.; CONTE, P.; PICCOLO, A. Conformational changes of humic substances induced by some hydroxy-, keto-, and sulfonic acids. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 563–571, 2001.

DEN HERDER, G.; VAN ISTERDAEL, G.; BEECKMAN, T.; DE SMET, I. The roots of a new green revolution. **Trends in plant science**, v. 15, n. 11, p. 600-607, 2010.

DICK, D. P., NOVOTNY, E. H., DIECKOW, J., & BAYER, C. (2009). Química da matéria orgânica do solo. Química e mineralogia do solo. Viçosa, MG: SBCS, 1-68, 2009.

DICK, D. P.; MARTINAZO, R.; JACQUES, A V A ; MANGRICH, ANTÔNIO SÁLVIO; PEREIRA, BETANIA; DALMOLIN, R. S. D. Pasture burning in subtropical oxisol: does it affect the chemical composition of the soil organic matter?. In: International Symposium Organic matter dynamics in Agro-ecosystems, 2007, Poitiers. Proceedings. Poitiers: INRA, 2007. v. 1. p. 512-513.

DOBBSS, L. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, M.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; FACANHA, A. R. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3681-3688, 2010.

DOBBSS, L. B.; MEDICI, L. O.; PERES, L. E. P.; PINO-NUNES, L. E.; RUMJANEK, V. M.; FAÇANHA, A. R.; CANELLAS, L. P. Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols. **Annals of Applied Biology**, v. 151, n. 2, p. 199-211, 2007.

DOBBELAERE, S., CROONENBORGH, A. THYS, A, BROEK, A.V., & VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant Soil**, v. 212, n.2, 1999.

DROGUE, B.; COMBES-MEYNET, E.; MËNNÉ-LOCCOZ, Y.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Control of the cooperation between plant growth-promoting rhizobacteria and crops by rhizosphere signal. In: BRUIJN F. J. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere**. NJ, USA: John Wiley & Sons, 2013. p. 281–294 10.

du JARDIN, P., 2012. The Science of Biostimulants. A Bibliographic Analysis. (Final report for EU). 2012. Contract 30-CEO455515/00-96. p. 37.

ELENA, A. ; DIANE, L.; EVA, B. ; MARTA, F. ; ROBERTO, B. ; ZAMARREÑO, A. M.; GARCÍA-MINA, J. M. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 47, n.3, p. 215-223, 2009.

EGAMBERDIEVA, D.; WIRTH, S.; JABBOROVA, D.; RÄSÄNEN, L. A.; LIAO, H. Coordination between *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* alleviates salt stress in soybean through altering root system architecture. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n.1, p. 100-107, 2017.

ERTANI, A.; PIZZEGHELLO, D., BAGLIERI, A., CADILI, V., TAMBONE, F., GENNARI, M., & NARDI, S. (2013). Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L.) plantlets. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 103-111, 2013.

EVANS, C. G. **The quantitative analysis of plant growth**. Oxford: Hardcover, 1972. 734p.

FAÇANHA, A. R.; FAÇANHA, A. O. L.; OLIVARES, F. L.; GURIDI, F.; DE ARAÚJO SANTOS, G.; VELLOSO, A. C. X., DE OLIVEIRA, M. A. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1301-1310, 2002.

FAN, M. S.; ZHU, J. M.; RICHARDS, C.; BROWN, K. M.; LYNCH, J. P. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. **Funct. Plant Biology**, v. 30, p. 493-506, 2003.

FERREIRA, A.L. Pesquisa viabiliza produção de biofertilizantes para cana e milho. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/12265163/pesquisa-viabiliza-producao-de-biofertilizantes-para-cana-e-milho>. Acessado em 16 de julho de 2018.

FERREIRA, A.L; BELLO, L. Inoculante para fixação de nitrogênio para cana é lançado pela Basf e Embrapa. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/39688081/inoculante-para-fixacao-de-nitrogenio-para-cana-e-lancado-pela-bASF-e-embrapa>. Acessado em 26 de dezembro de 2018.

FITTER, A. H.; HAY, R. K. M. **Environmental physiology of plants**. New York: Academic Press, 1981.

FRANÇA, M. G. C. **Análise do crescimento e do acúmulo de nitrogênio em duas cultivares de arroz contrastantes em habito de crescimento**. 1995. 163f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1995.

FRANÇA, M. G. C., ARAÚJO, A. P., ROSSILO, R. O. P., & RAMOS, F. T. (2008). Relações entre crescimento vegetativo e acúmulo de nitrogênio em duas cultivares de arroz com arquiteturas contrastantes. **Acta Botanica Brasilica**, n. 22, p. 43-49, 2008.

