

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Influência das Substâncias Húmicas de Três Origens
Diferentes nos Parâmetros Morfológicos e
Bioquímicos da Cultura de Milho e na Colonização
Micorrízica**

Nadia Rosaura Quevedo Pinos

2018



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

**INFLUÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE TRÊS ORIGENS
DIFERENTES NOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DA CULTURA DE MILHO E NA COLONIZAÇÃO
MICORRÍZICA**

NADIA ROSAURA QUEVEDO PINOS

Sob a orientação do Professor
Ricardo Luis Louro Berbara

e Co-orientação do Professor
Andrés Calderín García

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Biologia 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 pelo(a) autor(a)

P657I

Pinos, Nadia Rosaura Quevedo, 1980-
Influência das substâncias húmicas de três origens
diferentes nos parâmetros morfológicos e bioquímicos da
cultura de milho e na colonização micorrízica / Nadia
Rosaura Quevedo Pinos. - 2018.
117 f.: il.

Orientador: Ricardo Luis Louro Berbara.

Coorientador: Andrés Calderín García.

Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do
Solo, 2018.

1. Matéria Orgânica. 2. Substâncias Húmicas. 3.
Simbioses micorrízica. 4. Andisol. 5. Organossolo. I.
Louro Berbara, Ricardo Luis, 1957-, orient. II.
Calderín García, Andrés, 1981-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do Solo. IV.
Título.

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

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

NADIA ROSAURA QUEVEDO PINOS

Teses submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 08/02/2018.

Andrés Calderín García. Dr. UFRRJ
(Co-orientador)

Everaldo Zonta. Dr. UFRRJ

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

Eliane Maria Ribeiro da Silva. Dra. Embrapa Agrobiologia

Wallace Luis de Lima. Dr. IFES - Espírito Santo

DEDICATÓRIA

*Ningém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre.*

Paulo Freire.

*Á minha amada filha Yara.
A meu companheiro de vida Pedro.
A meus pais,
Rita Pinos Goyes e Jefferson Quevedo Mora.
Aos meus irmãos Adela, Martí e Yasser*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Secretaria Nacional de Educación Superior Ciência, Tecnologia e Innovación (SENESCYT) e ao Instituto de Fomento al Talento Humano (IFTH), pela bolsa de estudos concedida.

À UFRRJ, ao CPGA-CS e a CAPES pelo apoio na pesquisa.

Ao meu orientador o professor Ricardo Luis Louro Berbara pela oportunidade e apoio.

Ao meu co-orientador o professor Andrés Calderín Garcia pelo suporte no melhor entendimento da parte química e estrutural das substâncias húmicas.

Ao Pedro e Yara pelo apoio incondicional, o carinho e a paciência.

Aos irmãos cubanos-cariocas que a vida me deu, o Sael e a Rosalba, obrigada pelo suporte, carinho e seu conhecimentos e aportes sobre micorrizas.

Ao Wilk por estar sempre disposto a colaborar e pela grata companhia.

A Yusimi, grata pelo, apoio e amizade.

A Lely e Jaime por sua colaboração com as análises bioquímicas, as recomendações e pelos bons momentos juntos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia do Solo, Chuli, Lívia, Beto, Orlando, Ernane, Junior, Julia e Rosana pelo convívio e colaboração.

A Cristiane e Shirlei pela ajuda com as determinações de glomalina e carbono orgânico.

A todos meus mais sinceros agradecimentos!

BIOGRAFIA

Nadia Rosaura Quevedo Pinos, equatoriana, nascida o 13 de junho de 1980, na cidade de Guayaquil, província do Guayas-Ecuador. Filha de Rita Rosalva Pinos Goyes e Jefferson Quevedo Mora. Bacharel em Física e Matemática do Colégio Nacional 31 de Outubro da Troncal, província do Cañar-Ecuador. Formou-se no ano 2003 como Engenheira Agrônoma, e no 2006 obteve o título de Master em Agroecologia e Agricultura Sustentável na Universidade Agraria da Havana-Cuba, com uma bolsa de estudos outorgada pelo governo de Cuba. Em fevereiro de 2014 ingressou no Curso de Pós-graduação em Agronomia - Ciência do Solo na Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro a través de uma bolsa de estudos outorgada pela Secretaria Nacional de Educação Superior Ciência, Tecnologia e Inovação (SENESCYT) e financiada pelo Instituto de Fomento ao Talento Humano (IFTH).

RESUMO GERAL

QUEVEDO PINOS, Nadia Rosaura. **Influência das substâncias húmicas de três origens diferentes nos parâmetros morfológicos e bioquímicos da cultura de milho e na colonização micorrízica.** 2018. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O objetivo do presente trabalho de tese foi estudar as substâncias húmicas (SH) extraídas de um Organossolo (Org), um Andisol (And) e um vermicomposto (Vc) mediante sua caracterização e avaliação de seus efeitos sobre indicadores morfológicos e bioquímicos da cultura de milho e o sinergismo com fungos micorrízicos na cultura do milho. No Capítulo I são estudadas as características estruturais das SH e suas frações, os AH e AF, utilizando técnicas químicas e espectroscópicas, e avaliada a influência de dois extratores diferentes ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7(\text{aq})$ e $\text{NaOH}(\text{aq})$) nas características estruturais das frações ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF). Existiu homogeneidade entre as características estruturais de cada substância húmica independente do tipo de extrator utilizado. As SH extraídas de Organossolo e Vermicomposto apresentaram uma predominância de estruturas alifáticas devido à presença predominante de grupos $\text{C}_{\text{Alk H, R}}$, $\text{C}_{\text{Alk-O}}$ e grupos carboxílicos ($\text{C}_{\text{-COO-H, R}}$), enquanto nas SH-And predominaram as estruturas alifáticas $\text{C}_{\text{Ar, H, R}}$, $\text{C}_{\text{Alk H, R}}$, $\text{C}_{\text{-COO-H, R}}$ e carboxil $\text{C}_{\text{C=O}}$. Não foram observadas diferenças estruturais definidas entre as frações em nenhuma das fontes utilizadas, causadas pelo uso dos diferentes extratores. Porém, os espectros FTIR mostraram que pode haver reorganizações estruturais dos grupamentos funcionais. As frações AF-Vc foram as mais afetadas. O Capítulo II teve como objetivo avaliar os efeitos das SH extraídas de três origens diferentes na germinação, desenvolvimento de parâmetros radiculares e tolerância ao estresse salino em plantas de milho. Os parâmetros germinativos não foram estimulados pela aplicação de SH sendo observados efeitos inibitórios na porcentagem de germinação, redução do Índice de velocidade de Germinação (IVG) e incremento de plântulas anormais em todas as concentrações testadas com a seguinte ordem de inibição SH-And>SH-Org>SH-Vc. Porém, as plântulas normais experimentaram crescimento radicular e acúmulo de massa seca aos 3 dias após a emergência (DAE) em concentrações de 10 mg C L^{-1} . Os parâmetros radiculares e acúmulo de massa seca das plântulas de milho aos 6 DAE foram estimulados pelas três SH em concentrações diferentes, as concentrações de maior estímulo para cada SH foram: SH-Org (20 mg C L^{-1}), SH-And (5 mg C L^{-1}) e SH-Vc (10 mg C L^{-1}), na seguinte ordem: SH-Org>SH-Vc>SH-And. As três SH em suas concentrações ótimas exerceram um efeito redutor do estresse salino (100mM) aos 21 DAE, que foi verificado com o incremento médio da MSR e MSPA, a concentração de clorofila a e a+b também apresentaram acréscimos para as plantas tratadas com SH-Org e SH-Vc. Verificando-se que as SH, independente de sua origem, exerceram um efeito protetor ante o estresse salino. No Capítulo III foi avaliada a influência da interação de três substâncias húmicas (SH-Org, SH-And e SH-Vc) e do fungo micorrízico *D. heterogama*, na cultura do milho. A aplicação das três SH em plantas inoculadas com FMA incrementou a produção de biomassa radicular e total das plantas de milho, assim como foram registrados acréscimos nos teores foliares de nutrientes avaliados. Na colonização micorrízica foi observado uma maior abundância de arbúsculos nos tratamentos com SH-Vc e SH-And. A aplicação das SH melhorou significativamente a densidade de esporos e o teor de glomalina dos tratamentos micorrizados.

Palavras-chave: Ácidos húmicos. Atividade biológica. Simbioses.

GENERAL ABSTRACT

QUEVEDO PINOS, Nadia Rosaura. **Influence of humic substances from three different origins on the morphological and biochemical parameters of maize and mycorrhizal colonization.** 2018. 117p. Thesis (Doctorate in Agronomy Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The objective of this thesis was to study humic substances extracted from two soils, an Organosol (Org), an Andisol (And) and a vermicompost (Vc) by evaluating its effects on morphological and biochemical indicators of the crop of corn and the synergism with mycorrhizal fungi in maize. In Chapter I the structural characteristics of HS and its fractions, AH and AF, using chemical and spectroscopic techniques, were evaluated and the influence of two different extractors ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (aq) and NaOH (aq)) was evaluated on the structural characteristics of the fractions humic acid (HA) and fulvic acids (AF). There was homogeneity between the structural characteristics of each humic substance independent of the type of extractor used. The HS extracted from Organosol and Vermicompost showed a predominance of aliphatic structures due to the predominant presence of $\text{C}_{\text{Alk-H,R}}$, $\text{C}_{\text{Al-O}}$ groups and carboxylic groups ($\text{C}_{\text{-COO-H,R}}$), while in HS-And predominate the aliphatic structures, $\text{C}_{\text{Ar,H,R}}$, $\text{C}_{\text{Alk-H,R}}$, $\text{C}_{\text{-COO-H,R}}$ and carboxyl $\text{C}_{\text{C=O}}$. The use of different extractors showed no structural differences between the fractions in any of the sources used. However, the FTIR spectra showed that there may be structural reorganizations of the functional clusters. The FA-Vc fractions were the most affected. The objective of this study was to evaluate the effects of HS extracted from three different origins on germination, development of root parameters and tolerance to saline stress in corn plants. The germination parameters were not stimulated by the application of HS and inhibitory effects were observed in the percentage of germination, reduction of germination rate (GR) and increase of abnormal seedlings in all concentrations tested with the following order of inhibition HS-And>HS-Org>HS-Vc. However, normal seedlings experienced root growth and dry mass accumulation at 3 days post emergence (DPE) at concentrations of 10 mg C L^{-1} . The root parameters and dry mass accumulation of the maize seedlings at 6 DPE were stimulated by the three HS at different concentrations, the highest stimulus concentrations for each HS were: HS-Org (20 mg C L^{-1}), HS-And (5 mg C L^{-1}) and HS-Vc (10 mg C L^{-1}), in the following order: HS-Org>HS-Vc>HS-And. The three HS at their optimum concentrations exerted a reducing effect of saline stress (100mM) at 21 DPE, which was verified with the mean increase of the dry matter, the concentration of chlorophyll a and a + b also presented increases for the plants treated with HS -Org and HS-Vc. It was observed that SH, regardless of its origin, exerted a protective effect against the saline stress. In Chapter III, the influence of the interaction of humic substances from three origins (HS-Org, HS-And and HS-Vc) and mycorrhizal fungus *D. heterogama* on maize crop was evaluated. The application of three HS in plants inoculated with AMF increased the root and total biomass production of maize plants, as well as increases were recorded in the nutrient foliar contents. In the mycorrhizal colonization, a greater abundance of arbusculos was observed in the treatments with HS-Vc and HS-And. HS application significantly improved spore density and glomalin content of mycorrhizal treatments. HS-Vc was the ones that exerted the greatest increase in many evaluated parameters.

Keywords: Humic acids. Bioactivity. Symbioses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características das substâncias húmicas segundo Steveson (1982).....	5
Figura 2. Mecanismos de formação das substâncias húmicas (STEVENSON, 1982).....	6
Figura 3. Estruturas típicas formadas durante a simbioses dos fungos micorrízicos arbusculares. a) micélio extarradical, b) arbúsculos, c) Estruturas ramificadas de absorção (BAS) e d) esporos. Fonte: Pérez-Moncada et al. (2012).....	15
Figura 4. Sítios de amostragem. A) Organossolo B) Andisol C) Vermicomposto.	23
Figura 5. Diagrama de Van Krevelen para substâncias húmicas, ácidos húmicos e ácidos fúlvicos extraídos de origens diferentes e utilizando dois extratores: (1) NaOH e (2) Na ₄ P ₂ O ₇	29
Figura 6. Espectros CP-MAS ¹³ C RMN das: A) Substâncias húmicas (SH); B) Ácidos húmicos (AH) e C) Ácidos Fúlvicos (AF) de um Organossolo (Org), Andisol (And) e Vermicomposto (Vc) nos espectros preto, azul e verde, respectivamente.....	30
Figura 7. Análise de PCA realizado a partir do carregamento dos espectros puros CP MAS ¹³ C RMN das SH, AH e AF de um Andisol, Organossolo e Vermicomposto. (1) e (2) representam os extratores NaOH e Na ₄ P ₂ O ₇ respetivamente.....	33
Figura 8. PCA realizada a partir dos dados espectrais puros ¹³ C NMR CP MAS mostrando os padrões de semelhanças entre as frações obtidas com os diferentes extratores. A) e B): Scores e loadings respectivamente obtidos para a PCA das três frações húmicas, C) e D): Scores e loadings respectivamente obtidos para a PCA das frações de ácidos húmicos e fúlvicos, E) e F): Scores e loadings respectivamente obtidos para a PCA das frações de ácidos húmicos e G) e H): Scores e loadings respectivamente obtidos para a PCA das frações de ácidos fúlvicos.	34
Figura 9. Espectros FTIR das: A) Substâncias húmicas (SH); B) Ácidos húmicos (AH) e C) Ácidos Fúlvicos (AF) de um Organossolo (Org), Andisol (And) e Vermicomposto (Vc) nos espectros preto, azul e verde respectivamente.....	35
Figura 10. PCA realizada a partir dos dados espectrais puros FTIR mostrando os padrões de semelhanças entre as frações de ácido fúlvico (A) e ácidos húmicos (B) com os diferentes extratores.	36
Figura 11. A) Comprimento radicular da maior raiz primária; B) Comprimento parte aérea de plântulas de milho tratadas com SH de três origens: Organossolo (SH-Org), Andisol (SH-And) e Vermicomposto (SH-Vc), em cinco concentrações (0, 10, 20, 40 e 80 mg C L ⁻¹). Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) para cinco réplicas, segundo o teste de Tukey, (p<0,05).	50
Figura 12. Massa seca de plântulas normais de milho tratadas com SH de três origens: Organossolo (SH-Org), Andisol (SH-And) e Vermicomposto (SH-Vc), em cinco concentrações (0, 10, 20, 40 e 80 mg C L ⁻¹). Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) de quatro repetições. Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).	51
Figura 13. A) Comprimento radicular, B) Número de raízes Laterais e C) Área superficial Radicular de plântulas de milho aos 6 DAT (Dias após o transplante) tratadas com SH de três origens: Organossolo (SH-Org), Andisol (SH-And) e Vermicomposto (SH-Vc), em cinco concentrações (0, 5, 10, 20, e 40 mg C L ⁻¹). Pontos representam o valor médio ± ES (erro padrão) para cinco réplicas, segundo o teste de Tukey, (p<0,05).	52

- Figura 14.** Massa seca radicular e da parte aérea de plântulas de milho aos 6 DAE tratadas com SH de três origens: Organossolo (SH-Org), Andisol (SH-And) e Vermicomposto (SH-Vc), em cinco concentrações (0, 5, 10, 20, e 40 mg C L⁻¹). Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) para cinco réplicas, segundo o teste de Tukey, (p<0,05). 53
- Figura 15.** Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e razão raiz/parte aérea média de plantas de milho submetidas durante 15 e 21 dias a estresse salino (ES) e aplicação de substâncias húmicas (SH) de três origens diferentes. Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey (p<0,05). 55
- Figura 16.** Altura média de plantas de milho submetidas durante 15 e 21 dias a estresse salino (ES) e aplicação de substâncias húmicas (SH) de três origens diferentes. Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey (p<0,05). 56
- Figura 17.** Conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plantas de milho aos 21 DAE submetidas a estresse salino (ES) e aplicação de substâncias húmicas (SH) de três origens diferentes. Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey (p<0,05). 57
- Figura 18.** Taxa de crescimento relativo foliar (TCRF) e radicular (TCRR) de plantas de milho submetidas a estresse salino (NaCl-100mM) e substâncias húmicas de três origens. Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey (p<0,05). 58
- Figura 19.** Teor relativo de água (TRA) de plantas de milho submetidas durante 21 dias a estresse salino (ES) e aplicação de substâncias húmicas (SH) de três origens diferentes. Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey (p<0,05). 59
- Figura 20.** Porcentagens de permeabilidade radicular de plantas de milho submetidas a estresse salino (100 mM) e substâncias húmicas de três fontes aos 21 DAE. Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias no fator avaliado (raiz e folha) seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey (p<0,05). 60
- Figura 21.** Variações médias semanais de temperatura máxima e mínima (linhas) e de umidade relativa do ar (barras) registradas durante a condução do experimento em casa de vegetação. Seropédica, RJ. UFRRJ. Outubro-Novembro de 2016. 66
- Figura 22.** Escala de avaliação da porcentagem de colonização micorrízica e abundância de arbúsculos em raízes. Trouvelot et al., 1986 70
- Figura 23.** Massa seca da parte aérea e radicular das plantas de milho em função da origem da substância húmica e a inoculação com FMA (*D. heterogama*) (+FM) ou não (-FM), aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Barras representam o erro padrão da amostra para 5 repetições. 72

- Figura 24.** Altura e diâmetro médio das plantas de milho em função da origem da substância húmica e a inoculação com FMA (*D. heterogama*) (+FM) ou não (-FM), aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 5 repetições. 73
- Figura 25.** Conteúdo de carboidratos totais, redutores e proteínas totais das plantas de milho em função da origem da substância húmica e a inoculação com FMA (*D. heterogama*) (+FM) ou não (-FM), aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 3 repetições. 75
- Figura 26.** Teores médios de N, P, K, Ca e Mg em tecido foliar de milho em função da origem da substância húmica e a inoculação com FM (*D. heterogama*) (+FM) ou não (-FM), aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 3 repetições. 77
- Figura 27.** Teores médios de S, B, Zn, Fe, Cu e Mn em tecido foliar de milho em função da origem da substância húmica e a inoculação com FMA (*D. heterogama*) (+FM) ou não (-FM), aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 3 repetições. 79
- Figura 28.** Raízes de milho BR-3025 colonizada por fungos micorrízicos arbusculares. Fotomicrografia de raiz com aumento de 20X, após coloração. h: hifas; a: arbúsculos; ap: apresorio. 81
- Figura 29.** Estimativa de colonização micorrízica em raízes de milho inoculado com FMA (*D. heterogama*) com adição de substâncias húmicas de três origens aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 3 repetições. F: Frequência de colonização micorrízica; M: Intensidade de colonização micorrízica e; A: abundância de arbúsculos no sistema radicular. 82
- Figura 30.** Densidade de esporos (DE) em um substrato cultivado com milho em casa de vegetação e inoculado com *D. heterogama* e com adição de substâncias húmicas de três origens. Letras minúsculas iguais ausência de diferencia significativa entre os tratamentos segundo o teste de Tukey, ($p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para 3 repetições. 83
- Figura 31.** Concentração de glomalina facilmente extraível (GFE) em um solo cultivado com milho em casa de vegetação e inoculado com *D. heterogama* e com adição de substâncias húmicas de três origens. Letras minúsculas iguais ausência de diferencia significativa entre os tratamentos segundo o teste de Tukey, ($p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para 3 repetições. 84
- Figura 32.** Eficiência micorrízica de plantas de milho inoculadas com *D. heterogama* e com adição de SH de três origens aos 50 DAE em relação aos tratamentos com adição de SH sem inocular. 85

Figura 33. Plântulas normais, anormais e sementes não germinadas de milho sob efeito de substâncias húmicas.	117
Figura 34. Efeito de cinco concentrações de HS de três origens nos parâmetros radiculares de plântulas de milhos aos 6 DAT. Imagens obtidas com Scanner Epson Expression 10000 X.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição elementar média de ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de solos (Calderoni et al., 1984).....	8
Tabela 2. Análise elementar de ácidos húmicos e fúlvicos de distintas origens (SENESI e LOREDP, 1999).....	8
Tabela 3. Alguns efeitos das SH em diferentes espécies vegetais.....	12
Tabela 4. Características dos materiais de três origens diferentes utilizados para extração e fracionamento de substâncias húmicas (SH).....	24
Tabela 5. Composição elementar de substâncias húmicas (SH), ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos obtidos de um Andisol, Organossolo e um Vermicomposto utilizando dois extratores.....	27
Tabela 6. Distribuição de carbono (%) em espectros ¹³ C NMR de substâncias húmicas (SH) e suas frações, ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) obtidas com dois extratores diferentes de um Andisol, Organossolo e Vermicomposto.....	32
Tabela 7. Porcentagem de Germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milho submetidos a substâncias húmicas de três origens em cinco concentrações.....	48
Tabela 8. Porcentagem de plântulas normais, anormais e não germinadas de sementes de milho submetidas a substâncias húmicas de três origens em cinco concentrações.....	49
Tabela 9. Características químicas do substrato utilizado no experimento.....	67
Tabela 10. Concentrações de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), clorofila a+b (Cl a+b) e carotenóides (Carot) em plantas de milho aos 50 DAE tratadas com substâncias húmicas e fungos micorrízicos.....	74
Tabela 11. Características físico químicas dos solos e vermicomposto utilizados para a extração de substâncias húmicas. Valores médios de 3 réplicas.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS

And	Andisol
Org	Organossolo
Vc	Vermicomposto
SH	Substâncias húmicas integras (AH+AF)
AH	Acido húmico
AF	Acido Fulvico
CP MAS ¹³C RMN	Ressonância magnética nuclear do isótopo do ¹³ C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico
FTIR	Espectroscopia InfravermelAH com Transformada de Fourier.
FMA	Fungos micorrízicos arbusculares
CT	Carboidratos totais
CR	Carboidratos redutores
PT	Proteínas totais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL	3
2.1. A Matéria Orgânica do Solo	3
2.2. Importância da Matéria Orgânica de Andisols e Organossolos	3
2.2.1. Os Andisols	4
2.2.2. Os Organossolos	4
2.3. As Substâncias Húmicas, Origem, Formação e Estrutura	5
2.3.1. Formação de substâncias húmicas	5
2.3.2. Estrutura química das substâncias húmicas e sua relação com a origem	7
2.4. Efeitos das Substâncias Húmicas no Desenvolvimento Vegetal e na Germinação de Sementes	9
2.5. Proteção das Substâncias Húmicas em Condições de Estresse Salino	11
2.6. Relação Origem-Estrutura-Atividade Biológica das Substâncias	14
2.7. Os fungos Micorrízicos Arbusculares	15
2.8. Interação de Substâncias Húmicas e Fungos Micorrízicos Arbusculares	16
2.9. As Substâncias Húmicas e Fungos Micorrízicos Arbusculares como Bioestimulantes Agrícolas	17
2.10. Importância da Cultura de Milho e os Efeitos das Substâncias Húmicas de Vermicompostos como uma Alternativa Sustentável para sua Produção	17
3. CAPÍTULO I CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E SUAS FRAÇÕES, EXTRAÍDAS DE UM ANDISOL, UM ORGANOSSOLO E UM VERMICOMPOSTO	19
3.1. RESUMO	20
3.2. ABSTRACT	21
3.3. INTRODUÇÃO	22
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.4.1. Localização da área para coleta de amostras de solos e vermicomposto	23
3.4.2. Extração, isolamento e purificação das substâncias húmicas	24
3.4.3. Caracterização química e espectroscópica das substâncias húmicas extraídas de três origens diferentes e suas frações	25
3.4.4. Quimiometria e análises estatísticas dos dados espectrais	26
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.5.1. Composição elementar e relação E_4/E_6 das substâncias húmicas íntegras e suas frações (SH, AH, AF)	27
3.5.2. Espectroscopia de ressonância magnética das substâncias húmicas íntegras e suas frações (AH e AF)	29
3.5.3. FTIR das substâncias húmicas íntegras e suas frações (SH, AH, AF)	35
3.6. CONCLUSÕES	37

4. CAPÍTULO II EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NOS PARÂMETROS GERMINATIVOS, CRESCIMENTO INICIAL E NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE MILHO	38
4.1. RESUMO.....	39
4.2. ABSTRACT.....	40
4.3. INTRODUÇÃO	41
4.4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.4.1. Material vegetal e condições experimentais	42
4.4.2. Experimento I: efeitos das substâncias húmicas na germinação e crescimento inicial de plantas de milho.....	42
4.4.3. Experimento II: efeito doses-resposta de cinco concentrações de substâncias húmicas de três origens em plântulas de milho.....	43
4.4.4. Experimento III: avaliação do efeito das substâncias húmicas em plantas de milho submetidas a estresse salino	44
4.4.5. Avaliação de parâmetros morfológicos: massa seca radicular (MSR), massa seca foliar (MSF) e taxa de crescimento relativo (TCR)	45
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.5.1. Experimento I: efeitos das substâncias húmicas na germinação e crescimento inicial de plântulas de milho	48
4.5.2. Experimento II: Efeito doses-resposta de cinco concentrações de substâncias húmicas de três origens em plântulas de milho.....	52
4.6. CONCLUSÕES	61
5. CAPÍTULO III INTERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE DIFERENTES ORIGENS E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DE MILHO	62
5.1. RESUMO.....	63
5.2. ABSTRACT.....	64
5.3. INTRODUÇÃO	65
5.4. MATERIAL E MÉTODOS	66
5.4.1. Material vegetal e condições experimentais	66
5.4.2. Quantificações bioquímicas foliares: carboidratos totais (CT), carboidratos redutores (CR) e proteínas (PT)	68
5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.5.1. Efeitos na morfologia; morfologia, massa seca, altura e diâmetro do caule.....	72
5.5.2. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos, carboidratos totais, redutores e proteínas totais em tecidos foliares.....	74
5.5.3. Conteúdo de nutrientes em tecidos foliares de milho	76
5.5.4. Efeitos das substâncias húmicas na colonização micorrízica, densidade de esporos, teor de glomalina.....	81
5.6. CONCLUSÕES	87

6. CONCLUSÕES GERAIS	88
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
9. ANEXOS	116

1. INTRODUÇÃO GERAL

A matéria orgânica do solo (MOS) tem sido definida como uma mistura de polímeros orgânicos complexos (STEVENSON, 1994a) formados pela degradação de substâncias orgânicas por processos químicos e biológicos em materiais mais estáveis chamados de húmus quando estão no solo e de substâncias húmicas (SH) após de sua extração por métodos químicos (LAIRD et al., 2008). Podem ser fracionadas em base de sua solubilidade em meio alcalino ou ácido, em ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e huminas (HUM).

As SH são o maior e mais importante componente da matéria orgânica do solo, além do mais abundante, exercem grande influência sobre sua fertilidade (SWIFT, 1979). As características específicas estruturais das SH e suas frações variam de acordo com a fonte de origem e o tempo de transformação da matéria orgânica na fonte (BERBARA e GARCÍA, 2014). A grande diversidade de materiais de origem e condições climáticas como oxigênio, pH, matéria orgânica original e microrganismos que participam no processo de formação das SH, proporcionam-lhes uma grande variabilidade de características moleculares e propriedades recalcitrantes (CHAI et al., 2007).

Embora exista uma grande diversidade de características estruturais das SH, são compostas principalmente por componentes aromáticos e alifáticos, grupos funcionais carboxílicos primários e fenólicos (TREBOUET et al., 2001; HAYES., 2006). Além de peptídeos, oligossacarídeos e grupos de ácidos graxos integrados de ésteres, éter e ligamentos amido, componentes aromáticos derivados principalmente da degradação da lignina e/ou biomassa fúngica (LAIRD et al., 2008). Propriedades químicas e estruturais concedidas pelos materiais orgânicos e fatores ambientais das que são originárias e que são consideradas como responsáveis de estimular o crescimento vegetal (FAÇANHA et al., 2002). Existindo uma relação entre a fonte das SH, sua estrutura e bioatividade (CANELLAS et al., 2012b).

A capacidade de estimular o crescimento vegetal das SH e suas frações tem sido amplamente estudado em diferentes espécies vegetais por diversos autores (CANELLAS et al., 2015; Da SILVA et al., 2015; GARCÍA et al., 2016c) utilizando diversas fontes de substâncias húmicas (solo, carvão, leonardita, vermicomposto, lodo de esgoto, etc), mostrando grande diversidade de efeitos positivos. Os principais efeitos têm sido relacionados com o crescimento radicular, acúmulo de biomassa e promoção de pelos radiculares (FAÇANHA et al., 2002a). Estudos realizados por Baldotto et al. (2011), com ácidos húmicos extraídos de diferentes tipos de solo, relacionaram a bioatividade dos AH em função da concentração utilizada e o nível de intemperismo do solo, obtendo melhores efeitos fisiológicos com AH extraídos de solos menos intemperizados. Os mecanismos mediante os quais as SH exercem estímulo ainda não estão totalmente esclarecidos (TREVISAN et al., 2010). Segundo Muscolo et al. (2013), as SH atuam sobre as plantas como resultado de um predomínio de efeitos tipo auxina e de estruturas não lignínicas.

Além dos efeitos como estimulantes do crescimento vegetal, as SH têm um efeito de grande importância na biologia do solo, servendo como fonte importante de energia para microrganismos não fotossintéticos, como algas, bactérias e fungos, que precisam de substâncias contendo carbono residual (WHITBY e VAN den BERG., 2015). Dentre da biota do solo os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) desenvolvem um papel importante ao formar associações simbióticas mutualistas com aproximadamente o 90% das plantas vasculares (SIQUEIRA et al., 2002), melhorando nas plantas micorrizadas a disponibilidade de água e nutrientes (SMITH e READ, 1997), especialmente os que tem pouca mobilidade no solo como o fósforo (P) (JANSA et al., 2003), incrementando a capacidade de sobrevivência das plantas (BRAHMAPRAKASH e SAHU, 2012; Du JARDIN, 2015).

Os efeitos das SH sobre a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares tanto no solo como na morfologia vegetal ainda têm sido pouco estudados. Existem alguns estudos científicos que relatam a existência de um efeito sinérgico entre as SH e FMA. Efeito que estaria relacionado com o aumento da esporulação (NOBRE et al., 2013), colonização micorrízica (LIMA, 2008) e número de hifas intra e extra radiculares (GRYNDLER et al., 2005, 2009). A nível de produção existem relatos sobre um incremento de alguns parâmetros produtivos na associação de SH+FMA na cultura de linho (BAKRY et al., 2014).

A hipótese deste trabalho é de que as substâncias húmicas extraídas de origens distintos podem estimular diferentemente os aspectos morfológicos e bioquímicos da cultura do milho e o desenvolvimento da colonização micorrízica.

O objetivo geral do estudo é avaliar as características químicas das substâncias húmicas isoladas de dois solos e um vermicomposto e sua influência nos aspectos bioquímicos, morfológicos e do sinergismo com FMA na cultura de milho.

Para dar resposta ao objetivo geral a tese foi organizada em três capítulos interrelacionados entre si, o primeiro Capítulo intitulado **CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E SUAS FRAÇÕES, EXTRAÍDAS DE UM ANDISOL, UM ORGANOSSOLO E UM VERMICOMPOSTO**, teve como objetivo caracterizar por métodos químicos e espectroscópicos de composição elementar, UV-vis, FTIR, CP-MAS ¹³C RMN as substâncias húmicas e suas frações extraídas de um Organossolo, um Andisol e um vermicomposto utilizando como extratores Na₄ P₂ O₇ (aq) e NaOH (aq).

No segundo Capítulo, intitulado **EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NOS PARÂMETROS GERMINATIVOS, CRESCIMENTO INICIAL E NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSESE SALINO EM PLANTAS DE MILHO** o objetivo foi determinar o efeito de diferentes concentrações de substâncias húmicas de três origens diferentes na germinação, crescimento inicial e tolerância ao estresse salino em plantas de milho.

E no terceiro Capítulo intitulado **INTERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE DIFERENTES ORIGENS E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DE MILHO** os objetivos foram: i) analisar os efeitos da interação das substâncias húmicas de diferentes origens com micorrizas na cultura de milho a partir de parâmetros morfológicos, bioquímicos e de acúmulo de nutrientes da cultura de milho; e ii) caracterizar a influência da interação substância húmica x micorriza no estabelecimento e no desenvolvimento da simbiose micorrízica na cultura de milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1. A Matéria Orgânica do Solo

A matéria orgânica do solo (MOS) é definida como o material de origem biológico produto de alterações bioquímicas de resíduos animais, vegetais, microrganismos e compostos como resultado do metabolismo vegetal e microbiano, que pode ser encontrada no solo em distintos estados de conservação derivados da dinâmica do meio vivo e das interações com o meio mineral, os fatores ambientais, tipo de solo e práticas de manejo (LABRADOR, 2012; STEVENSON, 1994). Após o processo de degradação do material de origem biológico este é transformado em materiais mais estáveis chamados de *húmus* quando estão no solo e de substâncias húmicas (SH) após sua extração por métodos químicos (LAIRD et al., 2008).

No solo, em condições naturais, o conteúdo de matéria orgânica é baixo em proporção ao conteúdo de argila e varia com o tipo de solo, têm sido relatados valores de 2-4% em Oxisols e Ultisols e de 2-12% em Mollisols e Andisols (STEVENSON, 1994; USDA, 2009; TAN, 2009). Embora seu conteúdo seja baixo, a matéria orgânica tem um papel de grande importância no solo por seus efeitos nas suas características físicas, químicas e biológicas (TAN, 2011), e a capacidade de troca catiônica e aniônica, reduzindo a lixiviação de nutrientes.

A matéria orgânica além de ser de grande importância para o solo, constitui uma das cinco principais reservas de carbono (C) da terra (LAL, 2004) ao possuir 58% deste elemento distribuído em resíduos orgânicos mortos em diferentes estágios de decomposição (raízes e folhas mortas) e em parte como produtos intermediários da decomposição denominados: fração *não húmica* constituída por compostos orgânicos, excreções radiculares e produtos do metabolismo microbiano, bioquimicamente identificáveis; e a fração *húmica* formada por macromoléculas complexas, produto do processo de humificação, denominadas substâncias húmicas, as quais estão integradas ao solo e que não podem ser separadas mecanicamente (COLEMAN et al., 1998).

São as substâncias húmicas (SH) o mais abundante e amplamente distribuído componente da MOS, ao representar aproximadamente 85-90% de sua composição, pelo que geralmente são dois conceitos fortemente associados (FONTANA., 2009; NARDI e PIZZEGHELLO., 2002).

Ao ser as SH o maior componente da matéria orgânica do solo, o equilíbrio de suas frações influencia diretamente as características do solo tais como estrutura, capacidade de troca catiônica e disponibilidade de nutrientes (DABIN., 1982). Esta capacidade da MO de afetar as propriedades do solo, permite seu uso como indicador de sua qualidade e suas frações humificadas são consideradas um marcador químico estável da história do solo (CANELLAS e FAÇANHA., 2004).

2.2. Importância da Matéria Orgânica de Andisols e Organossolos

Embora a matéria orgânica esteja presente em todos os solos em diferentes concentrações e seja de grande importância para a manutenção de suas propriedades e o estoque de C, existem solos que por suas características de formação são de grande importância ecológica pela grande capacidade de armazenamento de C como são os Andisols (USDA, 2009) e Organossolos (SIBCS, 2009) os quais tem em média uma densidade de carbono orgânico de 220 e 1170 ton há⁻¹ e reservas de 20 e 179 bilhões de toneladas ha⁻¹ (ESWARAN et al., 2000; LAL et al., 2004).

2.2.1. Os Andisols

Os Andisols são solos com características andicas, segundo o sistema de classificação americano (USDA, 2009), derivados de cinzas vulcânicas que cobrem mais de 110 milhões de hectares da superfície terrestre (1%), amplamente distribuídos em regiões Árticas e tropicais de grande atividade vulcânica (FAO, 2007). Os solos vulcânicos contêm grandes quantidades de C armazenado na MOS, embora só ocupem 1% da área terrestre, podem conter mais C que solos não vulcânicos (DAHLGREN et al., 2004), chegando a armazenar aproximadamente 5% do C global (ESWARAN et al., 1994).

Possuem características físicas, morfológicas e químicas únicas atribuídas a seu material de origem constituído por minerais como alofano, imogolite, ferrihidrite e complexos Al e Fe-humus (HARSH et al., 2002; McDANIEL e LOWE., 2012), e ao clima frio e úmido e baixa pressão atmosférica que favorece o acúmulo de matéria orgânica, reforçada pela formação de complexos organometálicos de Al e Fe de mobilidade limitada e fortemente resistentes à degradação microbiana (ILLMER et al., 2003; BUYTAERT et al., 2006), e pela acumulação de cinza vulcânica do período quaternário (BUYTAERT et al., 2005). Fatores que resultam na formação de um horizonte superficial “Melânico” de intensa cor escura e alto conteúdo de matéria orgânica (IBANEZ e MANRIQUE., 2011). Outro fator que contribui para a sobreposição de MOS em solos vulcânicos é a adição repetida de depósitos vulcânicos que rejuvenescem a paisagem criando novos ecossistemas capazes de armazenar mais C (IMAYA et al., 2010).

Encontram-se em zonas altas e úmidas da serra equatorial “páramos” (ecossistema montano intertropical, com predomínio de vegetação arbustiva, desde altitudes entre 2700-5000 msnm), assim como, dentro do corredor interandino, região costeira e Amazônia devido a fluxos de material vulcânico. A grande maioria de Andisols são intensamente cultivados e plantados com uma grande variedade de culturas, sua maior limitação é a grande capacidade para reter fósforo de forma não biodisponível para sua assimilação pelas raízes das plantas, em alguns lugares a topografia irregular é uma grande limitante para seu uso em cultivos.

2.2.2. Os Organossolos

Os Organossolos são solos distribuídos em diferentes regiões do mundo, e são o resultado da subsequente acumulação de material orgânico, em diferentes níveis de decomposição, sob condição de drenagem deficiente, comuns em zonas planas, ou altimontanas úmidas. O acúmulo de matéria orgânica, dada pela constante saturação de água, outorgam-lhes propriedades físicas, químicas e mecânicas que diferem enormemente dos solos minerais, apresentam um horizonte hístico com teor de carbono orgânico maior ou igual a 80 g kg⁻¹ e conteúdo de carbono orgânico de 12-18% (EMBRAPA, 2013).

No Sul e Sudeste de Brasil, os Organossolos identificados estão distribuídos tanto em baixadas litorâneas como em regiões altimontanas e são considerados ecossistemas de grande fragilidade e susceptíveis à degradação (CIPRIANO-SILVA et al., 2014).

As particularidades dos Organossolos têm incentivado o desenvolvimento de métodos próprios para sua caracterização e classificação (FONTANA et al., 2008), sobretudo os relacionados com o estudo das substâncias húmicas (SH) e suas frações, os ácidos húmicos, os ácidos fúlvicos e as huminas (LOSS et al., 2015).

2.3. As Substâncias Húmicas, Origem, Formação e Estrutura

As SH são substâncias de estrutura complexa, heterogênea, de massa molar variável e com distintos grupos funcionais (STEVENSON, 1994), resultado das reações químicas e bioquímicas de sínteses e ressíntese de um amplo intervalo de materiais de natureza orgânica e grau de complexidade, presentes em solos, compostagens, turfa, leonardita, etc., mediadas por fatores microbiológicos que atuam sobre o material orgânico depositado no solo sobre o qual influenciam variáveis locais específicas, como ambiente físico-químico tais como: temperatura, umidade, regime de água no solo, pH, disponibilidade de nutrientes e qualidade dos materiais de origem, que irão contribuir com maior ou menor intensidade no processo de humificação (SCHNITZER, 1978; ZECH et al., 1997; SCHIAVON et al., 2010).

As SH podem ser fracionadas em função de seu tamanho molecular e solubilidade em meio ácido ou alcalino, em ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e huminas (HUM); os AH possuem um alto peso molecular (>3,500 Da), de cor escura, solúveis em médio básico e precipitam em médio ácido (pH 2,5), são a fração biologicamente mais resistente; os AF de menor peso molecular (<3,500 Da), cores castanho-bruno, solúveis em médio ácido ou básico; e as HUM insolúveis e que permanecem ligadas à matriz mineral do solo, possuem reduzida capacidade de reação, altamente hidrofóbicas (MALAN., 2015; MUSCOLO et al., 2007). As características das SH foram resumidas por Stevenson (1982) e são apresentadas na

Erro! Fonte de referência não encontrada..

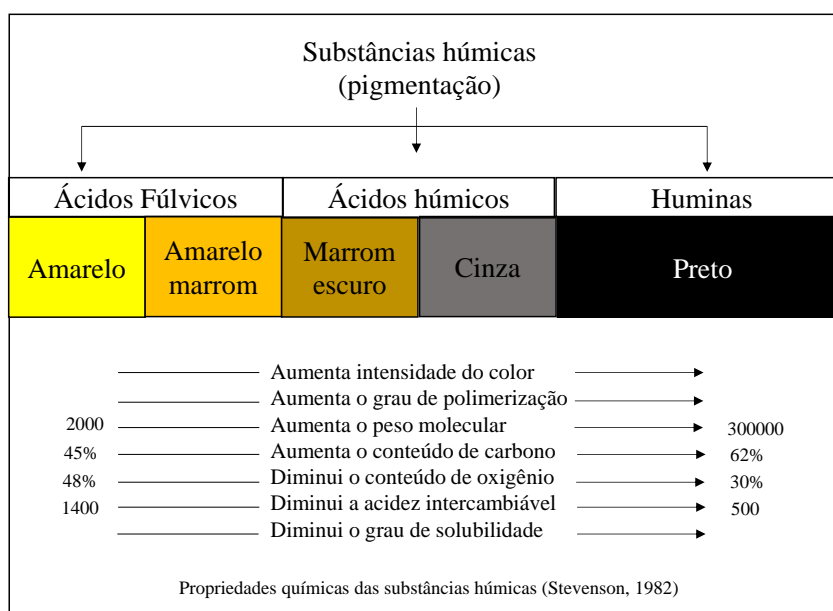


Figura 1. Características das substâncias húmicas segundo Steveson (1982).

2.3.1. Formação de substâncias húmicas

Segundo Stevenson (1982), as SH podem se formar por 4 possíveis vias ou teorias sendo: a) Teoria da lignina (1ª via) proposta por Waksman (1932); b) e c) Teoria dos polifenóis (2ª e 3ª via); e d) Teoria de amino açúcares condensados (4ª via). A teoria de amino açúcares condensados, é considerada a mais antiga pois Millard (1916), considerava que as SH era produto exclusivo da reação química entre açúcares redutores e aminoácidos, produto da atividade microbiana (4ª via). Experimentos relacionados com a sínteses de compostos de coloração escura, similares as SH, deu lugar ao surgimento do conceito de *humificação*,

propondo que a formação das SH é produto da decomposição microbiológica da matéria orgânica (Figura 2).

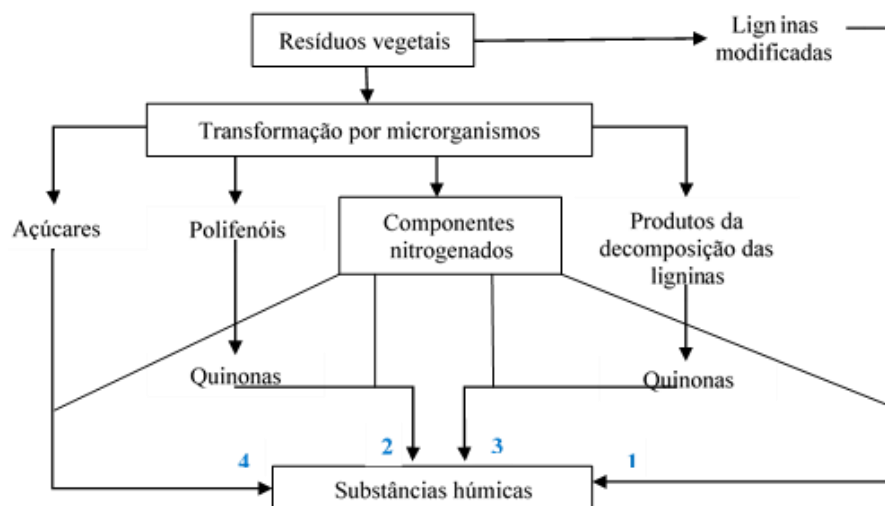


Figura 2. Mecanismos de formação das substâncias húmicas (STEVENSON, 1982).

Em 1932, Waksman propõe uma teoria da formação de SH a partir de ligninas parcialmente modificadas (1ª via), segundo esta teoria a lignina é modificada parcialmente pelos microrganismos e o resíduo torna-se parte do húmus do solo, a modificação da lignina leva a perda de grupos metoxyl (OCH_3) e geração de hidroxifenóis e oxidação de cadeias alifáticas para formar grupos $-\text{COOH}$. A lignina modificada está exposta a novas mudanças e daria lugar aos primeiros AH e logo após os AF. Waksman citou como evidência para suportar sua teoria as similaridades entre a lignina e os ácidos húmicos para ser decompostos pelos fungos e bactérias; a solubilidade em álcool e piridina, assim como em alcalis com posterior precipitação; a presença de grupos metoxyl; a natureza ácida destas; a capacidade das ligninas de se transformar em ácidos húmicos ao serem aquecidas com alcalis aquosos e as propriedades dos AH similares às ligninas oxidadas.

As 2ª e 3ª vias, são a base das teorias dos polifenóis, as duas vias são muito semelhantes e só variam na fonte de polifenóis. Na 3ª via a lignina ainda tem um papel importante, mas de diferente forma, onde os aldeídos fenólicos e ácidos liberados da lignina no ataque microbiológico são convertidos enzimaticamente em quinonas, as quais são polimerizadas na ausência/presença de compostos amino para formas moléculas “similares as substâncias húmicas”. A 2ª via é similar à 3ª via com a diferença que os polifenóis são sintetizados por microrganismos das fontes de C não lignínicas como a celulose, e oxidados enzimaticamente em quinonas e após convertidos em substâncias húmicas.