FRANÇA, M. G. C.; ROSSILO, R. O. P.; ZONTA, E.; ARAÚJO, A. P.; RAMOS, F. T. Desenvolvimento radicular e influxo de nitrogênio em duas cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1845-1853, 1999.

GARCÍA, A. C.; DE SOUZA, L. G. A.; PEREIRA, M. G.; CASTRO, R. N.; GARCÍA-MINA, J. M.; ZONTA, E.; LISBOA, F. G. F.; BERBARA, R. L. L. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. **Scientific Reports**, v.6, p. 1-10, 2016.

GARCÍA, A. C.; TAVARES, O. C. H.; BALMORI, D. M.; DOS SANTOS ALMEIDA, V.; CANELLAS, L. P.; GARCÍA-MINA, J. M.; BERBARA, R. L. L. Structure-function relationship of vermicompost humic fractions for use in agriculture. **Journal of Soils and Sediments**, v. 1, p. 1-11, 2016.

GARCIA, N. F. S.; ARF, O.; PORTUGAL, J. R.; PERES, A. R.; RODRIGUES, M.; PENTEADO, M. de S. Doses and application methods of *Azospirillum brasilense* in irrigated upland rice. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 11, p. 990-995, 2016.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPIENSTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P; TEIXEIRA, K.R.S.; DOBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov, a nitrogen-fixing acetic-acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 361–364, 1989.

GLICK, B.R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p.1-15, 2012.

GRANT, S. G.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 4645-4649, 1990.

GUERRA, J.C.M.; SANTOS, G. D. E A.; SILVA, L.S. D.A; CAMARGO, F.A.O. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: Santos, G. de A. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2. ed. Porto Alegre, 2008. p. 19-26.

HALPERN, M.; BAR-TAL, A.; OFEK, M.; MINZ, D.; MULLER, T.; YERMIYAHU,U. The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. In: Sparks DL, editor. **Adv Agron**; 2015. p. 141–74.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja. EMBRAPA SOJA. Circular técnica. n. 35. 2001.

HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M.A., ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biol. Fertil. Soils** 49, 791–801, 2013.

HUNT, R. **Plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1978. 76p.

HUNT, R. Plant growth curves. **The functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1982. 247p.

INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY (IHSS). Isolation of IHSS Soil Fulvic and Humic Acids, 2016. URL <http://www.humicsubstances.org> (acessado em junho de 2017).

ISAWA, T.; YASUDA, M.; AWAZAKI, H.; MINAMISAWA, K.; SHINOZAKI, S.; NAKASHITA, H. *Azospirillum* sp. strain B510 enhances rice growth and yield. **Microbes and Environments**, v. 25, n. 1, p. 58-61, 2010.

JANNIN, L.; ARKOUN, M.; OURRY, A.; LAÎNÉ, P.; GOUX, D.; GARNICA, M.; HOUDUSSE, F. Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: involvement of N, C and S metabolisms. **Plant and soil**, v. 359, n. 1-2, p. 297-319, 2012.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes Orgânicos**. Piracicaba, Ed. Agronômica, “CERES”, cap.3, 1985, 349-350p.

KONONOVA, M. M. **Matéria orgânica del suelo**: su natureza, propriedades y métodos de investigación. Barcelona: Oikos-Tau, 365p. 1982.

LEVEAU, J. H. J.; LINDOW, S. E. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, p. 2365–2371, 2005.

LIMA, W. L. Metabolismo do nitrogênio e atividade de bomba de prótons em raízes transgênicas com ácidos húmico e simbiose micorrízica arbuscular. 2008. 156f. Tese. (Doutorado em Agronomia, Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2008.

LOPES, N. F.; LIMA, M. G. S. **Fisiologia da Produção**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2015.

LÓPEZ-BUCIO, J.; HERNÁNDEZ-ABREU, E.; SÁNCHEZ-CALDERÓN, L.; NIETO-JACOBO, M. F.; SIMPSON, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. **Plant physiology**, v. 129, n. 1, p. 244-256, 2002.

LYNCH, J. M. **The rhizosphere**. Wiley-Interscience; Chichester: 1990. 458 p.

LYNCH, J. P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. **Plant Physiology**, v. 156, p. 1041–1049, 2011.

LYNCH, J. P. Roots of the second green revolution. **Australian Journal of Botany**, v. 55, p. 493–512, 2007.

MARQUES JÚNIOR, R. B.; CANELLAS, L. P.; SILVA, L. G.; OLIVARES, F. L. 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, p. 1121-1128, 2008.

MATUSZAK-SLAMANI, R., BEJGER, R., CIEŚLA, J. et al. Influence of humic acid molecular fractions on growth and development of soybean seedlings under salt stress. **Plant Growth Regul** , v. 83, p 465, 2017.

MENDIBURU, F. **Agricolae**: statistical procedures for agricultural research. R package version 1.2-0. 2014.

MONTERUMICI, C. M; ROSSO, D.; MONTONERI, E.; GINEPRO, M.; BAGLIERI, A.; NOVOTNY, E. H.; NEGRE, M. Processed vs. non-processed biowastes for agriculture: effects of post-harvest tomato plants and biochar on radish growth, chlorophyll content and protein production. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p. 8826-8843, 2015.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; ATTINÀ, E.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. **Soil Science Society of America**, v. 1, p. 75–85, 2007.

NARDI, S.; CARLETTI P.; PIZZEGHELLO D.; MUSCOLO A. Biological activities of humic substances. In: SENESI, N.; XING, B.; HUANG, P. M.; Hoboken, N. J. (Ed). **Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems**. USA: John Wiley and Sons, 2009. p. 305–340.

NARDI, S.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; BAIANO, S.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 3138-3146, 2007.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; RENIERO, F.; RASCIO, N. Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth. **Soil Science Society of America**, v. 64, p. 639-645, 2000.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; SCHIAVON, M.; ERTANI, A. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 1, p. 18-23, 2016.

NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M. **Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, and experimental designs**, USA: McGraw-Hili t:a Irwin, 1974.

OLAETXEA, M. ; DE HITA, D.; GARCIA, C. A.; FUENTES, M.; BAIGORRI, R.; MORA, V.; GARNICA, M.; URRUTIA, O.; ZAMARREÑO, A. M.; BERBARA, R. L.; GARCIA-MINA, j Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root-and shoot-growth. **Applied Soil Ecology**, p. 1-17, 2017.

ORLOV, R. **Humic acids of soils**. Washington, D.C.: USDA: The National Science Foundation, 1985. OSMONT, K. S., SIBOUT, R., & HARDTKE, C. S. Hidden branches: developments in root system architecture. **Annual Review Plant Biology**, 58, 93-113, 2007.

ÖTVÖS, K., & BENKOVÁ, E. Spatio temporal mechanisms of root branching. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.45, p.82-89,2017.

PAEZ-GARCIA, A.; MOTES, C. M.; SCHEIBLE, W. R.; CHEN, R.; BLANCAFLOR, E. B.; MONTEROS, M. J. Root Traits and Phenotyping Strategies for Plant Improvement. **Plants**, v. 4, n. 2, p. 334-355, 2015.

PEIXOTO, C. P.; PEIXOTO, M. F. S. P. Dinâmica do crescimento vegetal: princípios básicos. In: CARVALHO, C. A. L de; DANTAS, A. C. V. L.; PEREIRA, F. A. de C.; SOARES, A. C. F.; MELO FILHO, J. F. de. (Org.). **Tópicos em Ciências Agrárias**. Cruz das Almas, BA: Editora Nova Civilização, 2009. p. 37-53. v. 1.

PEREIRA, A.R.; ANGELOCCI, L.R.; SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia: fundamentos e aplicações práticas. Ed. Guaíba: Agropecuária, 2002. 478p.

PEREIRA, D. C.; GRUTZMACHER, P.; BERNARDI, F. H.; MALLMANN, L. S.; COSTA, L. A. M.; COSTA, M. S. S. Produção de mudas de almeirão e cultivo no campo, em sistema agroecológico. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, v.16, n.10, p.1100–1106, 2012.

PEREIRA, M. S. **Mineralização do resíduo da pupunheira em condições de campo e laboratório.** 2013. 93 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil science*, v. 166, n. 1, p. 810-832, 2001.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, v.75, p.57-134, 2002.

PICCOLO, A.; CELANO , G.; AND PIETRAMELLARA , G . Effects of fractions of coal - derived humic substances on seed - germination and growth of seedlings (*Lactuga sativa* and *Lycopersicon esculentum*). *Biology and Fertility of Soils* , v. 16, n.1, p. 11 – 15, 1993 .

PINTON, R.; CESCO, S.; SANTI, S.; AGNOLON, F.; VARANINI, Z. Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. *Plant and Soil*, v. 210, n. 2, p. 145-157, 1999.

PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. **Role of humic substances in the rhizosphere.** NJ, USA: John Wiley and Sons, 2009.