Embora todas as vias podem ser consideradas como mecanismos de sínteses de SH na natureza que acontecem em todos os solos, elas não vão acontecer na mesma intensidade ou ordem de importância, podendo predominar uma sobre outra em função das características próprias de cada solo e ambiente. E são estes mecanismos de decomposição que influenciam na complexidade e heterogeneidade estrutural das SH e que não permitem a definição de um modelo estrutural genérico, embora existam várias propostas estruturais (STEVENSON., 1985; SENESI et al., 1989; STEVENSON., 1994; HAYES., 1997).

2.3.2. Estrutura química das substâncias húmicas e sua relação com a origem

A variabilidade na composição das SH em função do material faz necessário que, para sua ótima caracterização, seja preciso utilizar mais de um método analítico. Entre os mais comuns destacam-se: a determinação de carbono orgânico das SH e suas frações (C-AFH/C-AFF e C-EA/C-HUM), que permite obter relações entre suas frações (CAH/CAF) que indicam a mobilidade do carbono no solo, os valores maiores que 1 são indicador de maior estabilidade das SH e solos mais ricos em AH, como em ambientes temperados e naturalmente férteis, no entanto nas regiões tropicais os solos mais intemperizados tem menor razão CAH/CAF (<1). Nessas condições os processos de humificação são menos intensos e como consequência há menor quantidades de AH. O aumento do conteúdo de AH pode indicar melhoria na qualidade dos húmus do solo ou incremento da atividade biológica, que promove a síntese de SHs mais condensadas (CANELLAS et al., 2003; KONONOVA, 1982; ORLOV, 1998; CANELLAS e FAÇANHA., 2004).

Análise elementar que mostra o conteúdo de C, N, H, O e S das SH e as relações atômicas H/C, O/C, O/H, e C/N são úteis para identificar os tipos de SH e suas frações, monitorar as mudanças na estrutura e estabelecer separações entre as SH. Valores H/C e O/C de 1 e 0,5, respectivamente, são característicos de AH, enquanto valores de 1,4 e 0,7 são típicos para AF, os maiores valores dos AF estão relacionados com a maior quantidade de grupos oxigenados como COOH e carboidratos (STEELINK, 1985; LAIRD et al., 2008). Altas relações H/C estão diretamente relacionadas com maior alifaticidade das SH (STEELINK, 1985; CANELLAS et al., 2005) e baixas relações são diretamente proporcionais ao grau de aromaticidade das SH (BENITES et al., 2005). Porém, estas relações não podem ser usadas como indicador de aromaticidade/alifaticidade pois são consideradas as insaturações presentes em grupos carboxílicos e carbonilas primárias durante os cálculos da relação H/C (CANELLAS et al., 2005). As condições de drenagem do solo também desempenham um fator determinante nas relações C/N e O/C reportando-se variações segundo o drenagem e predomínio de AF em Organossolos em condições de drenagem moderada (SILVA et al., 2009).

Técnicas espectroscópicas como a espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) vão obter informação sobre a estrutura química dos compostos orgânicos que compõem as SH tais como: i) grupos funcionais: carboxílicos, carbonilas, fenólicos, alcoólicos, nitrogenados; ii) componentes aromáticos e alifáticos; iii) carboidratos e proteínas; iv) presença de partículas inorgânicas, como minerais de argilas, metais e sais; e v) quantitativas ou semiquantitativas, etc. (STEVENSON, 1994; SOLOMON et al., 2005).

Análises de UV-visível obtém informações de inferência qualitativa do grau de humificação, evolução química e tamanho das moléculas por meio da análise espectral em um comprimento de onda de 465 e 665 nm o que permitirá a obtenção de uma relação E_4/E_6 a qual está relacionada à aromaticidade e ao grau de condensação dos núcleos aromáticos, altos valores indicam a presença de compostos com maior quantidade de cadeias alifáticas, enquanto baixos valores indicam a presença de compostos de cadeias aromáticas e maior grau de humificação (KONONOVA, 1966).

Porém Chen et al. (1977), demonstraram uma maior relação da razão E_4/E_6 com o tamanho das moléculas e ao peso molecular, do que ao grau de condensação das moléculas húmicas, e a existência de uma correlação negativa com o percentual de carbono e positiva com o percentual de oxigênio e acidez total. Os valores da razão E_4/E_6 variam segundo a fração de SH, em climas temperados Kononova (1966), relatou valores menores que 5,0 para AH e de 6,0-8,5 para AF. Em condições de clima subtropical os valores oscilam entre menores que 3,5 a maiores que 5, para AH e maiores que 8,5 para os AF.

E a ressonância magnética nuclear (^{13}C -RMN) que avalia as principais mudanças na contribuição de grupos funcionais lábeis e recalcitrantes, identificação de compostos como ligninas, taninos, carboidratos, aminoácidos, biopolímeros alifáticos etc. Os espectros apresentam geralmente os mesmos grupos funcionais só que com diferenças na intensidade dos sinais.

As SH têm como componente principal o C, H, O, N, S (Tabela 1) (BECKETT et al., 1987; MUSCOLO et al., 2007; CALDERONI et al., 1984). Assim como apresentam grande quantidade de estruturas aromáticas condensadas, cadeias alifáticas e grupos químicos funcionais ativos como o ácido carboxílico (COOH), hidroxilo (-OH), carbonila (C = O), anéis fenólicos e grupos das quinonas que podem reagir à carregada de íons positivos ou negativos em solução os quais interagem com os agregados do solo (MALAN, 2015; PICCOLO, 2001; PINTON et al., 2015) proporcionando-lhe estabilidade nos solos, favorecendo o armazenamento de carbono (MARTÍNEZ et al., 2013).

Tabela 1. Composição elementar média de ácidos húmicos e fúlvicos extarídos de solos (Calderoni et al., 1984).

SH	Composição elementar média (%)				
	C	H	O	N	S
Ácidos húmicos	53,8-58,7	3,2-6,2	32,8-38,3	0,8-4,3	0,1-1,5
Ácidos fúlvicos	40,7-50,6	3,8-7,0	39,7-49,8	0,9-3,3	0,1-3,6

Embora seja conhecida as características gerais químicas e estruturais das SH, estas variam de acordo com a origem das SH, o tempo de transformação da matéria orgânica próprios de cada origem, assim como de fatores de formação do solo, vegetação e clima (JENNY, 1941 em EGLI et al., 2007). As SH podem ser consideradas como um marcador natural do processo de humificação que podem refletir a condição da formação e manejo do solo especialmente a fração AH, a qual é a mais estudada por sua maior relação com a identidade do solo e capacidade de manifestar as transformações ocorridas nele (FONTANA, 2006).

Estudos realizados por Senesi e Lofredo. (1999), apresentam a composição elementar dos AH e AF extraídos de solos de diferentes climas, onde é possível observar que existem variações na composição elementar tanto dos AH como AF relacionados com o clima (Tabela 2). Variação significativa na constituição da MOS e seu principal componente, as SH, tem sido relatada em diferentes pedoambientes (BENITES et al., 2001).

Tabela 2. Análise elementar de ácidos húmicos e fúlvicos de distintas origens (SENESI e LOREDP, 1999).

Elemento %	Clima/solo					IHSS Standard
	Ártico	Temperado ácido	Temperado neutro	Subtropical ácido	Tropical ácido	
----- Ácidos húmicos -----						
C	56,2	53,8-58,7	55,7-56,7	53,6-55,0	54,4-54,9	58,1
H	6,2	3,2-5,8	4,4-5,5	4,4-5,0	4,8-5,6	3,7
N	4,3	0,8-2,4	4,5-5,0	3,3-4,6	4,1-5,5	4,1
S	0,5	0,1-0,5	0,6-0,9	0,8-1,5	0,6-0,8	0,4
O	32,8	35,4-38,3	32,7-34,7	34,8-36,3	34,1-35,2	34,1

Continua...

Continuação da Tabela 2.

Elemento %	Clima/solo					
	Ártico	Temperado ácido	Temperado neutro	Subtropical ácido	Tropical ácido	IHSS Standard
	----- Ácidos fúlvicos -----					
C	47,7	47,6-49,9	40,7-42,5	42,2-44,3	42,8-50,6	50,6
H	5,4	4,41-4,7	5,9-6,3	5,9-7,0	3,8-5,3	3,8
N	1,1	0,9-1,3	2,3-2,8	3,1-3,2	2,0-3,3	2,7
S	1,6	0,1-0,5	0,8-1,7	2,5	1,3-3,6	0,6
O	44,2	43,6-47,0	47,1-46,2	43,1-46,2	39,7-47,8	43,7

Estudos realizados com substâncias húmicas extraídas de diferentes tipos de solos, vermicomposto, lodos de esgoto e outras fontes reportaram a existência de uma relação entre a estrutura e fonte de origem das SH (CANELLAS et al., 2008). Estudos das propriedades químicas com RMN das SH de diferentes solos de origem Andico e não Andico determinaram que os Andisols acumulam C mais insaturados (MATUS et al., 2014), grupos funcionais carboxil e metoxil de lignina pobremente degradada (CONTE et al., 2003), alto grau de condensação (YONEBAYASHI e HATTORI, 1988) que solos de origem não andico. Sendo relacionada a presença de alta aromaticidade de SH de Andisol com presença de plantas carbonizadas pelas sucessivas erupções vulcânicas e características do epipedon melânico (horizonte escuro, rico em MO e com propriedades andicas) (SHINDO et al., 2004).

Em estudos com frações húmicas extraídas de solos e vermicompostos, Canellas et al. (2012a) observaram variações na presença de estruturas de acordo com a fonte das SH, relatando que as SH de vermicompostos tem maiores proporções de estruturas alquílicas que as isoladas de solos onde predominaram estruturas mais hidrofóbicas e aromáticas.

Além da fonte de MO, o seu tempo de transformação também influência nas características das SH, fator muito importante na compostagem, onde a falta de maturação do material orgânico pode resultar em quantidades desproporcionais de AF, os quais normalmente encontram-se em altas proporções por ser os primeiros a serem sintetizados (TOMATI et al., 2002). Compostos bem humificados devem apresentar valores C-AH/C-AF maiores que 1,5 (JODICE et al., 1989 ; SILVA et al., 2009). Neste sentido Aguiar et al. (2013), reportaram que o aumento do tempo de compostagem reduz o conteúdo de estruturas tipo carboidratos e mantém estruturas alquílicas e aumento de estruturas hidrofóbicas.

2.4. Efeitos das Substâncias Húmicas no Desenvolvimento Vegetal e na Germinação de Sementes

As SH atuam sobre o sistema radicular ao modificar a funcionalidade das membranas celulares, associando-se à parede celular e depois formando parte dos componentes solúveis das células (GARCÍA, 2013). Um dos efeitos mais sobressalentes das SH sobre a morfologia radicular é a indução do desenvolvimento radicular com o incremento do número de raízes finas, relacionadas com o aumento da atividade da enzima H^+ -ATPase da membrana plasmática e o aumento do conteúdo desta enzima em plantas de milho tratadas com SH de vermicomposto e relacionadas com uma atividade similar à hormonal (FAÇANHA et al., 2002), porém o estímulo das SH de diferentes origens no sistema radicular é mais intenso que as auxinas, o que segundo Zandonadi et al. (2007), a presença de moléculas com atividade biológica ainda não foram identificadas.

O incremento do sistema radicular aumenta a área superficial e conseqüentemente a capacidade de exploração e absorção de nutrientes (CANELLAS et al., 2010). Ao nível nutricional a promoção do crescimento vegetal tem sido justificada, pelo aumento da

solubilidade de micronutrientes com a formação de complexos solúveis (CHEN et al., 2003; GARCÍA-MINA et al., 2004).

Aplicação de AH promove o crescimento e produtividade das plantas, o qual pode ser refletido em incrementos da parte aérea pela aplicação de AH em abóbora (MORA et al., 2010), pimenta (ÇIMRIN et al., 2010), aumentos no comprimento e diâmetro do caule, incremento de biomassa fresca e seca, número de folhas e frutos, assim como tamanho dos frutos e rendimentos de colheitas (ARTEAGA et al., 2007; FAÇANHA et al., 2002a; GARCÍA et al., 2016c; NARDI e PIZZEGHELLO, 2002). Da Rosa et al. (2009) reportaram incrementos de 30 e 41 % na produção de massa seca aérea e radicular de plantas de milho quando tratadas com SH de carvão em doses de 10 e 20 mg C L⁻¹ quando comparadas com os tratamentos sem aplicação de SH.

Em nível bioquímico também existem alterações pelo efeito da aplicação de SH assim a aplicação de AH isolados de vermicomposto que segundo Hernández et al (2013) induziriam o aumento na produção de proteínas totais em plantas de alface (*Latuca sativa*), e incrementos no conteúdo de clorofila e produção de óleo em plantas de soja (BEFROZ FAR et al., 2013). A aplicação de AF em plantas de pimenta (*Capsicum annuum*) incrementaram o conteúdo de carboidratos, fenóis e carotenóides dos frutos (AMINIFARD et al., 2012).

Os efeitos sobre o crescimento radicular proporcionado pelas SH e AH têm sido relatados em plantas de tomate onde as SH extraídas de diferentes profundidades de um Organossolo promoveram o aparecimento de pelos radiculares, sendo os ácidos húmicos os que apresentaram maior capacidade de indução de raízes laterais quando comparados com as SH (SILVA et al., 2011), indução do crescimento radicular também foi reportado em espécies como *Arabidopsis* (CANELLAS, et al., 2010; DOBBS et al., 2010), milho (CANELLAS et al., 2010; MARTÍNEZ et al., 2012; YIGIDER et al., 2016), pimenta (ÇIMRIN et al., 2010).

Além das condições de temperatura, oxigênio e umidade adequadas para que o processo de germinação aconteça, a presença de hormônios e o equilíbrio entre os promotores e inibidores do crescimento tem um papel essencial para a ativação de reações químicas na semente (FERREIRA e BORGHETTI, 2004; MOTA et al., 2015). Os efeitos das SH sobre a germinação estão relacionadas com o incremento do fluxo de nutrientes que incrementariam a respiração e divisão celular promovendo o crescimento radicular e a atividade enzimática das sementes (EYHERAGUIBEL et al., 2008).

Os resultados encontrados na literatura, dos efeitos das SH na germinação, são diversos e variam com a espécie, fonte e concentração de SH utilizada, sendo reportados efeitos positivos na germinação e o índice de velocidade de germinação de sementes de Aroeira do Sertão (*Myracrodruon urundeuva Fr. All*) os quais foram relacionados com baixas concentrações de SH, enquanto quanto altas concentrações tiveram um efeito fitotóxico (MOTA et al., 2016). Em sementes de cevada a aplicação de substâncias húmicas comerciais causou o alongamento e crescimento da massa de germinados nos primeiros 7 dias de germinação, bem como da massa da raiz na segunda semana do desenvolvimento da plântula (FERREIRA e BORGHETTI, 2001). Efeitos positivos têm sido observados em sementes de *Panicum vigatum* L. tratadas com AH extraídos de materiais compostados segundo Traversa et al. (2014), com incrementos de 37 e 36% em concentrações de 200 e 50 mg C L⁻¹.

Já experimentos realizados por Šerá e Novák. (2011), usando várias concentrações de SH procedentes de lignita, três tipos de solo e comerciais aplicadas em sementes de *Chenopodium album* agg. relatam efeitos variáveis na germinação estreitamente relacionados com a origem da SH mais que com a concentração, onde as SH procedentes de um Podzol exerceram um efeito inibitório enquanto as outras SH tiveram um efeito estimulante.

2.5. Proteção das Substâncias Húmicas em Condições de Estresse Salino

Segundo Marschner. (1995), em condições de salinidade as plantas têm maiores dificuldades para se desenvolverem, primeiramente devido ao incremento do estresse osmótico pela alta concentração de sal na solução do solo, o que diminui o potencial de água no solo; pelo aumento na concentração de Na e Cl que acumula-se no tecido e pela redução na absorção de nutrientes minerais. As SH surgem como alternativa na maior tolerância aos efeitos da salinidade nas plantas (PICCOLO; NARDI; CONCHERI, 1992) e outros tipos de estresses ambientais por mecanismos ainda não bem esclarecidos (DELFINE et al., 2005).

Estes efeitos bioprotetores das SH na redução do estresse salino tem sido relatados por Çimrin et al. (2010) em plantas de pimenta, relatando que a aplicação de SH reduz os efeitos da salinidade ao incrementar o crescimento radicular e reduzindo os danos na membrana. Resultados bioprotetores ante o estresse salino também foram reportados por Martínez et al (2012), em plantas de milho (*Zea mays*. L) e por Reyes (2008) em tomate (*Lycoopersicum sculentum*). Este efeito protetor das SH também foi observado ante o estresse hídrico em plantas de arroz (*Oriza sativa*) em trabalhos realizados por García, (2013) e relacionados com o estímulo da atividade das peroxidases. Outros relatos sobre os efeitos das SH no metabolismo e desenvolvimento vegetal podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Alguns efeitos das SH em diferentes espécies vegetais.

Fração Húmica/Fonte	Cultivo	Condições de estudo	Efeitos no crescimento	Referência
SH sem definir	Sementes de aroeira do sertão (<i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All)	Câmara de crescimento	Baixas concentrações de SH promovem germinação e IVG. Altas concentrações têm efeito fitotóxico	Mota et al. (2015) Brasil
AH Lignita	Milho (<i>Zea mayz</i> L)	Câmara de crescimento	As aplicações de AH removem os efeitos negativos do Mn	Yigider et al. (2016) Turkia
SH sem definir	Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	Câmara de crescimento Estresse hídrico	Sob estresse hídrico os AH estimulam a atividade das peroxidases por acima das plantas sem AH, pelo que o efeito protetor poderia ser resultado do ABA e mecanismos independentes envolvidos na regulação do tonoplasto	García (2013) Brasil
AH com e sem PGPR (Rizobacterias promotoras do crescimento) Vermicomposto	Soja (<i>Glycine max</i>), melão (<i>Cucumis melo</i>), reigrass (<i>Lolium perenne</i>), manjerição (<i>Ocimum basilicum</i>)	Câmara de crescimento Campo	Incrementos na média de clorofila em todas as plantas, com AH e AF Incremento em campo do conteúdo de óleo em combinação com PGPR	Befrozfar et al. (2013) Irã
SH vermicomposto	Alface (<i>Latuca sativa</i>)	Campo	Redução do ciclo de produção Maior número de folhas Menor conteúdo de carboidratos totais nas folhas Aumento de conteúdo de proteínas totais Aumento de atividade do nitrato reductase	Hernandez et al. (2013) Cuba
SH vermicomposto	<i>Leucaena leucocephala</i> cv	Semicontroladas	Altura das plantas, número de brotos	Wencomo (2013) Cuba

Continua...

Continuação da Tabela 3.

Fração Húmica/Fonte	Cultivo	Condições de estudo	Efeitos no crescimento	Referência
SH vermicomposto	Milho (<i>Zea mayz</i> L)	Câmara de cultivo Estresse por NaCl	Diminuição do efeito estressante do NaCl	Martínez et al. (2012)
SH vermicomposto	Feijão (<i>Faseolus vulgaris</i> L)	Semicontroladas	Maior índice de crescimento e maiores rendimentos	Hernández del Valle et al. (2012)
AF sem definir	Pimenta (<i>Capsicum annuum</i>)	Em campo com aplicações no crescimento vegetativo	Incremento de conteúdo de carboidratos, fenóis, capsium, carotenóides na fruta e atividade de antioxidantes	Aminifard et al. (2012)
AF sem definir	Chrysanthemum (<i>Chrysanthemum indicum</i>)	Câmara de crescimento Estresse salino	Incremento do crescimento vegetativo, florescimento, Carboidratos totais, N	Mazhar et al. (2012)
AH vermicomposto	Sementes de milho (<i>Zea mayz</i> L) e Arabidopsis	BOD	Em Arabidopsis acortamento da raiz principal e indução de raízes laterais Milho baixo efeito auxinico, com alongamento de raiz principal e indução de laterais	Canellas et al. (2010), Brasil
AH sem definir	Abobora (<i>Cucumis sativus</i>)	Câmara de cultivo hidroponia	Incremento crescimento radicular e de NO ₃ em Parte aérea e decréscimo de NO ₃ em raízes Incremento atividade ATP ase e mudanças na distribuição de citoquininas e poliaminas	Mora et al. (2010) Espanha
SH sem definir	Arabidopsis, tomate (<i>Lycopersicum sculentum</i>) e milho	Câmara de crescimento	Incremento da emergência de raízes laterais	Dobbs et al. (2010)
AH sem definir	Pimenta (<i>Capsicum annuum</i>)	Câmara de crescimento e solo	Incremento do peso da parte aérea e raiz e de conteúdo de NPK Ca Mg Cu em condições de estresse salino	Çimrin et al. (2010) Turquia

2.6. Relação Origem-Estrutura-Atividade Biológica das Substâncias

Até a atualidade os mecanismos pelos quais as SH estimulam o metabolismo vegetal e influenciam no seu crescimento não estão totalmente esclarecidos e sua estrutura ainda é debatida pela variedade de reações biológicas envolvidas em sua gênese que as tornam em moléculas complexas, capazes de exercer importantes funções nutricionais no sistema solo-planta (TREVISAN et al., 2010).

As SH por ser produto do processo de humificação de uma grande variedade de resíduos microbianos e vegetais, são substâncias quimicamente reativas e recalcitrantes à biodegradação, com propriedades e estruturas de um grande conjunto de componentes de estrutura e peso molecular diverso.

Os efeitos das SH são variáveis de acordo com o material de origem, a fonte e concentração, peso molecular da fração húmica (AYUSO et al. 1996; TREVISAN et al., 2010; CHEN et al., 2004; ROSE et al., 2014; MUSCOLO et al., 2013), conteúdo de grupos funcionais (PICCOLO et al., 1992), além da espécie vegetal, idade da planta, do órgão analisado e das condições experimentais em que este foi aplicado (ROSE et al., 2014; LIMA et al., 2011), incluindo o tempo de transformação da matéria orgânica (BERBARA e GARCÍA, 2014).

A grande variabilidade de efeitos das SH, segundo sua origem, no metabolismo e morfologia vegetal tem permitido alguns autores relacionar sua bioatividade com a estrutura. Neste sentido Muscolo et al. (2007) reportaram que predominância de estruturas $-CH_3$ e $-COOH$ em SH extraídas de solos estimulam o metabolismo em plantas de *Pinus nigra*. A predominância de grupos carboxil ($-COOH$) e estruturas hidrofóbicas em AH de vermicompostos e compostagens tem sido relacionados com a emissão de raízes laterais em plantas de milho (AGUIAR et al., 2013; JINDO et al., 2012), assim como o estímulo das bombas de prótons radiculares especificamente na presença de estruturas hidrofóbicas de SH de vermicompostos (DOBBSS et al., 2010).

García et al. (2016a) relacionou a emissão de raízes pequenas com estruturas menos complexas e funcionais ($-O$, $-N$) e altos valores E_4/E_6 , enquanto a emissão de raízes maiores foi relacionada com estruturas complexas e de menor funcionalização (grupos aromáticos e alifáticos não substituídos). A fração também tem um influência grande em função da concentração e estímulo exercido, neste sentido a fração AH estimula o crescimento radicular em concentrações 5 vezes maiores que as SH, relacionando este comportamento com a maior labilidade das SH quando comparadas aos AH e a maior recalcitrância dos AH que precisam de concentrações maiores para ter efeito (GARCÍA et al., 2016).

A redução do estresse hídrico proporcionado pelos AH de vermicompostos em plantas de arroz têm sido relacionado com a presença de estruturas alifáticas e oxigenadas (GARCIA et al., 2014; GARCÍA et al., 2012b). A multiplicação celular de células embriogênicas tem relação com a hidrofobicidade e labilidade dos AF extraídos de um solo (ZANCANI et al., 2011). A eficácia das frações de baixo peso molecular foi relacionada com a alta presença de grupos aromáticos, carboxílicos e fenólicos (NARDI et al., 2000a, 2000b; PICCOLO et al., 1992).

O maior aprofundamento no estudo das relações entre a origem das SH, a qualidade da matéria orgânica e seus efeitos na bioatividade é de grande importância na promoção de um melhor entendimento destas relações que tem uma influência na produção das culturas agrícolas e florestais.

2.7. Os fungos Micorrízicos Arbusculares

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são microrganismos biotróficos obrigatórios do solo que formam simbiose com aproximadamente 95% das plantas vasculares terrestres, formando uma relação simbiótica mutualista (SOUZA et al., 2010), onde as plantas fornecem compostos de C para o fungo e o fungo proporciona às plantas melhor nutrição, ao incrementar a área de exploração das raízes mediante a produção de hifas intra e extraradiculares, capazes de absorver elementos minerais e água do solo e transferi-los para o sistema radicular.

No processo simbiótico, o fungo e a planta apresentam interação genética, morfológica e funcional, onde o fungo ao colonizar o tecido cortical radicular forma estruturas intracelulares denominadas de arbúsculos para posteriormente desenvolver o micélio extra radicular que vai ser capaz de adquirir nutrientes e água do solo enquanto as plantas proveem ao fungo compostos com C (HARRISON, 1999; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). As estruturas típicas dos fungos micorrízicos arbusculares pode ser observada da Figura 1.

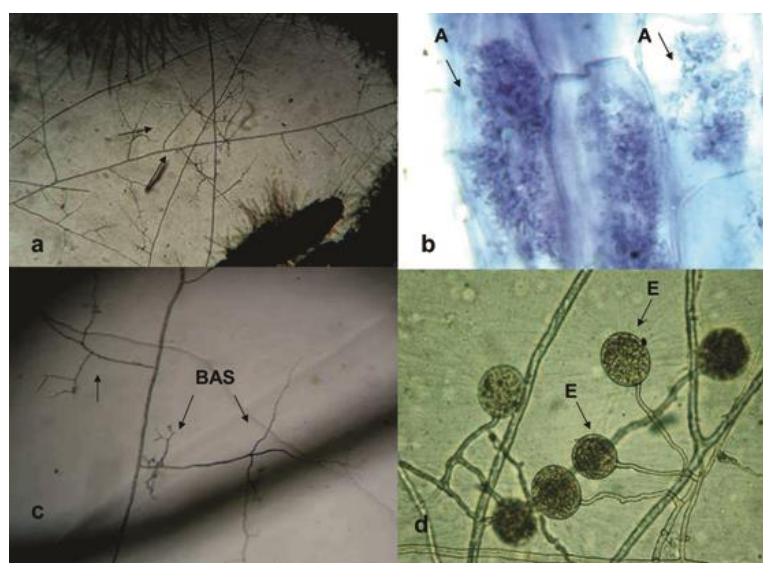


Figura 1. Estruturas típicas formadas durante a simbioses dos fungos micorrízicos arbusculares. a) micélio extraradical, b) arbúsculos, c) Estruturas ramificadas de absorção (BAS) e d) esporos. Fonte: Pérez-Moncada et al. (2012)

Em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente o P, as hifas são mais eficientes no transporte deste elemento que a raiz (BERBARA et al., 2006). Os FMA auxiliam na absorção de nutrientes do solo influenciando o crescimento vegetal (SUGAI et al., 2011). A eficiência dos FMA tem sido observada em condições de baixo conteúdo de matéria orgânica onde tem sido reportada abundante presença de FMA (ALLEN et al., 1995), em posição vantajosa para a absorção de nutrientes liberados na decomposição da MOS.

Ao terem acesso direto às fontes de carbono da planta os FMA podem ser considerados como vias de drenagem do C da atmosfera para o solo, sendo uma resposta da planta a esse dreno o incremento da taxa fotossintética (BERBARA et al., 2006). Ao ter influência sobre a produtividade primária ao permitir uma maior absorção de nutrientes e água nas plantas, ao melhorar a estabilidade dos agregados do solo e pela grande produção de biomassa e glomalinas (ZHU e MILLER, 2003).

Os FMA além de participar ativamente na assimilação de nutrientes, atuam diretamente sobre a estrutura do solo ao produzir uma glicoproteína chamada glomalina que

representa uma forma estável de armazenar C (RILLIG, 2004). A deposição de glomalina no solo é considerado o resultado, principalmente, da decomposição de esporos e hifas (>80%) e em menor grau da secreção hifálica (DRIVER e RILLING., 2005). Possivelmente, as funções da glomalina por estar contidas nas paredes de hifas e esporos estejam relacionadas com o favorecimento da aderência das hifas às superfícies e diminuir a palatibilidade ante os predadores (SOUSA et al., 2012).

A quantidade de glomalina no solo é abundante e pode ser detectada em diversos ambientes em concentrações médias de 2-15 mg g⁻¹ de solo (RILLING et al., 2001).

Devido a sua alta estabilidade no solo uma das principais funções da glomalina está relacionada com a agregação do solo e a redução dos processos erosivos (WRIGHT e UPADHYAYA, 1998). A estreita relação da glomalina com os FMA permite que os teores desta proteína sejam utilizados como uma alternativa econômica e efetiva a outras técnicas de mensuração de atividade dos FMA, como a densidade de esporos, comprimento de hifas, colonização radicular e potencial de inóculo em campo e casas de vegetação (PURIN e RILLING., 2007).

Os FMA trazem muitos benefícios para as plantas ao estimular o crescimento e desenvolvimento vegetal, proporcionando-lhe: i) melhor absorção e translocação de nutrientes como N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Mo, Fe, Mn, especialmente os de pouca mobilidade (P, Zn, Mo) ao ter um maior vínculo entre a planta-solo pelo maior tamanho do micélio extraradical; ii) Maior resistência a diferentes tipos de estresse (hídrico, salino, térmico) ao melhorar as relações hídricas da planta (as hifas externas dos fungos são capazes de captar água além da zona de deficiência); iii) Influência sobre a fotossíntese do hospedeiro: Não só pela maior absorção de P, assim como também pela eficiência em sua utilização no processo fotossintético; estímulo na ação das H⁺-ATPase; iv) Maior tolerância à presença de metais pesados; v) resistência ao ataque de patógenos; vi) maior sinergismo com bactérias do solo; vii) Além de melhorar a estrutura do solo com a formação de agregados estáveis (BARRER et al., 2009; WANG et al., 2008; BLEE e ANDERSON, 2002; GAMPER et al., 2004; JEZDINSKÝ et al., 2012).

Portanto, os FMA constituem um dos componentes mais valiosos da biota do solo que por seus benefícios ambientais, se manejados adequadamente podem contribuir substancialmente para a sustentabilidade dos agrossistemas.

2.8. Interação de Substâncias Húmicas e Fungos Micorrízicos Arbusculares

As SH têm um papel fundamental no desenvolvimento dos microrganismos do solo. A aplicação de SH mostra benefícios na colonização micorrízica de várias espécies vegetais, assim como uma interação positiva na absorção de nutrientes. A interação positiva entre as SH e os FMA poderia ser descrito pelo estímulo do crescimento de hifas intra e extraradicaes de FMA sob efeito de pequenas concentrações de compostos orgânicos (GRYNDLER et al., 2002), capazes de aumentar a atividade das H⁺-ATPases gerando um maior crescimento das hifas e, conseqüentemente, uma maior taxa de colonização radicular e maior absorção de nutrientes e água para as plantas ao incrementar o volume de solo explorado através de sua rede micelial (CAMEL et al., 1999).

A associação de AH com FMA é considerada uma relação mutualística ao apresentar benefícios no crescimento de briófitas (*Lunaria cruciata*) e a esporulação de várias espécies de FMA, especialmente como *Glomus proliferum* (NOBRE, 2011). A adição de AH de vermicompostos em concentrações de 20 mg C L⁻¹ estimularam, em condições in vitro, a colonização micorrízica de *Glomus clarum* em raízes de manjeriço (*Ocimum basilicum L.*) e trevo (*Trifolium repens L.*) assim como a atividade das bombas de prótons (P H⁺- ATPase e H⁺-PPase) (LIMA, 2008).

Alguns resultados publicados por Gryndler et al. (2005) referem que o uso de AH e AF associados com micorrizas em condição hidropônica estimularam a colonização radicular e produção de micélio extraradical de micorrizas da espécie *Glomus claroideum* BEG 23, concluindo que as SH podem representar um componente estimulante do solo onde desenvolvem-se os fungos micorrízicos arbusculares.

Bakry et al. (2014), encontraram estímulo significativo da associação de FMA e AH na altura das plantas de linho (*Linum usitatissimum* L.) e outros parâmetros produtivos. Trabalhos realizados por Yano-Melo et al. (2013) relacionados com a avaliação da interação de AH (Codahumus®) com ausência ou presença de FMA da espécie *Glomus clarum* em mudas enxertadas de videra num Argissolo, observaram aumento da massa radicular apenas nas plantas micorrizadas com uso de AH, também encontraram resultados positivos no estímulo da colonização radicular de *G. Clarum*.

Estes efeitos poderiam ser atribuídos às modificações físico-químicas das propriedades do solo ocasionadas pelas SH. Na atualidade há poucas pesquisas relacionadas à interação das SH como as micorrizas.

2.9. As Substâncias Húmicas e Fungos Micorrízicos Arbusculares como Bioestimulantes Agrícolas

Geralmente, na literatura, não é comum utilizar o termo bioestimulante ao se referir as substâncias húmicas, mas as primeiras definições de bioestimulantes surgiram a partir de experimentos realizados com AH e extratos de algas por Zhang e Schmidt no 1997, eles definiram a influência positiva das SH e os extratos de algas para promover o crescimento das plantas e a tolerância ao estresse hídrico como “*materiais que em mínimas quantidades promovem o crescimento das plantas*”, distinguindo bioestimulantes de nutrientes e outras emendas do solo com as palavras “*mínimas quantidades*” (Du JARDIN, 2015).

Kauffman et al. (2007), definiram os bioestimulantes como: “*Materiais que não são fertilizantes, que promovem o crescimento quando aplicados em baixas quantidades*”. O mesmo autor classifica os bioestimulantes em três grandes grupos, na base de sua fonte e conteúdo: i) substâncias húmicas, (ii) produtos contendo hormônios, como extratos de algas marinhas contendo quantidades identificáveis de auxinas, citoquininas e seus derivados e (iii) produtos contendo aminoácidos (CALVO et al., 2014).

Mais recentemente vários cientistas têm reconhecido novas categorias, incluído no termo bioestimulantes as substâncias e os microrganismos. Du Jardim. (2015), classifica os bioestimulantes como: (i) substâncias húmicas; (ii) complexos de materiais-orgânico; (iii) ácidos aminos livres e outras substâncias contendo nitrogênio; (iv) extratos botânicos e de algas (v) derivados do quitosân e outros biopolímeros; (vi) sais inorgânicos (incluindo fosfite); (vii) fungos benéficos e (viii) bactérias benéficas.

Neste sentido os bioestimulantes como as substâncias húmicas e os fungos micorrízicos arbusculares podem ser utilizados como uma alternativa ambientalmente viável à agricultura de altos insumos para melhorar o desenvolvimento agrícola.

2.10. Importância da Cultura de Milho e os Efeitos das Substâncias Húmicas de Vermicompostos como uma Alternativa Sustentável para sua Produção

O milho (*Zea mays* L.) pertence à ordem das Gramíneas, família Poaceae e é originário de América Latina. O milho é hoje o terceiro grão alimentício mais cultivado no mundo, com uma produção na safra 2016/2017 estimada em 1067 milhões de toneladas (USDA, 2017), vindo logo depois do arroz e do trigo.

O uso do milho na alimentação humana seja em grão ou seus derivados, é de grande importância sobre todo na agricultura familiar e regiões de baixa renda ou países onde o milho é a base da culinária como Mesoamérica e Sulamérica. Mas sua produção está ligada principalmente a grande escala para a alimentação animal. Pelo que sua importância como cultivo está ligada fortemente a fatores econômicos e sociais.

Atualmente a produção de milho é em grande escala e em condições de alto uso de insumos agrícolas, porém existe um interesse crescente no cultivo em condições orgânicas com emprego de técnicas modernas, como o uso de agentes biológicos, armadilhas, controle de pragas e de bioestimulantes como as substâncias húmicas e os FMA.

Considerando que a cultura do milho é versátil e tem grande facilidade para se adaptar aos diferentes sistemas de produção é comum o uso de híbridos de milho nos sistemas de agricultura orgânica já que com cuidados adequados na sua multiplicação permite ao produtor produzir sua própria semente com preços baixos (CRUZ et al., 2010) Existendo no Estado do Rio de Janeiro algumas variedades de milho híbridohíbrido bem adaptadas em sistemas orgânicos de produção de milho verde (ARAÚJO et al., 2000). Neste sentido o híbrido triplo BR-3025 tem apresentado um bom desempenho em condições de cultivo orgânico no SIPA (Sistema Integrado de Produção Agroecológica-Embrapa). Este híbrido é de ciclo precoce, com alto potencial produtivo e excelente resistência ao acamamento (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008).

O uso de vermicompostos na agricultura orgânica é cada vez mais comum, bem seja íntegros ou como extratos líquidos húmicos, já que as SH presentes nestes exercem efeito positivo no metabolismo vegetal (GARCIA et al., 2014), além de incrementar o rendimento das culturas e melhorar as condições físico químicas do solo (SOLIS-MEJIA et al., 2012). Estudos conduzidos por García et al., (2016c) relatam que a aplicação de extratos húmicos de vermicompostos melhorou os indicadores de crescimento e produção em condições não controladas.

3. CAPÍTULO I

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E SUAS FRAÇÕES, EXTRAÍDAS DE UM ANDISOL, UM ORGANOSSOLO E UM VERMICOMPOSTO

3.1. RESUMO

As substâncias húmicas e frações utilizadas no presente estudo foram obtidas a partir da extração e fracionamento químico com $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7(\text{aq})$ e $\text{NaOH}(\text{aq})$ da matéria orgânica de um Andisol (And), Organossolo (Org) e vermicomposto (Vc), com o objetivo de caracterizar utilizando técnicas de análises elementar (CNH), e espectroscópicas (CP-MAS ^{13}C NMR, FTIR, UV-vis) e avaliar a influência de dois extratores diferentes ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7(\text{aq})$ e $\text{NaOH}(\text{aq})$) nas características estruturais das frações ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF). Os resultados amonstram que as substâncias húmicas (SH) tem maior conteúdo de C que os AH e AF independente de sua origem. Tanto as SH como os AH e AF, extraídos de solos (And e Org) apresentaram maior conteúdo de C, N. As relações H/C e E_4/E_6 indicam maior presença de estruturas aromáticas nas SH de And e Org em relação às de vermicomposto (Vc). Os picos de maior intensidade observados no ^{13}C RMN para as SH foram em torno dos 67, 160 e 172 ppm, os AH de And e Vc tiveram picos característicos em 72, 130 e 172 ppm e os AF em 26, 48, 68 ppm. As frações de Org apresentaram picos intensos em 56 e 153 ppm para AH e 38,72, 133 e 177 ppm para AF. As SH de Andisol tiveram um predomínio de estruturas aromáticas ($C_{\text{Ar, H, R}}$) (34%) e foram mais hidrofóbicas que as SH de Organossolo (19%) e Vermicomposto (23%) onde predominaram as estruturas alifáticas ($C_{\text{Alk H, R}}$, $C_{\text{Alk-O}}$, $C_{\text{-COO-H, R}}$). O uso de diferentes extratores não mostrou diferenças estruturais definidas entre as frações em nenhuma das fontes utilizadas. Porém, os espectros FTIR mostraram que pode haver reorganizações estruturais dos grupamentos funcionais. As frações AF-Vc foram as mais afetadas, enquanto os AH foi observada uma diferenciação clara entre o tipo de extrator utilizado. As técnicas de caracterização química e estrutural aplicadas às SH e suas frações húmicas, os ácidos húmicos e ácidos fúlvicos, em conjunto com as análises quimiométricos permitiram conhecer as diferenças entre as origens e os efeitos dos extratores.

Palavras-chave: Matéria Orgânica. Espectrometria. Quimiometria.

3.2. ABSTRACT

The humic substances and fractions used in this study were obtained from the extraction and chemical fractionation $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7(\text{aq})$ e $\text{NaOH}(\text{aq})$ of organic matter from a Andisol (AND) Organosol (Org) and vermicompost (Vc) with order to characterize using techniques elemental analysis (CNH) and spectroscopic (CP-MAS ^{13}C NMR, FTIR, UV-vis) and evaluate the influence of two different extractors in the structural features of the humic acid (HA) and fulvic acid (FA) fractions. The results show that humic substances (SH) have higher C contents than AH and AF, independent of their origin. Both HS and the HA and FA extracted from soil (and Org And) has higher content of C, N. The relationship H / C and E_4/E_6 indicates increased presence of aromatic structures in the SH and Org And regarding vermicompost (You). The highest peaks observed at ^{13}C NMR for SH were around 67, 160 and 172 ppm, the AH of And and Vc had characteristic peaks at 72, 130 and 172 ppm and the AF at 26, 48, 68 ppm. The fractions of Org showed intense peaks at 56 and 153 ppm for AH and 38.72, 133 and 177 ppm for FA. The SH Andisol had a predominance of aromatic structures ($C_{\text{Ar, H, R}}$) (34%) and were more hydrophobic than the SH Organosol (19%) and worm compost (23%) predominated aliphatic structures ($C_{\text{Alk H, R}}$, $C_{\text{Alk-O}}$, $C_{\text{-COO-H, R}}$). The use of different extractors showed no structural differences between the fractions in any of the sources used. However, FTIR spectra have shown that there may be structural rearrangements of functional groups. The AF-Vc fractions were the most affected, while the AH was observed a clear differentiation between the type of strator used. The techniques of chemical and structural characterization applied to SH and its humic fractions, humic acids and fulvic acids, together with the chemometric analyzes allowed to know the differences between the origin and the effects of the extractors.

Keywords: Matter Organic. Spectroscopy. Quimiometric.

3.3. INTRODUÇÃO

A grande abundância e distribuição das substâncias húmicas (SH) nos ambientes terrestres e aquáticos, assim como sua presença majoritária (60-90%) na matéria orgânica do solo como componente importante de diversas funções específicas (SWIFT, 1970; STEVENSON, 1994), tem gerado o interesse no estudo de suas características químicas e estruturais além de seus efeitos na atividade biológica das plantas.

As SH são resultado do processo de decomposição de uma grande diversidade de materiais, de origem orgânico vegetal e/ou animal, pela ação dos microrganismos em ambientes específicos, variedade de materiais orgânicos e pedoambientes exercem uma diferenciação significativa na constituição da matéria orgânica e distribuição das SH (BENITES et al., 2001).

A grande heterogeneidade das SH não tem permitido a definição de um modelo estrutural único, embora tenham sido propostos vários modelos (BRUCCOLERI et al., 2001). Porém é conhecido que as SH têm abundância de grupos funcionais carbonílicos, carboxílicos, fenólicos e aminos, entre outros (STEVENSON, 1994) as quais tem influência nas propriedades químicas, físicas e biológicas das águas, solos, sedimentos (CUNHA et al., 2000) e materiais compostados.

Ante a grande diversidade e complexidade estrutural das SH, existe a necessidade de um melhor entendimento de suas funções nos sistemas agrícolas e no ciclo global do carbono (BAYER et al., 2002), têm sido desenvolvidas várias técnicas analíticas químicas e espectroscópicas destacando-se a análises elementar, a ressonância magnética nuclear de carbono (^{13}C -RMN), a pirólise acoplada a cromatografia gasosa e espectrometria de massa (Py-GC/MS), a espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), ultravioleta visível (UV-Vis) entre outras (NOVOTNY, 2004; PRIMO et al., 2011; PEÑA-MENDEZ et al., 2007), para caracterizar suas características químicas.

Neste sentido, existem vários estudos de caracterização de SH que utilizam conjuntamente várias técnicas de análise das diferenças estruturais das SH de diversos tipos de solos e materiais orgânicos. Técnicas que podem ser consideradas como uma ferramenta importante para avaliar o papel das SH nos processos agrícolas e meio ambientais (MARTINEZ-BALMORI et al., 2014).

A matéria orgânica de pedoambientes distintos tem diferenças significativas em sua constituição e na distribuição das SH (BENITES et al., 2001). O uso de várias técnicas de caracterização química e espectroscópica como análises elementar e ^{13}C -RMN tem permitido observar a existência de uma relação entre os atributos químicos dos AH de vários solos e sua gênese (DOBBSS et al., 2009), além de um melhor entendimento de como afetam os processos de humificação, a qualidade da matéria orgânica de materiais compostados.

O trabalho tem como objetivos:

- Caracterizar as SH e suas frações, os AH e AF, extraídas de dois solos e um vermicomposto utilizando técnicas químicas e espectroscópicas; e
- Avaliar a influência de dois extratores diferentes, ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (aq) e NaOH (aq)) nas características estruturais das frações ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF).

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Localização da área para coleta de amostras de solos e vermicomposto

As substâncias húmicas foram extraídas do horizonte superficial (0-20 cm) de dois solos com orogêneses diferentes, e de um vermicomposto de esterco bovino. O solo classificado como Organossolo (SIBCS, 2013) ou Histosol (FAO/WRB, 2006; USDA, 2010), está localizado no bairro de Santa Cruz, pertencente a cidade do Rio de Janeiro na margem da BR 101 (SANTOS et al., 2013). O Organossolo, desde os anos 1980, vem sendo explorado para fins agrícolas e, atualmente, encontra-se sob cultivo de mandioca (*Manihot esculenta crantz*). A área apresenta um relevo plano com forte influência do lençol freático o qual é drenado para possibilitar seu uso agrícola (Figura 2).

O outro solo utilizado é classificado como Andisol (USDA, 2010) ou Andosols (FAO/WRB, 2006) e se origina a partir de cinzas vulcânicas e volcanoclásticas, sob relevo montanhoso (20% declive), situado na região interandina da província de Bolívar-Ecuador. A área de aproximadamente um hectare onde foi coletado o Andisols, encontra-se sob uso agrícola em sistema de rotação de culturas e curvas de nível de cultivos de milho (*Zea mays* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.) e batata (*Solanum tuberosum*) (Figura 2).