PIRES, A. M. M.; MATTIAZZO, M. E. Avaliação da Viabilidade do Uso de Resíduos na Agricultura. Jaguariúna: EMBRAPA. Circular Técnica. n. 19. 2008.

PODILE, A.R., & KISHORE, G.K. (2007). Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam S.S. (eds) Plant-Associated Bacteria. (p.195-230). Springer, Dordrecht.

POTHIER, J. F.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; WEISS-GAYET, M.; MËNNE-LOCCOZ, Y.; PRIGENT-COMBARET, C. Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasiliense* Sp245. *Microbiology*, v. 153, p. 3608–3622, 2007.

PRIMO, D. C.; MENEZES, R. C.; SILVA, T. O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. *Scientia Plena*, v. 7, n. 5, 2011.

REGENT INSTRUMENTS. WinRHIZO arabidopsis 2012b manual. Régent Instruments Inc., Québec, Canada. 142p., 2012.

RICHARDSON, A. E.; BARÉA, J. M.; MCNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* , v. 321, p. 305–339, 2009.

RITZ, C.; STREBIG, J. Package ‘drc’: Analysis of dose-response curves. *Version* , v. 2, p. 5-12, 2015.

RÖDER, C.; MÓGOR, Á. F.; SZILAGYI- ZECCHIN, V. J.; FABBRIN, E. G. S.; GEMIN, L. G. Uso de biofertilizante na produção de mudas de repolho. **Revista Ceres**, v. 62, n. 5, p. 502–505, 2015.

RODRIGUES, D.S.; NOMURA, E.S; GARCIA, V.A. Coberturas de solo afetando a produção de alface em sistema orgânico. **Revista Ceres**, v. 56, n. 3, p. 332-335, 2009.

RODRIGUES, E. P.; SOARES, C. DE P.; GALVÃO, P. G.; IMADA E. L.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; ROUWS, L F. M.; OLIVEIRA, A. L. M. DE; VIDAL M. S.; BALDANI, J. I. Identification of Genes Involved in Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Strain Using Transposon Mutagenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-12, 2016.

RODRIGUES, E. T.; LEAL, P.A.M.; COSTA, E.; PAULA, T. S.; GOMES, V. A. Produção de mudas de tomateiro em diferentes substratos e recipientes em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**. v. 28, p. 483-488. 2010.

ROSE, M. T, PATTI A. F, LITTLE, K.R, BROWN, A.L, JACKSON W.R, CAVAGNARO, T.R. A Meta-Analysis and Review of Plant-Growth Response to Humic Substances: Practical Implications for Agriculture. **Advances in Agronomy**. v. 124, p. 37-89, 2014.

ROUPHAEL, Y.; FRANKEN, P.; SCHNEIDER, C.; SCHWARZ, D.; GIOVANNETTI, M.; AGNOLUCCI, M.; PASCALE, S. D.; BONINI, P.; COLLA, G. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 30, n. 196, p. 91–108, 2015.

RUZZI, M.; AROCA, R. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 30, n. 196, p. 124–34, 2015.

SALAMONE, I. E.; FUNES, J. M.; DI SALVO, L. P.; ESCOBAR-ORTEGA, J. S.; D'AURIA, F.; FERRANDO, L.; FERNANDEZ-SCAVINO, A. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasiliense* and *Pseudomonas fluorescens*: genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 196-204, 2012.

SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre, Brasil: Genesis. 1999. 508p.

SCHMIDT, M. W.; TORN, M. S.; ABIVEN, S.; DITTMAR, T.; GUGGENBERGER, G.; JANSSENS, I. A.; NANNIPIERI, P. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 49-56, 2011.

SCHNITZER, M. Humic Substances: Chemistry and Reactions. In: SCHNITZER, M., KHAN, S. U. (Ed). **Soil Organic Matter**. Amsterdam: Elsevier, 1978. p. 1-64.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Soil organic matter**. Amsterdam: Elsevier, 1978, 319 p.

SEKAR, C., PRASAD,N., & SUNDARAM, M. D. Enhancement of polygalacturonase activity during auxin induced para nodulation and endorhizosphere colonization of Azospirillum in rice roots. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.38, n.1, p. 80-83, 2000.

SERRAJ, R.; KRISHNAMURTHY, L.; KASHIWAGI, J.W.; KUMAR, J.; CHANDRA, S.; CROUCH, J.H. Variation in root traits of chickpea (*Cicer arietinum L.*) grown under terminal drought. **Field Crops Research**, v. 88, p. 115–127, 2004.