O vermicomposto (Vc) utilizado é produzido a partir de esterco bovino, proveniente de vacas leiteiras e processado por minhocas vermelhas africanas (*Eudrilus eugeniae*) durante 70 dias, no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) -Fazendinha Agroecológica da Embrapa Agrobiologia, localizado no Município de Seropédica, Rio de Janeiro (Figura 4C).



Figura 2. Sítios de amostragem. A) Organossolo B) Andisol C) Vermicomposto.

As amostras de solos foram coletadas em zigue-zague de forma a percorrer toda a área ao acaso, foram recolhidas porções de solo de 12 a 20 locais diferentes, numa profundidade de 0-20 cm. O solo coletado de cada um desses locais (sub-amostras) foi colocado em recipiente limpo e misturado e a partir desta retirada uma amostra de 500 gramas. Essa amostra composta representa a área homogênea em estudo. As amostras de vermicomposto humificado foram peneiradas para a retirada das minhocas e deixado secar à sombra. Na Tabela 4 (Anexo A), são apresentadas as características químicas dos solos e vermicomposto em estudo.

Tabela 4. Características dos materiais de três origens diferentes utilizados para extração e fracionamento de substâncias húmicas (SH).

Amostra	País	Localização	pH	CTC cmol Kg ⁻¹	C ¹	N ²
			H ₂ O		g Kg ⁻¹	
Organossolo	Brasil	Santa Cruz, RJ	4,9	20,1	85,3	4,2
Andisol	Equador	Guaranda, Bolívar	5,8	12,6	57,4	2,4
Vermicomposto	Brasil	Seropédica, RJ - SIPA*	7,1	44,9	108,1	16

* Sistema Integrado de produção Agroecológica. ¹ Carbono Orgânico Total; ² Nitrogênio Total.

3.4.2. Extração, isolamento e purificação das substâncias húmicas

As substâncias húmicas e suas frações (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) foram obtidas usando dois extratores diferentes, hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol. L⁻¹) e Pirofosfato de sódio (Na₄P₂O₇ 0,1 mol. L⁻¹). Para a extração das substâncias húmicas com ambos os extratores, uma quantidade de cada extrator, por separado, foi adicionado aos solos ou ao vermicomposto em atmosfera inerte de N₂ em razão de 10:1 (v:m). No caso da extração a partir dos solos, foi necessário um tratamento prévio com HCl (0,1 mol. L⁻¹) e posteriormente neutralizado (pH≅7) com NaOH (0,1 mol. L⁻¹). A mistura extrator-solo/vermicomposto foi agitada durante 8 horas e posteriormente deixada para repouso durante a noite, posteriormente o sobrenadante foi coletado mediante centrifugação (5000 rpm) e posterior filtração (este procedimento foi repetido três vezes) para obter as frações húmicas e fúlvicas em dissolução segundo metodologia da IHSS.

Para a obtenção dos ácidos húmicos, à dissolução anterior lhe foi adicionada HCl (6 mol. L⁻¹) até valor de pH aproximadamente 1,5 e em seguida deixado em repouso durante 16 horas. Os ácidos húmicos (floculados) foram separados mediante centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos.

Os ácidos húmicos foram purificados mediante redissolução em KOH (0,1 mol. L⁻¹) em atmosfera de N₂ e, posteriormente, uma solução de KCl (0,3 M K⁺) foi adicionada com o objetivo de remover os sólidos em suspensão mediante centrifugação (5 minutos). Posteriormente os ácidos húmicos foram precipitados com HCl (6 mol. L⁻¹) até pH≅1,5 e deixado em repouso durante 16 horas, posteriormente centrifugados (5000 rpm) e o sobrenadante descartado. Posteriormente os ácidos húmicos são tratados com uma mistura de HCl:HF, 0,1:0,1 M e agitado durante a noite a temperatura ambiente, este procedimento foi repetido até que o conteúdo de cinza chegue a 1%. O precipitado é transferido para uma membrana de diálise (Spectra/Por® 7 dialysis tubing, MWCO 1000) contra água destilada até teste negativo da água para íons Cl⁻ com AgNO₃, posteriormente os ácidos húmicos foram liofilizados.

Os ácidos fúlvicos foram purificados mediante fixação em resina, resumidamente, a dissolução que contém os ácidos fúlvicos (pH≅2) foi carregada em uma resina Supelite™ DAX-8, Cod. 21567-U (substituto comercial da Sigma para XAD-8). Posteriormente os ácidos fúlvicos retidos são eluídos fazendo passar através desta uma dissolução de NaOH (0,1 mol. L⁻¹) e em seguida água destilada para total recuperação. A dissolução de ácidos fúlvicos foi tratada fazendo-a passar através de uma coluna com uma resina fortemente ácidas (Amberlite IR120 hydrogen form, Fluka analytical Cod. 06428) e então liofilizados.

As substâncias húmicas foram obtidas pela extração com NaOH (0,1 M) como extrator aos solos e ao vermicomposto em atmosfera de N₂ a uma proporção 10:1 (m:v) nas mesmas condições descritas anteriormente. As substâncias húmicas forma colocadas em membrana de diálise (Spectra/Por® 7 dialysis tubing, MWCO 1000) contra água destilada até teste negativo da água para íons Cl⁻ com AgNO₃. Posteriormente as substâncias húmicas foram tratadas

fazendo-as passar através de uma coluna com uma resina fortemente ácidas (Amberlite IR120 hydrogen form, Fluka analytical Cod. 06428) e então liofilizados.

3.4.3. Caracterização química e espectroscópica das substâncias húmicas extraídas de três origens diferentes e suas frações

a) Composição elementar e relação E₄/E₆

A composição elementar foi realizada utilizando um analisador elementar Perkin Elmer 2400 CHN. As análises foram realizadas utilizando-se 1,1 ± 0,1 mg de amostras pesadas em micro balança acoplada ao aparelho. Os padrões de referência usados foram a acetanilide (C: 71,09%; H: 6,71%; N: 10,36%). O aparelho foi calibrado diariamente e as leituras das amostras alternadas por leituras de branco, na razão de um branco para cada cinco amostras. O teor de oxigênio foi determinado por subtração segundo a equação: %O = {100% - (%C + %H + %N)}. Do mesmo modo foram calculadas as razões molares atômicas: H/C = {(%C/12) / (%H/1)}; C/N = {(%C/12) / (%N/14)}; O/C = {(%O/16) / (%C/12)} e O/H = {(%O/16) / (%H/1)}.

A relação E₄/E₆ foi obtida a partir da leitura das absorvâncias a 465 e 665 nm em na faixa do UV-vis em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 UV-vis.

b) Ressonância magnética nuclear (CP MAS ¹³C-RMN)

A espectroscopia de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico CP MAS ¹³C-RMN foi realizada no aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ¹³C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, as amostras dos materiais humificados foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de dióxido de zircônio (ZrO₂) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8 ± 1 kHz. Os espectros são obtidos pela coleta de 2048 data points para igual número de scans a um tempo de aquisição de 34 ms e com recycle delay de 5 s. O tempo de contato para a sequência em rampa de ¹H ramp é de 2 ms. A coleta e elaboração espectral foi realizada utilizando o Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (FID) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz.

As quantidades relativas dos tipos de carbono foram obtidas mediante a integração das regiões espectrais como segue: C-alquil (CA_{lq}-H,R): 0–46 ppm; C-metoxila e N-alquil (CA_{lq}-O, N): 46–59 ppm; O-alquil-C (CA_{lq}-O): 59–91 ppm; C di-O-alquil (anomérico; C-alquil-di-O): 91–110 ppm; C aromático (CA_r-H, R): 110–142 ppm; C-O, N-aromático (CA_r-O, N): 142–156 ppm; C-carboxilas (CCOO-H, R): 156–186 ppm; e C-carbonilas (CC=O): 186–230 ppm (Song *et al.*, 2008; De la Rosa *et al.*, 2011). A aromaticidade e alifaticidade foram calculadas de acordo com Song *et al.* (2008); aromaticidade=[(C_{Ar-H,R}+C_{Ar-O,N})/(area total)]x100, e alifaticidade=(100-aromaticidade).

Foram calculados os índices de hidrofobicidade HB/HI segundo o proposto por Piccolo *et al.*, (2004), quem relaciona a concentração de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na área abaixo da curva do espectro ¹³C RMN da seguinte forma:

$$HB/HI = \frac{[(0 - 50 \text{ ppm}) + (110 - 60 \text{ ppm})]}{[(50 - 100 \text{ ppm}) + (160 - 200 \text{ ppm})]}$$

c) Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR das substâncias húmicas (SH, AH, AF) foram obtidos na faixa de 4.000 - 400 cm^{-1} , utilizando um espectrômetro de infravermelho VERTEX 70 FTIR Series Spectrometer Bruker, as amostras foram preparadas em pastilhas de KBr 200 mg/ 5mg de substâncias húmicas e suas frações (SH, AH, AF). Os espectros foram analisados utilizando o programa ACD 6.0. A partir dos espectros foram obtidos os seguintes índices: IA (aromaticidade): $\text{C}=\text{C}/\text{C}-\text{H} = 1620-1600 \text{ cm}^{-1} / 2940-2900 \text{ cm}^{-1}$ (CHEFETZ et al., 1996); IR1 (reatividade): $\text{NH}_2/\text{COOH} = 1720-1700 \text{ cm}^{-1} / 1660-1630 \text{ cm}^{-1}$; IR2 (reatividade): $\text{NH}_2/\text{COOH} = 1720-1700 \text{ cm}^{-1} / 1545-1505 \text{ cm}^{-1}$; IAM1 (amida I): $\text{NH}_2/\text{C}-\text{H} = 1660-1630 \text{ cm}^{-1} / 2940-2900 \text{ cm}^{-1}$ (INBAR et al., 1989); IAM2 (amida II): $\text{NH}_2/\text{C}-\text{H} = 1545-1505 \text{ cm}^{-1} / 2940-2900 \text{ cm}^{-1}$.

3.4.4. Quimiometria e análises estatísticas dos dados espectrais

As análises de componentes principais (PCA) foram realizadas com o objetivo de identificar as diferenças ou semelhanças entre as amostras “scores” e quais variáveis “loadings” contribuem em maior peso. Assim, esta análise permite a detecção de padrões de agrupamento entre as amostras. As análises quimiométricas de componentes principais (PCA) envolvendo os dados espectrais de CP MAS ^{13}C -RMN e FTIR de todas as frações húmicas foram realizadas utilizando o programa Unscrambler® X 10.4 package (Camo Software AS Inc., Oslo, Norway). Os espectros ^{13}C -NMR e FTIR das frações húmicas foram carregados a partir do software e normalizados segundo a normalização por área (área normalization). A faixa selecionada para conformar as matrizes de dados espectrais ^{13}C -NMR foi desde -20 ppm até 240 ppm, os valores desta faixa foram descartados para evitar falsas contribuições nas análises. As análises PCA de cada fração húmica foi realizada utilizando o algoritmo NIPALS, método de validação CROSS VALIDATION para o número máximo de componentes. Para as análises PCA FTIR, foi selecionada uma faixa entre 400 cm^{-1} e 3800 cm^{-1} . Foram utilizadas as mesmas condições de análises que as utilizadas para ^{13}C -NMR.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Composição elementar e relação E₄/E₆ das substâncias húmicas íntegras e suas frações (SH, AH, AF)

A composição elementar e as relações atômicas das substâncias húmicas e suas frações são apresentadas na Tabela 5. Os teores de C encontram-se abaixo dos intervalos reportados por Calderoni e Schnitzer (1984) e pela ISHS. Em geral, os teores de C mais altos foram detectados nas substâncias húmicas íntegras (SH) e frações (AH e AF) isoladas de solos, apresentando os conteúdos mais elevados as SH com valores de 48,58 e 57,50% para as SH de Andisol e Organossolo, respectivamente. Os AH e AF apresentaram porcentagens de C menores às SH similares entre si com porcentagens de 40,74 e 43,72% para os AH e de 29,09 e 35,54% para os AF.

Os conteúdos de C das três amostras de ácidos húmicos foram menores que os reportados para outros solos similares e vermicompostos. No caso de outros Organossolos do Brasil, EBELING et al., (2011) reportou valores médios de C em AH de 48,9%. As porcentagens de C apresentadas nos AH de Andisol (40,74% C) foram menores que os obtidos em Andisols da Itália (52,6% C) (BAGLIERI et al., 2012), e no Japão (56,7% C) (YONEBAYASHI e HATTORI, 1988). Os valores de C em AH de Vermicomposto de esterco bovino reportados por Aguiar et al. (2010), foram de 48,62% C e de 51% segundo trabalhos de García et al.(2013), valores que comparados com os obtidos de 42,18 % podem ser considerados baixos (Tabela 5).

Tabela 5. Composição elementar de substâncias húmicas (SH), ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos obtidos de um Andisol, Organossolo e um Vermicomposto utilizando dois extratores.

SH	C(%)	H(%)	N(%)	O(%)	C/N	H/C	O/C	E ₄ /E ₆
Substâncias húmicas								
SH-Org	57,50	6,31	3,69	32,50	19,48	1,32	0,42	2,31
SH-And	48,58	6,24	3,69	41,49	16,46	1,54	0,64	2,12
SH-Vc	42,68	6,88	3,08	47,36	17,32	1,93	0,83	7,54
Ácidos húmicos*								
AH-Org ⁽¹⁾	43,72	4,38	3,62	48,29	15,10	1,20	0,83	2,72
AH-Org ⁽²⁾	44,88	4,45	3,63	47,04	15,46	1,19	0,79	2,71
AH-And ⁽¹⁾	40,74	4,55	3,35	51,36	15,20	1,34	0,95	3,50
AH-And ⁽²⁾	45,24	4,86	3,18	46,72	17,78	1,29	0,77	3,48
AH-Vc ⁽¹⁾	42,18	4,57	3,99	49,26	13,22	1,30	0,88	4,85
AH-Vc ⁽²⁾	43,03	3,85	3,10	50,02	17,35	1,07	0,87	4,98
Ácidos húmicos*								
AF-Org ⁽¹⁾	35,54	5,95	2,75	55,76	16,15	2,01	1,57	14,17
AF-Org ⁽²⁾	33,57	5,89	2,76	57,78	15,20	2,11	1,72	14,55
AF-And ⁽¹⁾	31,05	5,89	2,11	60,95	18,40	2,28	1,96	10,84
AF-And ⁽²⁾	29,79	5,73	2,97	61,51	12,54	2,31	2,06	11,63
AF-Vc ⁽¹⁾	29,09	5,45	2,30	63,16	15,81	2,25	2,17	10,53
AF-Vc ⁽²⁾	25,09	5,51	2,17	67,23	14,45	2,63	2,68	10,03

*Tipo de extrator utilizado: ¹NaOH ²Na₄P₂O₇.

As porcentagens de N foram maiores nas SH e AH em relação aos AF. As SH de Andisol e Organossolo apresentaram maior conteúdo deste elemento. Os maiores conteúdos de N nas SH e SH de Andisol e Organossolo podem estar relacionados com a presença de grandes quantidades de carboidratos resistentes à degradação microbiana (KUMADA, et al., 1972). O teor elevado de C e baixo de N nos extratos resulta em uma alta relação C/N para as SH das três origens. Os valores médios da relação C/N foram de 18 para as SH e AF e 15 para os AH, valores que podem ser considerados como elevados ao estar entre a faixa de 10-20 (CHAI et al., 2007).

A relação H/C é reportada como inversamente proporcional ao grau de aromaticidade por Fujitake e Kawagashi. (1999). As relações H/C maiores que 1, evidenciam baixos níveis de condensação aromática (CHAI et al., 2007). Ao analisar os valores obtidos pode-se observar que todos são superiores a 1 e tem pouca diferença entre a origem das SH e entre as frações, embora a diferença entre as fontes seja mínima existe um maior valor H/C nas SH e frações isoladas de Andisol e Vermicomposto o que poderia estar relacionado com uma maior presença de estruturas não humificadas, relacionadas com um baixo grau de condensação aromática segundo Chai et al., (2007), e maior contribuição de componentes alifáticos (STEELINK, 1985; CANELLAS et al., 2005). Pelo que é possível inferir que as SH e frações (AH e AF) isoladas de solos apresentam maior aromaticidade que as de Vermicomposto.

Os valores da relação E_4/E_6 variou entre a origem dos extratos e suas frações (Tabela 5). Há uma diminuição das razões E_4/E_6 dos AH com relação aos AF em todas os extratos em estudo e os valores encontram-se dentro dos intervalos propostos por Schitzer e Kodama, (1991) onde valores maiores a 5 são para AF e menores para AH, a diminuição da razão estaria relacionada com o aumento do peso molecular e aromaticidade pelo que os valores da relação E_4/E_6 são inversos ao grau de aromaticidade dos AH (STEVENSON, 1971; NÈGRE et al., 2002). Nas SH íntegras e AH isolados de Andisol e Organossolo os valores da razão E_4/E_6 foram menores que as isoladas de Vermicomposto. Os baixos valores das razões E_4/E_6 nas SH e AH isolados de solos poderia ser relacionado com uma maior humificação e predominância de compostos aromáticos condensados.

O valor da razão E_4/E_6 dos AH do Andisol (3,50) encontra-se abaixo das faixas reportadas para diferentes tipos de Andisol na Colômbia, com valores de 4,12-6,91 (JARAMILLO, 2011; MONTOYA et al., 2012). Baixos valores E_4/E_6 de AH de Andisol têm sido reportados em solos Andicos do Japão e são característicos de maior grau de condensação em comparação com solos de origem não Andico (TSUTSUKI e KUWATSUKA et al., 1978; YONEBAYASHI E HATTORI, 1988).

Os AH isolados de Organossolo apresentaram razões E_4/E_6 de AH de 2,72, valor que está abaixo das faixas reportadas por Ebeling et al. (2011), para vários Organossolos no Brasil, com valores que flutuam entre 3,38-7,32. Baixos valores das razões E_4/E_6 têm sido relacionados por Guareschi (2013) com avançados estágios de degradação de solos do bioma Cerrado.

Os elevados valores das razões E_4/E_6 de SH e frações isoladas de vermicomposto encontram-se na faixa relatada por diferentes autores na literatura, onde são reportados valores E_4/E_6 entre 4,7-5,1 para AH de diferentes vermicompostos (ROMERO et al, 2007; GARCIA, 2013) e razões ainda mais elevadas têm sido reportadas para substratos orgânicos com médias E_4/E_6 de 7,9 para AH e maiores que 15 para AF (SILVA et al, 2014). Valores que refletem a existência de moléculas menos complexas e mais alifáticas nas SH procedentes de vermicompostos.

A Figura 3 mostra o diagrama de Van Krevelen para substâncias húmicas. Este diagrama fornece informações sobre alguns processos químicos que representam transformações da matéria orgânica (desidrogenação, carboxilação, condensação aromática, etc.). Assim é possível observar que existe uma homogeneidade entre as características

estruturais de cada substância húmica que geram o tipo de potencial na transformação química, independente do tipo de extrator utilizado. Os ácidos fúlvicos mostram uma posição que representa maior alifaticidade e oxigenação das estruturas. Por outro lado, os ácidos húmicos apresentam características mais aromáticas e menos funcionalizadas. As substâncias húmicas íntegras ocupam uma posição que intermeia entre os AF e AH.

Estes resultados reafirmam as diferenças estruturais entre as frações húmicas e fúlvicas, quando fracionadas estas substâncias a partir da sua estrutura íntegra, e este comportamento independe do tipo de extrator utilizado. Este diagrama tem sido utilizado por outros estudos com substâncias húmicas onde foi possível agrupar os AH e AF em função de suas características (COELHO et al., 2013; YONEBASHI e HATTORI, 1988).

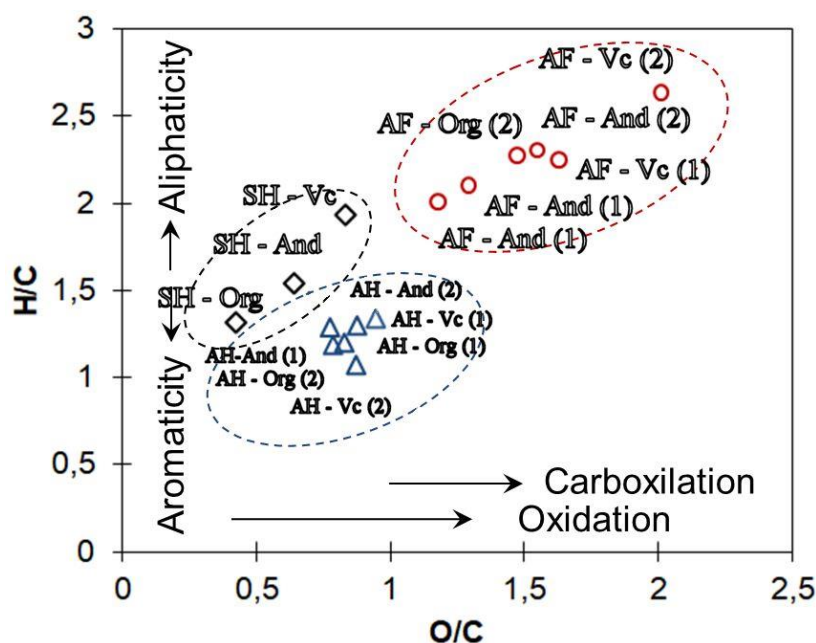


Figura 3. Diagrama de Van Krevelen para substâncias húmicas, ácidos húmicos e ácidos fúlvicos extraídos de origens diferentes e utilizando dois extractores: (1) NaOH e (2) Na₄P₂O₇.

3.5.2. Espectroscopia de ressonância magnética das substâncias húmicas íntegras e suas frações (AH e AF)

Os resultados da integração de CP-MAS ¹³C-RMN das SH e suas frações e o método de fracionamento são apresentadas na Figura 6, e o espectro ¹³C-RMN na Figura 4. Os espectros indicam diferenças na intensidade dos picos relacionados com sua origem. Mas não foram observadas mudanças visuais importantes nos picos mais característicos em relação ao tipo de extrator utilizado, quando isolados os AH e AF a partir da mesma origem (Figura 4.).

Os espectros das SH das três origens apresentaram picos de maior intensidade em torno de 67 ppm (C_{-Alq-O}), 160 ppm (C_{-Ar O, N}) e 172 ppm (C_{-COO-H, R}) (Figura 6), em alguns casos os picos variam levemente de posição. A presença de picos bem definidos em torno de 29 ppm para as SH de Andisol poderia ser explicado pela existência de carbonos em CH₂ e grupos terminais CH₃, de componentes lipídicos de plantas como biopoliésteres alifáticos (SONG et al, 2011; AGUIAR et al., 2013) que poderiam ser uma contribuição dos aminoácidos e peptídeos.

As bandas entre 110 e 160 ppm correspondentes a carbonos aromáticos e fenólicos, especialmente aos carbonos aromáticos e olefinicos segundo Wooten. (1995), observam-se intensas nas três SH em especialmente na banda de 160 ppm, os picos em 130, 126 e 125 ppm variam em intensidade com a origem das SH, os picos em 130 indicam a existência de anéis de carbono contendo um forte doador de elétrons como oxigênio ou nitrogênio (AL-FAIYZ., 2012). Os picos em 125 ppm são um indicador da substituição de carbono alquil aromático por N ou O.

No caso dos espectros da fração AH isolados dos solos e vermicomposto, os picos mais predominantes foram observados em 33, 72, 102, 130 e 173 ppm para os três AH. Observou-se a presença de picos bem definidos e intensos nos AH de solos em torno de 72, 130 e 172 ppm, os AH-Org apresentaram picos mais intensos em 56 e 153 ppm, no espectro de AH-Vc foi possível observar picos menos intensos.

Os AF isolados de três fontes apresentaram espectros com intensidades bem definidas em torno de 26 ppm 125 e 170 ppm. Observou-se uma similaridade na intensidade dos espectros de AF de Andisol e Vermicomposto nas áreas de 26, 48, 68, 98 e 169 ppm. Os AF de Organossolo apresentaram picos intensos em 38, 72 131 e 177 ppm.

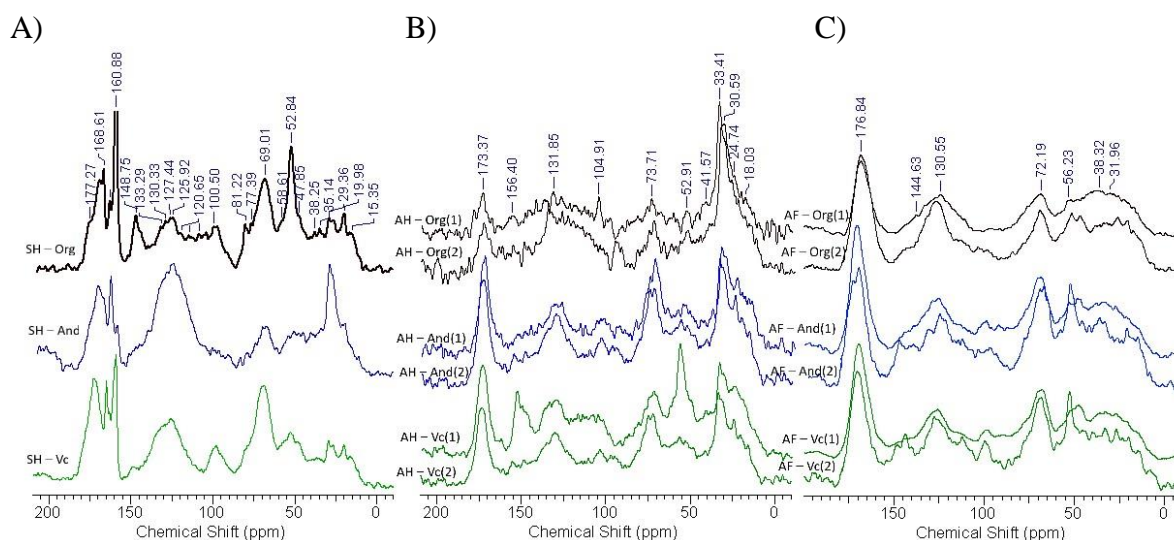


Figura 4. Espectros CP-MAS ^{13}C RMN das: A) Substâncias húmicas (SH); B) Ácidos húmicos (AH) e C) Ácidos Fúlvicos (AF) de um Organossolo (Org), Andisol (And) e Vermicomposto (Vc) nos espectros preto, azul e verde, respectivamente.

As intensidades e porcentagens de aromaticidade de cada região calculada com os espectros das SH e suas frações AH e AF são apresentadas na Tabela 6 e indicam uma grande variabilidade de estruturas, com predomínio de grupos carboxílicos. As SH-Org tem predominância de estruturas alifáticas do tipo $\text{C}_{\text{Alk H, R}}$ (17,31%), $\text{C}_{\text{Alk-O}}$ (18,27%), e grupos carboxílicos (C-COO-H, R) (23,08%), e de maneira similar as SH-Vc com porcentagens de $\text{C}_{\text{Alk H, R}}$, $\text{C}_{\text{Alk-O}}$ e C-COO-H, R de 14, 20 e 24%, respectivamente. Por outro lado, as SH-And tem maior porcentagem de estruturas $\text{C}_{\text{Ar, H, R}}$ (28,57%), seguidos por $\text{C}_{\text{Alk H, R}}$ (19,39%) e grupos carboxílicos C-COO-H, R (16,33%) e carboxil CC=O (7,14%).

Fazendo uma análise da distribuição das porcentagens de C das frações AH e AF temos que as AH-Org apresentaram uma maior porcentagem de $\text{C}_{\text{Alk H, R}}$, e $\text{C}_{\text{Ar-H, R}}$ com valores de 38,04 e 18,48%. Os AH de AH-And e AH-Vc exibiram uma maior predominância de estruturas $\text{C}_{\text{Alk H, R}}$ (29,7 e 25,0%), $\text{C}_{\text{Alk-O}}$ (20,7 e 16,0%), $\text{C}_{\text{Ar-H, R}}$ (14,85 e 16,0%) e C-COO-H ,

r (11,88 e 12,0%), respectivamente. Nos AF das três origens verificaram-se as porcentagens mais altas nos C do tipo $C_{Alk-H,R}$, C_{Alk-O} , $C_{Ar-H,R}$ e $C_{-COO-H,R}$ com valores que oscilaram entre 19-23%, 17-19%, 16% e 17-20% na ordem respectiva.

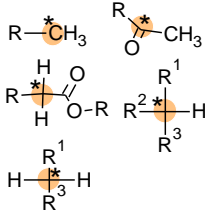
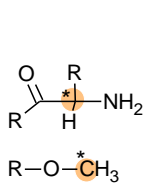
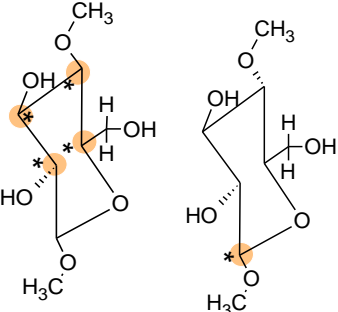
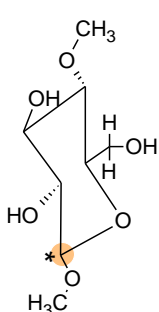
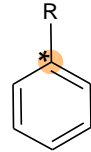
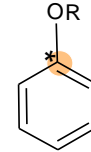
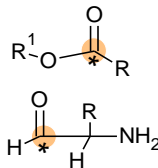
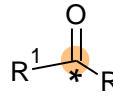
Na base da distribuição apresentada e os valores de alifaticidade e aromaticidade pode-se inferir que as SH de Andisol (SH-And) tiveram uma maior aromaticidade (34,69%) em relação às SH-Org (19,23%) e SH-Vc (23,00%), onde predominaram as estruturas alifáticas. Comportamento que não foi observado para as frações AH e AF onde existiu uma maior alifaticidade para todas as frações das três origens em estudo.

O índice de Hidrofobicidade (HB/HI) das SH foi maior que 1, valor considerado alto (PICCOLO et al, 2006). As moléculas das SH-And (2,15) apresentam um caráter mais hidrofóbico que as SH-Org (1,38). A alta hidrofobicidade das SH-And tem relação com altos valores (HB/HI) reportados para Andisols italianos (CONTE et al., 2006).

A maior aromaticidade das SH-And tem sido relacionada com a maior presença de grupos funcionais carboxil e metoxyl procedentes da lignina pobremente degradada (CONTE et al., 2003), lignina aportada pela presença de plantas carbonizadas pelos subsequentes depósitos de material Vulcano clástico e as características próprias do epideon melânico deste solos (GOLCHIN et al., 1994; SHINDO et al., 1986).

Entretanto o predomínio de estruturas alifáticas $C_{Alq-H,R}$ e C_{Alq-O} nas SH-Org poderia indicar a presença de substâncias em estado inicial de humificação (García., 2013) e estar relacionadas com a presença de material compostado com pouca maturidade segundo Spaccini e Piccolo, 2007. Não foram registradas mudanças importantes na quantidade de estruturas provocada pela utilização dos diferentes extratores. Porém, foi observado que a utilização do $Na_4P_2O_7(aq)$ como extrator provocou um leve aumento da aromaticidade dos AH obtidos a partir das três fontes de origem, exceto para AH-And.

Tabela 1. Distribuição de carbono (%) em espectros ^{13}C NMR de substâncias húmicas (SH) e suas frações, ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) obtidas com dois extratores diferentes de um Andisol, Organossolo e Vermicomposto.

Tipo de carbono	0-46	46-59	59-91	91-110	110-142	142-156	156-186	186-230	Alif	Arom
	$\text{C}_{\text{Alk-H,R}}$	$\text{C}_{\text{Alk-O,N}}$	$\text{C}_{\text{Alk-O}}$	$\text{C}_{\text{Alk-di-O}}$	$\text{C}_{\text{Ar-H,R}}$	$\text{C}_{\text{Ar-O}}$	$\text{C}_{\text{COO-H,R}}$	$\text{C}_{\text{C=O}}$		
Possíveis estruturas										
SH-Org	17,31	12,50	18,27	8,65	13,46	5,77	23,08	0,96	80,77	19,23
SH-And	19,39	7,14	9,18	6,12	28,57	6,12	16,33	7,14	65,31	34,69
SH-VC	14,00	9,00	20,00	6,00	19,00	4,00	24,00	4,00	77,00	23,00
AH-Org⁽¹⁾	38,04	6,52	11,96	6,52	18,48	6,52	7,61	4,35	75,00	25,00
AH-Org⁽²⁾	34,02	8,25	11,34	6,19	21,65	6,19	9,28	3,09	72,16	27,84
AH-And⁽¹⁾	29,70	8,91	20,79	6,93	14,85	4,95	11,88	1,98	80,20	19,80
AH-And⁽²⁾	28,57	9,18	19,39	9,18	14,29	5,10	12,24	2,04	80,61	19,39
AH-VC⁽¹⁾	25,00	12,00	16,00	7,00	16,00	9,00	12,00	3,00	75,00	25,00
AH-VC⁽²⁾	25,00	13,00	16,00	8,00	17,00	9,00	11,00	1,00	74,00	26,00
AF-Org⁽¹⁾	23,00	11,00	17,00	6,00	16,00	6,00	17,00	4,00	78,00	22,00
AF-Org⁽²⁾	23,00	10,00	15,00	6,00	20,00	5,00	19,00	2,00	75,00	25,00
AF-And⁽¹⁾	19,23	9,62	18,27	6,73	16,35	6,73	19,23	3,85	76,92	23,08
AF-And⁽²⁾	20,41	12,24	18,37	7,14	17,35	6,12	15,31	3,06	76,53	23,47
AF-VC⁽¹⁾	21,00	10,00	19,00	7,00	16,00	5,00	20,00	2,00	79,00	21,00
AF-VC⁽²⁾	19,00	11,00	16,00	8,00	18,00	9,00	15,00	4,00	73,00	27,00

Extrator utilizado: ⁽¹⁾ NaOH; ⁽²⁾ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$.

Para melhor entender a influência dos extratores e as frações nas características estruturais das SH, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) utilizando como matriz os espectros de CP MAS ^{13}C RMN (Figura 5). A análise de PCA reafirma um padrão de agrupamento para os ácidos húmicos a valores positivos da PC-1 (65%), independente da fonte de origem e do tipo de extrator. Este mesmo comportamento foi obtido para ácidos fúlvicos e para as substâncias húmicas onde, ambas as frações húmicas mostraram semelhanças a valores negativos da PC-1.

A PCA também mostrou que a fração de ácidos húmicos se diferencia das frações de ácidos fúlvicos e das substâncias húmicas devido, principalmente, à presença de estruturas $\text{C}_{\text{Alk-H,R}}$ e $\text{C}_{\text{Ar-H,R}}$ que lhe conferem propriedades mais hidrofóbicas e apolares. Por outro lado, a fração de ácidos fúlvicos é a mais semelhante às substâncias húmicas devido à presença de estruturas $\text{C}_{\text{Alk-O,N}}$, $\text{C}_{\text{Alk-O}}$ e $\text{C}_{\text{COO-H,R}}$ que lhe conferem propriedades mais hidrofílicas e polares.

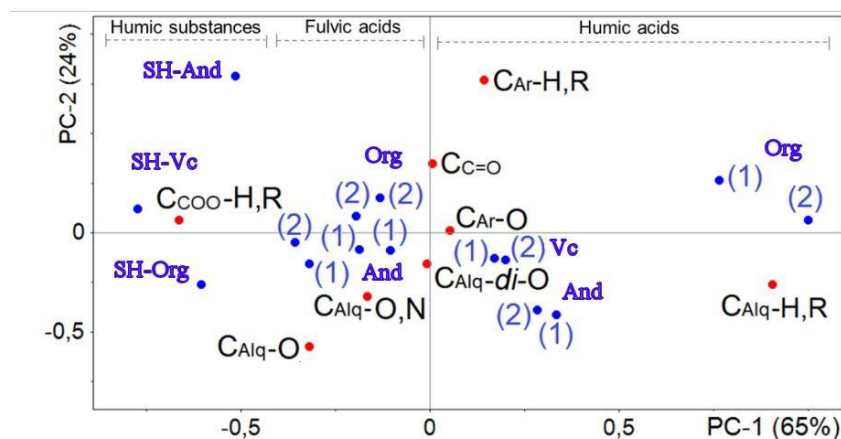


Figura 5. Análise de PCA realizado a partir do carregamento dos espectros puros CP MAS ^{13}C RMN das SH, AH e AF de um Andisol, Organossolo e Vermicomposto. (1) e (2) representam os extratores NaOH e $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ respetivamente.

Na Figura 6 apresenta-se a PCA (65% da variância total explicada) realizada a partir dos espectros puros de cada fração húmicas obtida. Este tipo de análise teve como objetivo fundamental extrair informações mais detalhadas sobre a utilização dos diferentes extratores na estrutura das frações húmicas.

A PCA na Figura 6A “scores” reafirma o discutido anteriormente e mostrando nos ácidos húmicos como as frações mais diferentes em termos estruturais. Na Figura 6B “loadings” se reafirmam as estruturas $\text{C}_{\text{Alk-O,N}}$, $\text{C}_{\text{Alk-O}}$, CCOO-H,R e CAr-H,R como as determinantes na diferenciação entre as frações. Novamente, foi mostrado que os extratores não exerceram efeitos intensos nas estruturas das frações húmicas.

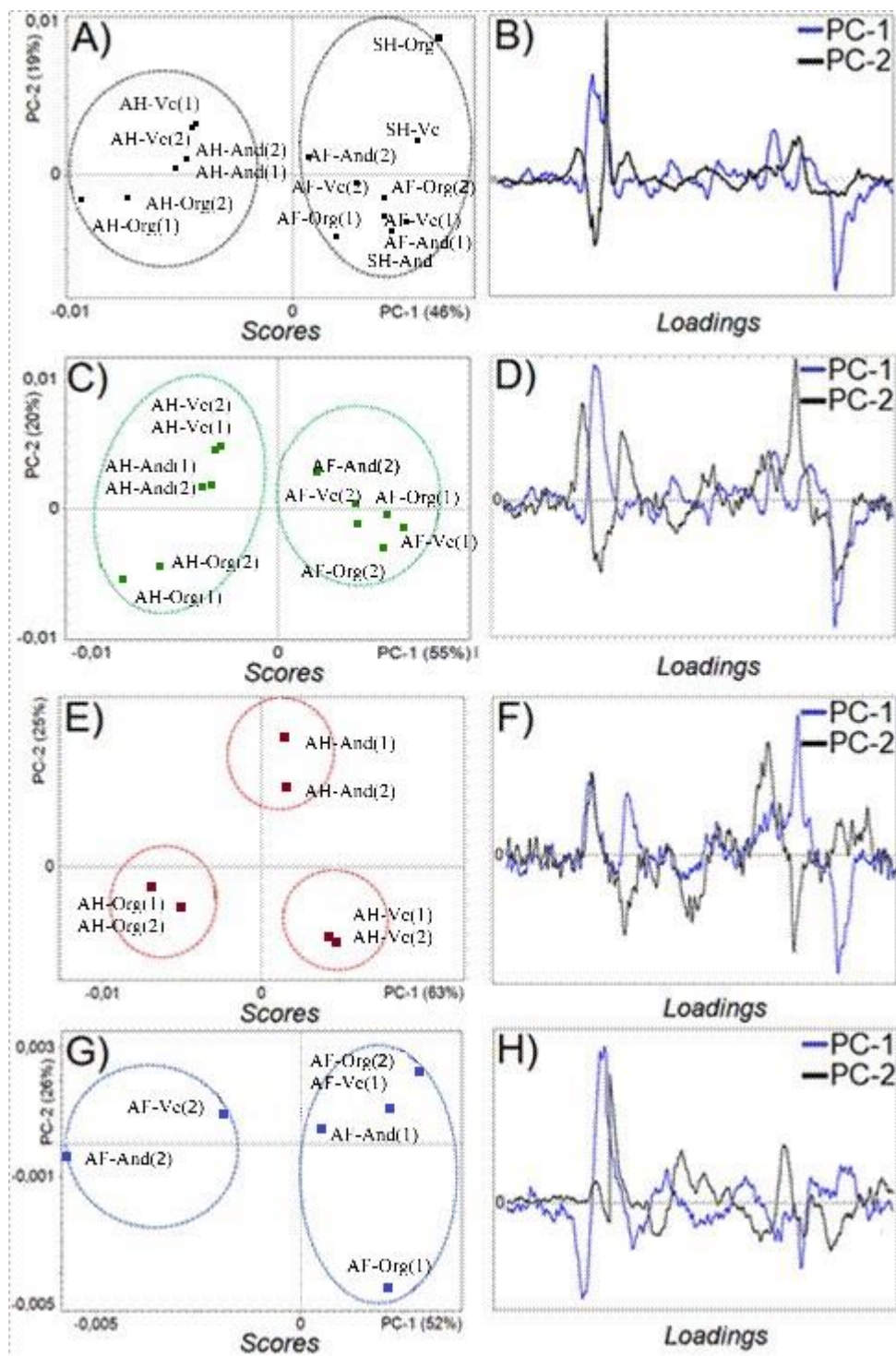


Figura 6. PCA realizada a partir dos dados espectrais puros ^{13}C NMR CP MAS mostrando os padrões de semelhanças entre as frações obtidas com os diferentes extratores. A) e B): Scores e loadings respectivamente obtidos para a PCA das três frações húmicas, C) e D): Scores e loadings respectivamente obtidos para a PCA das frações de ácidos húmicos e fúlvicos, E) e F): Scores e loadings respectivamente obtidos para a PCA das frações de ácidos húmicos e G) e H): Scores e loadings respectivamente obtidos para a PCA das frações de ácidos fúlvicos.

As Figura 6C e 8D mostram a PCA (75% da variância total explicada) para os ácidos húmicos e fúlvicos, os *scores* mostram uma clara diferenciação das frações na PC-1 (55%).

Da mesma forma análises mostram que não houve efeitos importantes nas estruturas das frações húmicas com o uso de diferentes extratores. Novamente se reafirma que as estruturas $C_{Alk-O,N}$, C_{Alk-O} , $C_{COO-H,R}$ e $C_{Ar-H,R}$ são determinantes na diferenciação entre as frações.

As Figura 6E e 8F mostram a PCA (88% da variância total explicada) para os ácidos húmicos. As três frações se mostraram diferenças de acordo com a origem, porém não houve diferenças entre as frações obtidas com os extratores distintos. Nesta figura, os loadings mostram que as estruturas C_{Alk-O} , $C_{COO-H,R}$ e C_{Ar-O} diferenciam os ácidos húmicos.

As Figura 6G e 8H mostram a PCA (78% da variância total explicada) para os ácidos fúlvicos. Estas frações mostraram a maior dispersão em seus padrões de semelhanças quando comparado com os ácidos húmicos e as substâncias húmicas. É possível entender que a utilização dos extratores ocasionou diferenças estruturais mais intensas nas frações fúlvicas.

3.5.3. FTIR das substâncias húmicas íntegras e suas frações (SH, AH, AF)

A espectroscopia na região do infravermelho fornece informações sobre a presença de grupamentos funcionais nas frações húmicas (Figura 7). Foi observado um padrão espectral diferente entre as frações de ácidos fúlvicos, substâncias húmicas e os ácidos húmicos. Este comportamento pode ser esperado tendo em conta as diferenças mostradas entre as frações no ^{13}C NMR.

Os ácidos fúlvicos e substâncias húmicas mostraram bandas de absorção mais resolvidas e intensas a 1569 cm^{-1} e 1572 cm^{-1} respetivamente que pertencem a vibrações de estiramento de ligações C=C aromático, vibrações de estiramentos assimétricos de carboxilato (COO-), desdobramento N-H de amida II. Já os ácidos húmicos apresentaram bandas visíveis de absorção entorno a 1710 cm^{-1} pertencentes a vibrações de estiramentos C=O fundamentalmente de grupo mento carboxilas (COOH) (ROSA et al., 2000; LOPES e FASCIO, 2004; SANCHES et al., 2007).

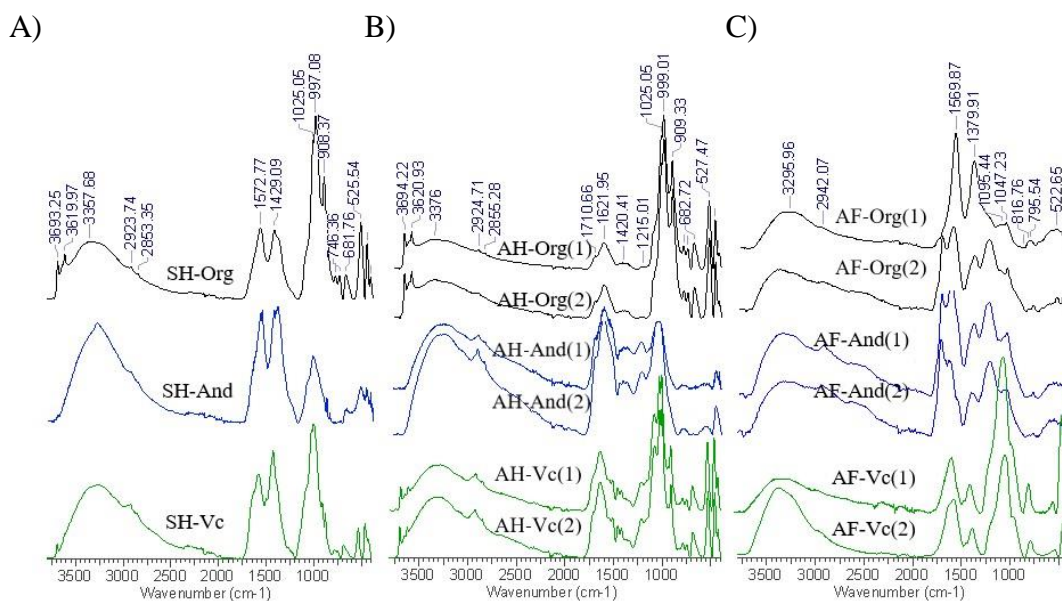


Figura 7. Espectros FTIR das: A) Substâncias húmicas (SH); B) Ácidos húmicos (AH) e C) Ácidos Fúlvicos (AF) de um Organossolo (Org), Andisol (And) e Vermicomposto (Vc) nos espectros preto, azul e verde respectivamente.