SERRAJ, R.; MCNALLY, K.L.; SLAMET-LOEDIN, I.; KOHLI, A.; HAEFELE, S.M.; ATLIN, G.; KUMAR, A. Drought resistance improvement in rice: an integrated genetic and resource management strategy. **Plant Production Science**, v. 14, p. 1–14, 2011.

SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUNAPALA, N. KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15 N<sub>2</sub> incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif- mutants strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n.3, p. 358-366, 2001.

SHUKLA, K. P.; SHARMA, S.; SINGH, N. K.; SINGH, V.; TIWARI, K.; SINGH, S. Nature and role of root exudates: efficacy in bioremediation. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 9717–9724, 2011.

SOUSA, S. M.; CLARK, R. T.; MENDES, F. F.; DE OLIVEIRA, A. C.; de VASCONCELOS, M. J. V.; PARENTONI, S. N.; MAGALHÃES, J. V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, v. 39, n.11, p. 925-935, 2012.

SOUZA, R. D; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, p. 401-419, 2015.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. 2 ed. New York: Wiley, 496p, 1994.

TAN, G.Y; TAN, W. K. Interaction between alfalfa cultivars and *Rhizobium* strains for nitrogen fixation. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 71, n. 5, p. 724–729, 1986.

TAVARES, O. C. H. **Efeito dos ácidos húmicos sobre as H<sup>+</sup>-ATPase, transportadores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e sobre o crescimento em arroz**. 2014. 130f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2014.

TAVARES, O. C. H.; SANTOS, L. A.; FERREIRA, L. M.; SPERANDIO, M. V. L.; DA ROCHA, J. G.; GARCÍA, A. C.; DOBBSS, L. B.; BERBARA, R. L. L.; DE SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Humic acid differentially improves nitrate kinetics under low-and high-affinity systems and alters the expression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases and nitrate transporters in rice. **Annals of Applied Biology**, v. 170, n.1, p. 89-103, 2017.

TREVISAN, S.; FRANCIOSO, O.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n.6, p. 635-643, 2010.

VACCARO, S., ERTANI, A., NEBBIOSO, A. et al. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. **Chem. Biol. Technol. Agric.** v.2, n. 5, 2015

VACHERON, J., DESBROSSES, G., BOUFFAUD, M., TOURAIN, B., MOËNNE-LOCCOZ, Y., MULLER, D., LEGENDRE, L., WISNIEWSKI-DYÉ, F., & PRIGENT-COMBARET, C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Scence**, v.4, n.356, 2013.

VAN DE VENTER, H. A.; FURTER, M.; DEKKER, J.; CRONJE, I. J. Stimulation of seedling root growth by coal-derived sodium humate. **Plant and soil**, v. 138, n. 1, p. 17-21, 1991.

VARANINI, Z.; PINTON, R. Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **The Rizosphere**. Marcel Dekker: Basel, 2001.p. 141 – 158.

VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. Influence of humic substances on growth and physiological processes. In: VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. (Ed.) **Soil organic matter and biological activity**. Netherlands: Springer, 1985. p. 37-75.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers . **Plant and Soil**, v.255, n.2, p. 571–586, 2003

WALKER, V.; BRUTO, M.; BELLVERT, F.; BALLY, R.; MULLER, D.; PRIGENT-COMBARET, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; COMTE, G. Unexpected phytostimulatory behavior for *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* model strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, p. 495–502, 2013.

WESTON, D. J.; PELLETIER, D. A.; MORRELL-FALVEY, J. L; TSCHAPLINSKI, T. J; JAWDY, S. S; LU, T. Y; ALLEN, S. M.; MELTON, S. J; MARTIN, M. Z; SCHADT, C.W.; KARVE, A. A.; CHEN, J. G; YANG, X.; DOKTYCZ, M.J; TUSKAN, G. A. *Pseudomonas fluorescens* induces strain-dependent and strain-independent host plant responses in defense networks, primary metabolism, photosynthesis, and fitness. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 6, p. 765–778, 2012.

WICKHAM, H.; CHANG, W. Ggplot 2: Create elegant data visualisations using the grammar of graphics. RStudio. R package version 2.2. 1, 2017.

ZAMIOUDIS, C.; MASTRANESTI, P.; DHONUKSHE, P.; BLILOU, I.; PIETERSE, C. M. J. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. **Plant Physiology**, v. 162, n. 1, p. 304-318, 2013.

ZANDONADI, D. B.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. **Planta**, v. 225, n. 6, p. 1583-1595, 2007.