A Figura 8 mostra a PCA obtida a partir do carregamento dos espectros FTIR das frações húmicas. A PCA (89% da variância total explicada) realizada a partir do carregamento dos espectros FTIR dos ácidos fúlvicos (Figura 8A) mostra um padrão de agrupamento das frações de vermicomposto a valores positivos da PC-1 (73% da variância total explicada) e dos ácidos fúlvicos extraídos de solos a valores negativos da PC-1. Este comportamento não foi observado nas análises realizadas em ^{13}C NMR. Como a espectroscopia de infravermelho indica presença de grupamentos funcionais e a presença e forma destas bandas no espectro é também um reflexo de seu ambiente químico na molécula, é possível entender que os ácidos fúlvicos obtidos de vermicompostos são, embora compostos pelos mesmos fragmentos, diferentes em termos de disposição conformacional. A análise de PCA para estas frações mostrou uma variabilidade maior que aquela encontrada para as PCA feitas a partir do ^{13}C NMR. Isto pode significar que a presença de extratores diferentes pode influenciar uma reestruturação das supramoléculas, modificando a disposição dos grupamentos funcionais e seu ambiente químico.

Este entendimento foi confirmado, mais evidente, quando analisada a PCA realizada a partir dos carregamentos dos espectros FTIR dos ácidos húmicos (96% da variância total explicada) (Figura 8B). Os ácidos húmicos obtidos com o extrator (1):NaOH mostraram um padrão de agrupamento a valores positivos da PC-1 (89%) e aqueles obtidos com extrator (2): $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ se agruparam a valores negativos da PC-1.

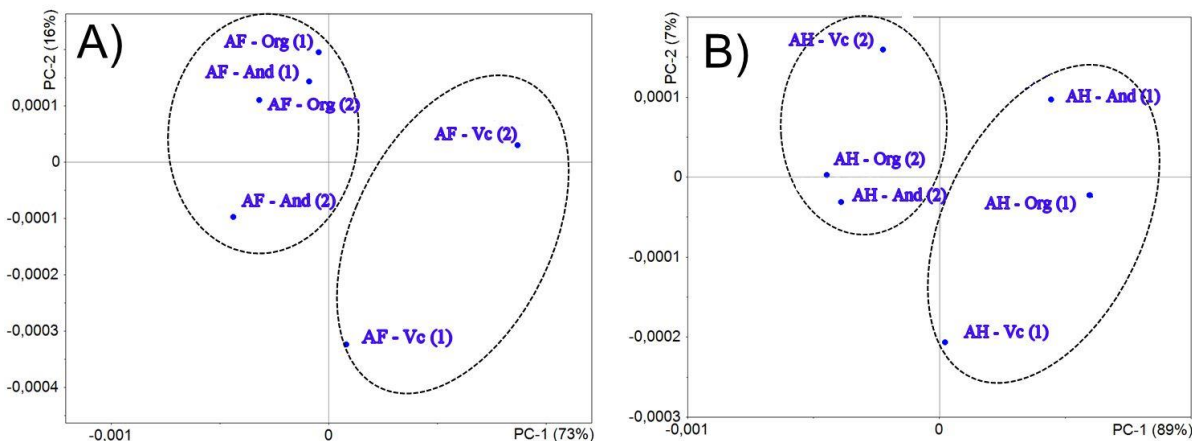


Figura 8. PCA realizada a partir dos dados espectrais puros FTIR mostrando os padrões de semelhanças entre as frações de ácido fúlvico (A) e ácidos húmicos (B) com os diferentes extratores.

3.6. CONCLUSÕES

As substâncias húmicas íntegras apresentaram claras diferenças dependendo de sua fonte de origem. No caso das substâncias húmicas extraídas de Andisol foi observada a predominância de estruturas aromáticas (34,69%) devido à presença de grupos $C_{Ar-H,R}$ e C_{Ar-O} . Entretanto as substâncias húmicas de Organossolo apresentaram maior alifaticidade (80,77%), e de maneira similar aconteceu com as substâncias húmicas de vermicomposto (77,0%).

O fracionamento químico realizado com ambos extratores mostrou ácidos fúlvicos com características mais lábeis, polares e hidrofílicas do que as características dos ácidos húmicos que apresentaram maior presença de estruturas aromáticas que lhe conferem propriedades mais hidrofóbicas e apolares.

O uso de extratores distintos não mostrou diferenças marcantes entre as frações em termos de presença estrutural em nenhuma das três fontes de origem estudada. No entanto, a espectroscopia FTIR mostrou que pode haver reorganizações estruturais dos grupamentos funcionais quando utilizados os extratores indistintamente. Nas frações de ácidos fúlvicos, os extraídos a partir de vermicomposto parecem ser os mais afetados enquanto que nas frações húmicas há uma diferenciação clara entre os tipos de extratores.

4. CAPÍTULO II

EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NOS PARÂMETROS GERMINATIVOS, CRESCIMENTO INICIAL E NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSESE SALINO EM PLANTAS DE MILHO

4.1. RESUMO

O presente capítulo teve como objetivo: i) Comparar os efeitos das substâncias húmicas (SH) na germinação e crescimento de plântulas de milho três dias após de germinadas, ii) Determinar a concentração da SH mais efetiva no crescimento inicial de plântulas de milho, iii) Avaliar o efeito das SH de cada origem na tolerância de plantas de milho ao estresse salino. Para dar resposta aos objetivos propostos foram estabelecidos três experimentos, utilizando substâncias húmicas (AH+AF) extraídas de um Organossolo (SH-Org), Andisol (SH-And) e vermicomposto (SH-Vc), as quais foram testadas na germinação, crescimento inicial e tolerância ao estresse salino (100mM) de plântulas de milho híbrido BR-3025. A germinação foi inibida pela aplicação das SH, reduzindo significativamente o índice de velocidade e porcentagem de germinação, além de reduzir o vigor das plântulas, incrementando a quantidade de plântulas anormais, este efeito inibidor foi observado na seguinte ordem SH-And>SH-Org>SH-Vc, mas o efeito inibitório observado na germinação não reduziu o comprimento radicular nem a produção de massa seca das plântulas de milho normais em concentrações de 10 mg C L⁻¹ para as três SH. No segundo experimento a aplicação das substâncias húmicas após a emergência das plântulas de milho estimulou os parâmetros radiculares e conteúdo de biomassa seca em concentrações diferentes para cada SH, onde as SH-And apresentaram um comportamento lineal decrescente sendo a concentração de maior resposta a de 5 mg C L⁻¹; as SH-Org e SH-Vc mostraram um comportamento quadrático, com máxima resposta em concentrações de 20 e 10 mg C L⁻¹ respectivamente, pelo que foram as concentrações utilizadas no próximo experimento. Os resultados do terceiro experimento mostram que o estresse salino afetou negativamente os parâmetros de crescimento das plantas, porém estes efeitos foram reduzidos quando as plantas foram tratadas com SH, verificando-se um maior acúmulo de biomassa e sínteses de clorofila a, a+b e carotenóides, além de incrementos na tolerância ao estresse comprovados com incrementos no teor relativo de água e aumento a permeabilidade relativa.

Palavras-chave: Germinação-plântulas. Atividade biológica. Salinidade.

4.2. ABSTRACT

The objective of this chapter was to compare the effects of humic substances on the germination and growth of maize seedlings three days after germination, (ii) to determine the concentration of SH more effective in the initial growth of maize seedlings; iii) Evaluate the effect of HS of each origin on the tolerance of corn plants to saline stress. To respond to the proposed objectives, three experiments using humic substances (AH + AF) extracted from an Organosol (HS-Org), Andisol (HS-And) and vermicompost (HS-Vc) were established, which were tested in germination, initial growth and tolerance to saline stress (100 mM) of hydrolyzed corn seedlings BR-3025. Germination was inhibited by SH application, reducing germination rate and germination percentage, and reducing seedling vigor by increasing the amount of abnormal seedlings. This inhibitory effect was observed in the following order SH-And > SH-Org > SH-Vc, but the inhibitory effect observed on germination did not reduce root length or dry mass production of normal maize seedlings at concentrations of 10 mg C L⁻¹ for the three HS. In the second experiment the application of humic substances after emergence of corn seedlings stimulated root parameters and dry biomass content at different concentrations for each SH, where the HS-And presented a decreasing linear behavior and the highest response concentration was 5 mg C L⁻¹; the HS-Vc and HS- Org showed a quadratic behavior, with maximum response at concentrations of 10 and 20 mg C L⁻¹ respectively, and therefore the concentrations used in the next experiment. The results of the third experiment show that saline stresses negatively affect plant growth parameters, but these effects were reduced when the plants were treated with SH, with a higher accumulation of biomass and chlorophyll a, a + and carotenoids syntheses, as well as increases in stress tolerance with increased relative water content and increased relative permeability.

Keywords: Germination-seedlings. Biological activity. Salinity stress.

4.3. INTRODUÇÃO

As substâncias húmicas (SH), tem a capacidade de melhorar as características estruturais do solo além de desempenhar um papel chave nas funções das plantas (BERBARA e GARCIA, 2014). Ao nível fisiológico as SH atuam no sistema vegetal causando modificações no metabolismo primário (TREVISAN et al., 2011), secundário (SCHIAVON, et al., 2010), mudanças morfológicas na germinação de sementes, crescimento inicial, desenvolvimento radicular, da parte aérea e maior absorção de nutrientes (CHEN e AVIAD., 1990; VARIANI E PINTON., 1995; HERNÁNDEZ et al., 2012).

No sistema radicular as SH estimulam a formação de raízes laterais (CANELLAS et al., 2002; JINDO et al., 2012; MORA et al., 2012), pelos radiculares, comprimento radicular (FAÇANHA et al., 2002a; OLAETXEA et al., 2016; SILVA et al., 2011). O incremento nestes fatores contribui para uma maior área de exploração e, conseqüentemente, maior absorção de nutrientes (EYHERAGUIBEL et al., 2008; BARRAL., 2015). Na parte aérea as SH incrementam o conteúdo de proteínas e pigmentos, fotossintéticos (BALDOTTO et al., 2009; MOYA et al., 2016) que por sua vez incrementam o conteúdo de biomassa vegetal (ATIYEH et al., 2002).

Na germinação de sementes as SH exercem um efeito diferenciado, podendo ser estimulante como os observados por RODRIGUES et al. (2017), em milho, ou de ausência e inibição, como os reportados por Serâ e Novák. (2011), com AH extraídos de solo florestais de coníferas, que tiveram um efeito inibidor em sementes de *C. album*, e foram relacionados com altos conteúdo de grupos -COOH e substâncias alelopáticas encontradas nestes solos.

Além dos efeitos estimulantes das SH no crescimento, têm sido reportados efeitos protetores ante diferentes tipos de estresse abiótico como o salino (KULIKOVA et al., 2005), aumentando a absorção de nutrientes e reduzindo a absorção de elementos tóxicos, podendo ser consideradas as SH como uma alternativa para reduzir os efeitos do estresse salino em plantas de trigo (BÜLENT et al., 2009), feijão (AYDIN et al., 2012) e milho (MARTÍNEZ et al., 2012).

Apesar da grande quantidade de efeitos positivos no desenvolvimento vegetal tem que se considerar que, devido à sua complexidade estrutural, os efeitos das SH no sistema vegetal variam de acordo com a espécie e idade planta, do órgão analisado, da origem e concentração das SH e das condições em que este foi aplicada (CHEN et al., 2004; ROSE et al., 2014). Porém o fator que mais influência o efeito das SH na bioatividade de plantas está relacionado com sua origem (NARDI e PIZZEGHELLO, 2002; ŠERÁ e NOVÁK, 2011).

As fontes de SH utilizadas para os estudos de bioatividade são diversas, podendo ser solos (BALDOTTO et al., 2011; CANELLAS e FAÇANHA, 2004; ŠERÁ e NOVÁK, 2011), turfa, carvão, leonardita (MORA et al., 2010; SILVA A.C et al., 2011), produtos comerciais à base de SH (FERRARA E BRUNETTI, 2008) e majoritariamente materiais compostados (CANELLAS e OLIVARES, 2014; GARCIA et al., 2014; GARCÍA et al., 2013). Mas, independentemente da fonte de SH, é importante definir a concentração ótima para cada estudo já que, geralmente, concentrações elevadas têm efeito fitotóxico (ROSE et al., 2014).

O Capítulo II é composto por três experimentos inte-relacionados entre si, que tem como objetivos:

- Comparar os efeitos das substâncias húmicas na germinação e crescimento de plântulas de milho três dias após a germinação
- Determinar a concentração de substância húmica mais efetiva ao crescimento inicial de plântulas de milho.
- Avaliar o efeito das concentrações mais efetivas de cada substância húmica na tolerância de plantas de milho à salinidade.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Material vegetal e condições experimentais

Os três ensaios foram conduzidos no laboratório de Biologia de Solo e áreas do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no município Seropédica, RJ. Utilizando sementes de milho híbrido (*Zea mays L* var BR-3025) doadas pela EMBRAPA-Agrobiologia.

Em todos os ensaios as sementes foram primeiramente desinfestadas com uma solução de hipoclorídrico de sódio (NaClO) a 0,5%, durante cinco minutos e lavadas com abundante água destilada até ficar sem resíduos. Foram utilizadas para os tratamentos substâncias húmicas extraídas com NaOH de um Andisol (SH-And), Organossolo (SH-Org), e Vermicomposto (SH-Vc) e as concentrações calculadas na base do conteúdo de carbono previamente determinado na análise elementar de cada substância húmica. As substâncias húmicas foram primeiramente dissolvidas em água destilada e o pH ajustado a 6,5 com KOH ou HCl.

4.4.2. Experimento I: efeitos das substâncias húmicas na germinação e crescimento inicial de plantas de milho

a) Teste de germinação e vigor

As sementes de milho previamente desinfestadas foram colocadas em água destilada durante 12 horas, e logo após transferidas para placas Petri de 15 cm de diâmetro contendo círculos de papel filtro humedecidos com 5 ml de água destilada e depois agregados 15 ml de substâncias húmicas em solução com pH ajustado a 6,5 em concentrações de: 0 (controle), 10, 20, 40 e 80 (mg C L⁻¹). As placas foram vedadas e mantidas em incubadora tipo BOD (NT718) regulada em temperatura constante de ± 25 °C durante 5 dias. Utilizaram-se para o teste de germinação 100 sementes por tratamento distribuídas em 4 repetições (25 sementes/placa Petri).

O delineamento experimental foi inteiramente causalizado, com arranjo fatorial 3 x 5, com quatro repetições por tratamento. O primeiro fator foram as substâncias húmicas (SH): Andisol (SH-And), Organossolo (SH-Org), e Vermicomposto (SH-Vc) e o segundo fator foram as cinco concentrações de substâncias húmicas: 0,10, 20, 40, 80 mg C L⁻¹.

As avaliações foram realizadas segundo as Regras para Análises de sementes (BRASIL, 2009). Para a determinação do índice de velocidade de germinação (IVG) foram contabilizadas diariamente as plantas germinadas e o IVG calculado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962) baseado na leitura diária do número de plântulas emergidas, a partir do dia 1° até o 5° dia após a instalação do ensaio:

$$IVG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \dots + \frac{Gn}{Nn}$$

Onde G1+ G2 +...+ Gn = número de plantas normais computadas na primeira, segunda e última contagem respectivamente. N1+N2+...Nn+ número de dias recorridos da semeadura à primeira, segunda, e últimas contagens respectivamente.

Consideram-se plântulas normais aquelas que possuem suas estruturas essenciais como o hipocótilo e raízes bem desenvolvidas, e com características ótimas para seu normal desenvolvimento em condições ótimas. Entanto as plântulas anormais são aquelas que não apresentam características para continuar seu desenvolvimento, mesmo sendo cultivada em

condições ótimas, podendo ter suas estruturas essenciais danificadas, tais como raiz com geotropismo negativo, atrofiada raiz e hipocótilo retorcido ou desproporcional (Anexo B) (OLIVEIRA, 2018).

A porcentagem de germinação foi realizada em uma contagem aos cinco dias após a instalação do experimento e os resultados expressos em porcentagem de plântulas germinadas, considerando-se como critério de germinação a protrusão radicular. Para o cálculo utilizou-se a fórmula de Labouriau e Valadares (1976) em que:

$$\% \text{ Germinação} = \frac{PG}{N} \times 100$$

Onde: PG= número de plântulas germinadas; N=Número total de sementes colocadas para germinar.

b) Teste de comprimento médio das raízes

Foi realizado um segundo teste para avaliar os efeitos dos tratamentos no desenvolvimento inicial de plântulas para o que foram empregadas 20 sementes por tratamento com 4 réplicas cada uma, as quais foram semeadas em papel filtro pré-umedecido com cada tratamento contendo as 4 concentrações de SH e o controle (água). Sobre uma linha traçada no terço superior, no sentido longitudinal, a semente de milho foi colocada com a ponta da radícula para a parte inferior do papel e o embrião voltado para cima, visando orientar o crescimento da plântula da forma mais retilínea possível. Os rolos de papel contendo as sementes, amarrados com atilo de borracha e em sacos plásticos foram colocados verticalmente no BOD (AOSA, 1983).

Três dias após da germinação (DAG) foram consideradas unicamente 40 plântulas normais por tratamento para as avaliações de comprimento da parte aérea (hipocótilo) e eixo radicular principal com auxílio de uma régua graduada em centímetros. A seguir o material de cada repetição foi acondicionado em sacos de papel identificado e levado para estufa termoelétrica regulada a 80°C durante 24 horas, após resfriar em dessecador cada repetição teve a massa determinada em balança analítica com precisão de 0,0001 g e o peso dividido pelo número de plântulas normais para obter a massa média por plântula, conforme recomendações de Nakagawa, 1999. Os resultados médios foram expressos em miligrama por plântula.

c) Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância com o teste F, pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014), quando as interações foram significativas foi realizado um ANOVA para o desdobramento seguido do teste de médias de Tukey para comparações múltiplas com um nível de significância $p < 0,05$ e os gráficos foram processados pelo programa estatístico XLSTAT® 2017 versão 19.5 e Microsoft Excel 2010.

4.4.3. Experimento II: efeito doses-resposta de cinco concentrações de substâncias húmicas de três origens em plântulas de milho

Para os testes de avaliação da influência das substâncias húmicas nos parâmetros radiculares de plântulas de milho, nos primeiros 6 dias após da germinação, foi utilizada uma câmara de crescimento do departamento de Solos da UFRRJ, regulada com ciclo de

luminosidade de 12/12 horas (luz/escuro), fluxo fotossintético de fótons de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com umidade relativa de 70% e temperatura constante de 28°C .

As sementes de milho foram colocadas para germinar em BOD em bandejas plásticas cobertas com papel filtro umedecido com água destilada e cobertas com filme plástico para manter os níveis de umidade. Uma vez germinadas as sementes (aos 5 dias) foram selecionadas as plântulas normais com 1 cm de radícula emergida e transferidas para vasos de 300 ml de capacidade contendo as soluções das três substâncias húmicas com pH ajustado a 5,8 e colocadas em câmara de crescimento. A umidade foi mantida diariamente até o fim do experimento aplicando 10 ml de água destilada a cada tratamento.

Os tratamentos foram dispostos em um delineamento completamente causalizado, com arranjo fatorial 3x5, o primeiro fator foram as substâncias húmicas (SH): Andisol (SH-And), Organossolo (SH-Org), e Vermicomposto (SH-Vc) e o segundo fator foram as cinco concentrações de substâncias húmicas: 0, 5, 10, 20 e 40 mg C L^{-1} . Utilizaram-se 5 plantas por vaso, cada vaso constituiu uma unidade experimental, em três réplicas para realizar avaliações destrutivas nos dias 2, 4 e 6 após de iniciado o teste.

Após coletadas as raízes, foram digitalizadas com escâner profissional Epson Expression 10000 X, equipado com luz adicional (TPU) com resolução de 600 dpi e salvas no formato TIF. Para diminuir o efeito da sobreposição das raízes e obter uma melhor quantificação, foi utilizada uma cuba de acrílico de 20 cm de largura por 30 de comprimento contendo uma lâmina de água de aproximadamente 2 mm a qual foi trocada a cada novo escaneamento. Seguidamente as imagens foram analisadas com auxílio do programa WinRhyzo (Reagent Instruments Inc., Quebec, Canadá), os dados salvos em documento de notas e após convertido para Excel para posterior análises dos dados.

Os parâmetros morfológicos analisados foram: comprimento radicular (CR), área de projeção radicular (AR) e número de raízes laterais (NRL).

Após as avaliações morfológicas, as raízes foram colocadas em sacos de papel identificadas por repetição e tratamento e secadas em estufa a 75°C até peso constante para determinação de massa seca radicular a qual foi expressa em miligramas.

Pela análise estatística, os resultados obtidos foram submetidos a análises de variância com o teste F, pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014), quando as interações foram significativas foi realizado um ANOVA para o desdobramento seguido do teste de médias de Tukey para comparações múltiplas com um nível de significância $p < 0,05$. As análises dos efeitos das concentrações foram feitas por análise de regressão com o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014). As equações de regressão foram utilizadas para determinar a concentração de substâncias húmicas extraídas de Andisol, Organossolo e Vermicomposto que estimularam ao máximo os parâmetros comprimento radicular (CR) e número de raízes laterais (NRL), quando os valores dos coeficientes foram significativos.

4.4.4. Experimento III: avaliação do efeito das substâncias húmicas em plantas de milho submetidas a estresse salino

As sementes desinfetadas foram lavadas com água destilada e deixadas embebidas em água durante 12 horas para após serem semeadas 5 sementes por recipiente em vasos de polipropileno com capacidade para 3 L de areia lavada e autoclavada durante 1 hora a 120°C e 1,5 atm e vermiculita na proporção 2:1 (areia:vermiculita).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação onde os valores médios de temperatura e umidade relativa foram de 27°C e 74%, respectivamente. Neste experimento foram utilizadas as concentrações ótimas de cada SH determinadas previamente no experimento II, sendo aplicadas doses de 5 mg C L^{-1} para SH-And, 20 mg C L^{-1} para SH-Org e 10 mg C L^{-1} para SH-Vc.

A concentração salina (NaCl) utilizada foi de 100 mM na base de um pré ensaio onde foram testadas três concentrações salinas de 50, 100 e 150 mM, sendo que a concentração de 100 mM permitiu o desenvolvimento das plantas de milho com efeitos visíveis, mas não graves, enquanto a concentração de 150 mM não permitiu o desenvolvimento das plantas e a de 50 mM não afetou visivelmente as plantas.

O desenho experimental utilizado foi completamente causalizado com 5 tratamentos conformados por: controle (sem adição de SH, sem estresse salino); estresse salino (ES); estresse salino com substâncias húmicas de Organossolo (ES+SH-Org); estresse salino com substâncias húmicas de Andisol (ES+SH-And); estresse salino com substâncias húmicas de Vermicomposto (ES +SH-Vc), cada tratamento foi conformado com 8 repetições, sendo utilizadas 4 para cada avaliação.

Sete dias após da emergência das plantas foi realizado um desbaste, deixando 1 planta por vaso. Três dias após o desbaste (10 DAE) deu-se início à diferenciação dos tratamentos com substâncias húmicas e solução salina, os quais foram inseridos na solução nutritiva de Hoagland 50% (Hoagland e Arnon, 1950) nos dias 10 e 16 após a emergência das plantas, a solução nutritiva foi aplicada a cada três dias até o fim do experimento.

As plantas foram coletadas aos 15 e 21 dias após da emergência ou 5 dias após da aplicação dos tratamentos, sendo avaliados parâmetros morfológicos e pigmentos fotossintéticos. As avaliações de permeabilidade radicular e teor relativo de água foram realizadas unicamente aos 21 dias após a emergência das plantas.

4.4.5. Avaliação de parâmetros morfológicos: massa seca radicular (MSR), massa seca foliar (MSF) e taxa de crescimento relativo (TCR)

Aos 15 e 21 dias após da germinação foram coletadas 4 plantas por tratamento e medida a altura da parte aérea com auxílio de uma régua graduada, logo após as plantas foram separadas em parte aérea e radicular e colocadas a secar em estufa a 75°C durante 72 horas até peso constante, para determinação de massa seca em balança analítica.

Para a avaliação do crescimento vegetal em função da quantidade de material acumulado gradativamente foi calculada a taxa de crescimento relativo (TCR) para a parte aérea e radicular pela equação proposta por Reis e Muller, 1979.

$$TCR = \frac{\ln P_2 - \ln P_1}{t_2 - t_1} \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$$

Onde Ln é o logaritmo neperiano; P₂ e P₁ são o peso da matéria seca no tempo dois (t₂=21 dias) e no tempo 1 (t₁=15 dias).

a) Determinação de pigmentos fotossintéticos

Para a análise de conteúdo de pigmentos fotossintéticos foram coletadas amostras da folha mais expandida, logo lavada com água deionizada para remoção de contaminantes. Pesaram-se aproximadamente 0,200 mg de cada replica e anotou-se o peso de cada amostra para posterior determinação de mg de pigmentos/ g de massa seca. Para a determinação da porcentagem de massa seca foi pesado 1g de folha e colocado em estufa durante 24 horas a 105°C até peso constante.

Cada amostra foliar previamente pesada foi colocada em tubos Falcon com capacidade para 50 ml contendo 10 ml de acetona 80% (v/v) e deixada 72 horas em refrigeração no escuro. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimatzu UV-vis 1800) em

absorbâncias de 470, 645, 663 e 750 nm. Os teores de pigmentos foram calculados baseados nas equações Arnon. (1949) e Lichtenthaler (1987) usando as fórmulas:

$$\begin{aligned}Chl a &= 12,25 (Abs\ 663\ nm) - 2,79 (Abs\ 646\ nm) \\Chl b &= 21,50 (Abs\ 645\ nm) - 5,10 (Abs\ 663\ nm) \\Chl a + b &= 7,15 (Abs\ 663\ nm) - 18,71 (Abs\ 646\ nm) \\Carot &= [1000(Abs\ 470\ nm) - 1,82(Cl\ a) - 85,02(Cl\ b)]/198\end{aligned}$$

Onde Chl e Carot são clorofila e carotenóides respectivamente; Abs absorvância nas diferentes comprimentos de onda.

b) Permeabilidade foliar e radicular

A determinação da permeabilidade foliar foi realizada segundo o descrito por Lutts et al. (1996), usando folhas jovens por cada tratamento. As folhas foram lavadas três vezes com água deionizada para remoção de eletrólitos aderidos na superfície. Um gramo de peso fresco de cada amostra foi colocada em tubos Falcon fechados contendo 10 ml de água deionizada e incubados a 25°C por 24 horas em agitador, consecutivamente a condutividade elétrica foi determinada. Logo após as amostras foram auto clavadas a 120°C por 20 minutos e pressão de 1,5 atm, e a condutividade elétrica medida após o líquido atingir os 25°C. A permeabilidade foliar foi determinada com a seguinte fórmula:

$$PRF\% = \frac{CE1}{CE2} \times 100$$

Onde PRF é a permeabilidade foliar; CE1 é a condutividade elétrica às 24 horas e CE2 a condutividade elétrica final.

A permeabilidade radicular relativa (PRR) foi determinada na última avaliação onde raízes de cada tratamento foram cortadas em segmentos de 2 cm e pesadas até 2,5 gr e colocadas em recipientes plásticos contendo 25 ml de água deionizada. A condutividade elétrica foi medida a cada 10, 20 e 30 minutos após mergulhadas as raízes na água. Depois os segmentos foram aquecidos até ebulição, após resfriados a temperatura ambiente e a condutividade elétrica medida novamente. A permeabilidade foi calculada segundo a fórmula proposta por Zwiazek e Blake, 1990, onde:

$$PRR\ \% = \frac{CE\ aos\ 30\ minutos\ antes\ aquecimento}{CE\ após\ aquecimento} \times 100$$

c) Teor relativo de água

O teor relativo de água (TRA) expressa a porcentagem de água contida no tecido em um tempo determinado, o valor é relativo à turgência e saturação total e pode ser encontrado em folhas ou discos foliares de área conhecida (Smarth e Bingham, 1974).

Para a análises do teor relativo de água (TRA) foram coletados cinco discos foliares de 1cm² de área por tratamento, cuidando de não amostrar a nervadura central da folia. O teor de água (TRA), foi calculado segundo a metodologia de Barrs e Wheaterley (1962) utilizando a seguinte fórmula:

$$TRA = \frac{(MF-MS)}{(MT-MS)} \times 100$$

Onde MF é o peso da massa fresca dos discos, MT peso da massa turgida dos discos foliares e MS da massa seca dos discos após serem secos em estufa a 70°C, e os resultados expressados em porcentagem (%).

Os discos coletados e pesados foram acondicionados em placas Petri com tampa para pesagem da massa fresca. Em seguida adicionou-se água destilada nas placas e colocadas na geladeira por 24 horas para obter massa túrgida. A massa seca foi obtida após submeter os discos a secagem em estufa a 60°C por 72 horas.

d) Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análises de variância pelo teste F (5%) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) no programa estatístico XLSTAT® 2017 versão 19.5.

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1. Experimento I: efeitos das substâncias húmicas na germinação e crescimento inicial de plântulas de milho

a) Germinação das sementes

Na Tabela 7 encontram-se os valores médios de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) segundo a fonte e concentração de substâncias húmicas aplicadas às sementes de milho. Observa-se que a germinação das sementes não foi estimulada pela aplicação de SH das três origens, sendo constatado um efeito inibitório em algumas concentrações e mais acentuado segundo a origem das SH. As três fontes de SH utilizadas geraram uma redução da porcentagem de germinação, porém o efeito mais marcante foi observado para as SH-Vc na seguinte ordem SH-Vc>SH-And>SH-Org. O efeito inibitório das concentrações de SH utilizadas foi significativo para as SH-And em 80 mg C L⁻¹ e para as SH-Org e SH-Vc foi em concentrações de 20 mg C L⁻¹.

Em relação ao IVG o efeito inibitório mais marcante foi observado nas SH-And com uma redução significativa do IVG com o aumento das concentrações, seguido pelas SH-Org em concentrações de 10 mg C L⁻¹ e as SH-Vc em concentrações de 20 mg C L⁻¹.

Tabela 7. Porcentagem de Germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de milho submetidos a substâncias húmicas de três origens em cinco concentrações.

SH (mg C L ⁻¹)	% Germinação		
	SH-Org	SH-And	SH-Vc
0	91 aA	89 aA	90 aA
10	82 bB	86 aAB	89 aA
20	77 bB	85 aA	65 bC
40	90 aA	90 aA	83 aB
80	91 aA	73 bB	71 bB
SH (mg C L ⁻¹)	IVG		
	SH-Org	SH-And	SH-Vc
0	22,22 aA	20,85 aA	22,45 aA
10	13,83 dC	19,79 abB	22,39 aA
20	16,31 cAB	17,89 bcA	15,56 cB
40	18,62 bA	17,50 cA	17,89 bA
80	20,48 abA	11,27 dC	17,27 bcB

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Na Tabela 8 são apresentados os resultados do teste de vigor, onde observou-se que nenhum dos tratamentos com SH das três origens estimulou a porcentagem de plântulas normais, observando-se um incremento da porcentagem de plântulas anormais e não germinadas com a aplicação das três SH.

A redução da quantidade de plântulas normais foi fortemente influenciada pela concentração das SH, encontrando-se os valores mais baixos de plântulas normais em concentrações de 20 mg L⁻¹ para as três origens de SH. Conseqüentemente observou-se o incremento das plântulas anormais sob os tratamentos com concentrações de 20 mg C L⁻¹

assim como de sementes não germinadas. Além do efeito inibitório da concentração das SH no vigor das sementes, existiu um forte efeito da origem observando-se que a aplicação de SH extraídas de solo (SH-And e HS-Org) incrementou significativamente a porcentagem de plântulas anormais na seguinte ordem SH-And>SH-Org>SH-Vc, entretanto as SH procedentes de vermicomposto (SH-Vc) incrementaram significativamente a porcentagem de sementes não germinadas (SH-Vc) o que corresponde com a menor germinação reportada na porcentagem de germinação.

Tabela 8. Porcentagem de plântulas normais, anormais e não germinadas de sementes de milho submetidas a substâncias húmicas de três origens em cinco concentrações.

SH (mg C L ⁻¹)	Plântulas normais		
	SH-Org	SH-And	SH-Vc
0	77 aA	76 aA	74 aA
10	62 bB	46 bcC	75 aA
20	48 cA	42 cA	44 cA
40	65 bA	43 bB	72 aA
80	67 bA	48 bcC	57 bB
SH (mg C L ⁻¹)	Plântulas anormais		
	SH-Org	SH-And	SH-Vc
0	14 cA	13 cA	16 abA
10	20 bcB	40 aA	14 bC
20	29 aB	43 aA	21 aC
40	25 abB	37 aA	14 bC
80	24 abA	25 bA	14 bB
SH (mg C L ⁻¹)	Não germinadas (NG)		
	SH-Org	SH-And	SH-Vc
0	9 bA	11 bA	10 bA
10	18 aA	14 bAB	11 bB
20	23 aB	15 bC	35 aA
40	10 bB	10 bB	17 bA
40	9 bB	27 aA	29 aA
80	9 bA	11 bA	10 bA

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, pelo teste de Tukey (p<0,05).

A aplicação de SH ou suas frações na germinação de sementes tem resultados variáveis, desde efeitos estimulantes em sorgo (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) (MOTA et al., 2015), ou pouco significativos em milho (*Zea mays* L) (RODRIGUES et al., 2017) ou inibitorios em espécies silvestres segundo Šerá e Novák. (2011) em função da fonte de SH utilizada.

Os resultados mostram um efeito inibitório dos parâmetros germinativos das sementes de milho sob efeito das 5 concentrações de SH, as quais reduziram significativamente o IVG e o vigor das sementes quando comparadas com o controle o qual observou-se refletido na maior porcentagem de plântulas anormais. Este efeito foi mais marcado nas sementes tratadas com SH extraídas de Andisol (SH-And) e Organossolo (SH-Org) com características mais aromáticas (Tabela 1;) e maior presença de grupos C_{Ar-H,R} que as de vermicomposto, pelo que poderia existir uma relação do efeito inibidor com a origem das SH.

Como relatado por Šerá e Novák. (2011), que observaram a inibição da germinação em sementes de espinafre selvagem (*Chenopodium álbum* L.) sob efeito de AH isolados de solos de florestas em concentrações de 60 mg C L⁻¹, onde há uma alta presença de grupos C_{COOH}. Este grupos também tem sido relacionados por Muscolo et al. (2007), com efeitos alelopáticos das SH na germinação. Porém, este efeito inibitório não é observado em condições naturais pelo longo processo de evolução e adaptação das plantas ao méio ambiente do solo (ŠERÁ e NOVÁK, 2011). Efeitos inibitórios na germinação também tem sido vinculados com a presença de ácidos orgânicos de baixo peso molecular com efeitos fitotóxicos cuja intensidade depende do comprimento da cadeia de carbonos e sua concentração e o pH da solução em que se encontram (CAMARGO et al., 2001).

b) Crescimento das plântulas normais

A aplicação de SH em cinco concentrações no crescimento inicial de plântulas de milho e acúmulo de massa seca por plântula apresentaram efeitos tanto positivos como negativos (Figura 9). O comprimento radicular foi estimulado pela aplicação das três SH em concentrações de 10 mg C L⁻¹, e inibido em concentrações maiores (Figura 9A). Por outro lado, o comprimento da parte aérea foi estimulado pela aplicação de SH-And e SH-Vc em concentrações de 20 e 10 mg C L⁻¹ respectivamente. No caso das SH-Org não foi observado estímulo do comprimento da parte aérea (Figura 9B).

O estímulo do comprimento radicular em concentrações de 10 mg C L⁻¹ representou incremento de 14%, 7% e 6% para as SH-Org, SH-And e SH-Vc, respectivamente, quando comparadas com o controle. Entretanto o incremento do comprimento da parte aérea das plântulas foi de 35% e 27% para as SH-Vc e SH-And respectivamente em relação ao controle.

Este efeito estimulante das SH tem relação com outros estudos, e é considerado como resultado da alteração do metabolismo bioquímico das plantas ocasionado pelas SH que afetam a permeabilidade da membrana radicular contribuindo para a maior absorção e transporte de nutrientes e consequentemente maior desenvolvimento vegetal (Teoria do crescimento ácido) (SILVA et al., 1999; ROSA et al., 2009; AGUIAR et al., 2009; GARCÍA, 2013; ZANDONADI et al., 2014).

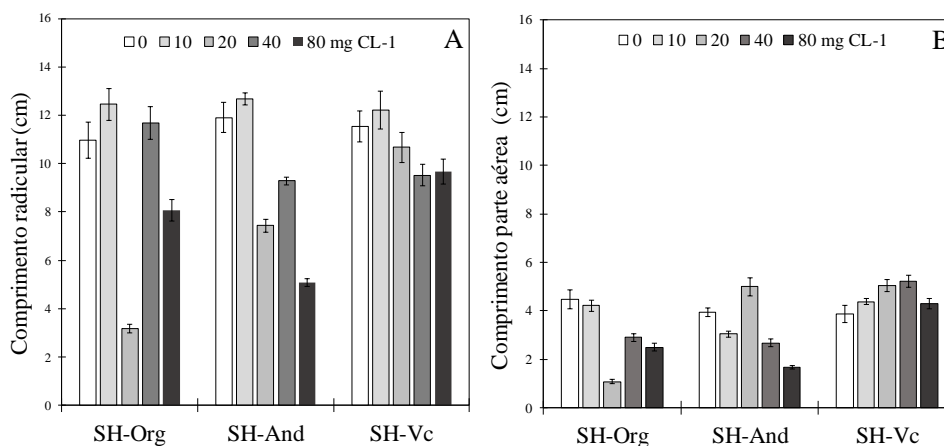


Figura 9. A) Comprimento radicular da maior raiz primaria; B) Comprimento parte aérea de plântulas de milho tratadas com SH de três origens: Organossolo (SH-Org), Andisol (SH-And) e Vermicomposto (SH-Vc), em cinco concentrações (0, 10, 20, 40 e 80 mg C L⁻¹). Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) para cinco réplicas, segundo o teste de Tukey, (p<0,05).

Todas as SH aplicadas nas concentrações de 10 e 40 mg C L⁻¹ exerceram efeito estimulante na produção de massa seca das plântulas (Figura 10). Porém os máximos valores de massa seca foram observados nas plântulas sob efeito das SH-Vc, independentemente da concentração utilizada (SH-Vc>SH-Org>SH-And). Nesse estudo, os incrementos da massa seca das plântulas de milho foram superiores ao 100% na menor concentração utilizada.

O acúmulo de massa seca é considerado uma resposta à aplicação de SH, existem estudos que relacionam concentrações crescentes com incremento da massa seca da parte aérea existindo um efeito positivo dose-resposta em plantas de feijão (Da ROSA et al., 2009), mas por outro lado existem relatos de efeitos negativos de altas concentrações de AH no acúmulo de massa seca, sobretudo da parte aérea, segundo Pinheiro et al. (2010). Os maiores valores de comprimento radicular e biomassa seca das plântulas tratadas com SH desde a fase de semente, é um indício de seu efeito estimulante, comum em plantas com suprimento adequado de nutrientes, segundo Schumacher et al. (2004).

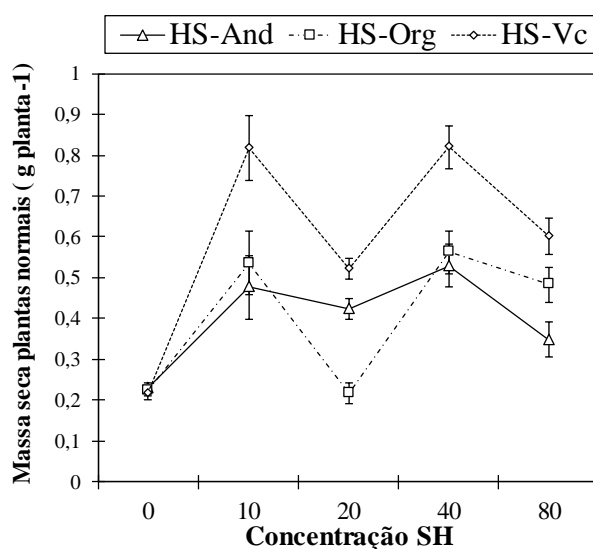


Figura 10. Massa seca de plântulas normais de milho tratadas com SH de três origens: Organossolo (SH-Org), Andisols (SH-And) e Vermicomposto (SH-Vc), em cinco concentrações (0, 10, 20, 40 e 80 mg C L⁻¹). Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) de quatro repetições. Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A resposta positiva observada no crescimento inicial das plântulas normais submetidas desde a fase de semente à aplicação das SH na menor concentração testada (10 mg C L⁻¹) poderia estar relacionada com uma redução do efeito inibitório das SH verificado na germinação e com o início dos efeitos estimulantes. Concentrações maiores de SH aplicadas desde a fase de semente teriam maior efeito fitotóxico no crescimento de plântulas normais. Estes efeitos fitotóxicos na germinação reduziriam a respiração e divisão celular manifestando-se na redução do sistema radicular na fase inicial de crescimento, reduzindo a emissão de pelos radiculares, como observado por Camargo et al. (2001).

4.5.2. Experimento II: Efeito doses-resposta de cinco concentrações de substâncias húmicas de três origens em plântulas de milho

O comprimento radicular, número de raízes laterais e área superficial de plântulas de milho foram estimulados pela aplicação de SH (Figura 11). A relação entre a concentração de SH e comprimento radicular, número de raízes laterais e área superficial radicular tem um comportamento específico segundo sua origem, em geral, estes parâmetros respondem a um comportamento lineal para as SH-And ($R^2 > 0,85$) com uma tendência a decrescer em concentrações a partir de 10 mg C L⁻¹, e quadrática para as SH-Org ($R^2 > 0,95$) e SH-Vc ($R^2 > 0,74$), observando-se um menor estímulo a partir de 20 e 40 mg C L⁻¹, respectivamente.

O maior incremento sobre o comprimento e área superficial radicular foi observado nas plântulas tratadas com SH-Org comparadas com as SH-Vc e SH-And (Figura 11A e C), no caso do número de raízes laterais o incremento foi maior para os tratamentos com SH-Org e SH-Vc ao ser comparados com os tratamentos com SH-And (Figura 11B).

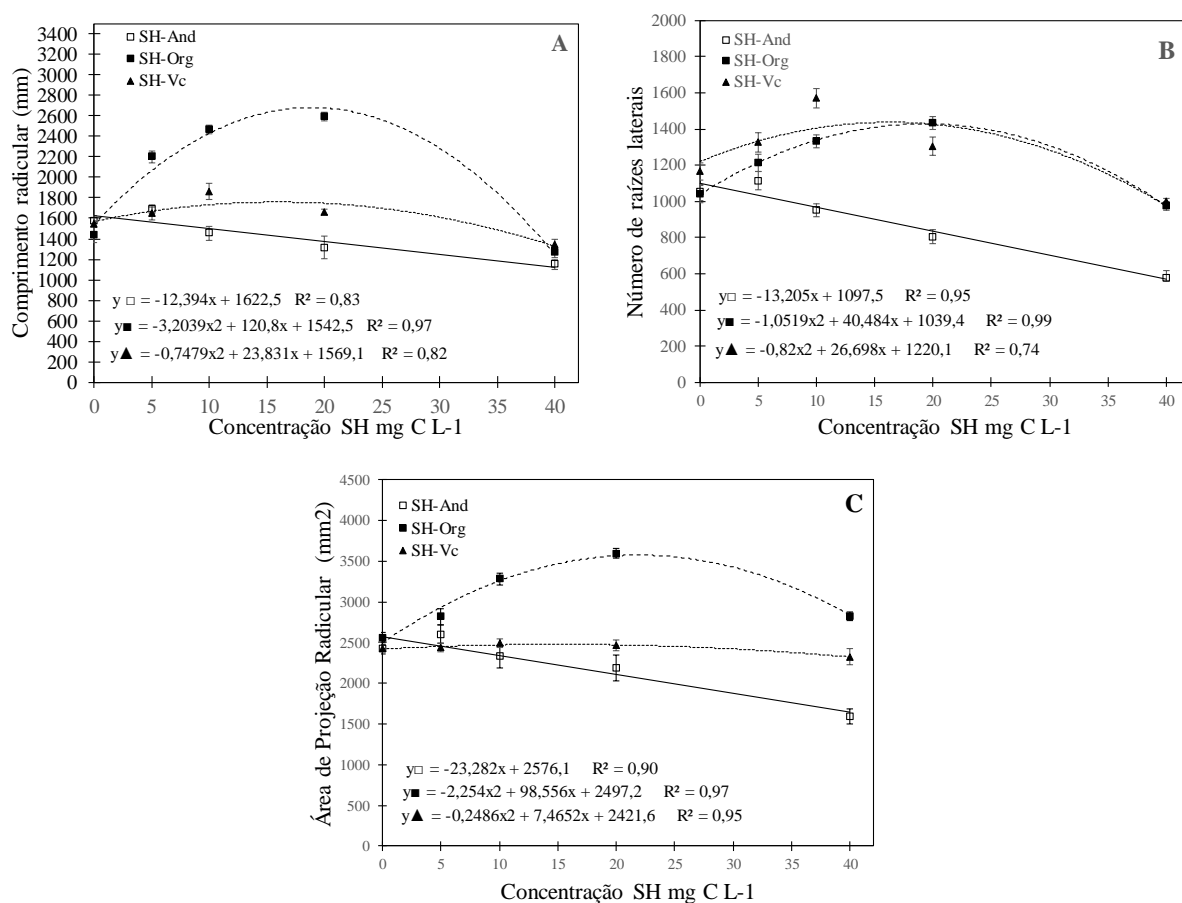


Figura 11. A) Comprimento radicular, B) Número de raízes Laterais e C) Área superficial Radicular de plântulas de milho aos 6 DAT (Dias após o transplante) tratadas com SH de três origens: Organosol (SH-Org), Andisol (SH-And) e Vermicomposto (SH-Vc), em cinco concentrações (0, 5, 10, 20, e 40 mg C L⁻¹). Pontos representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para cinco réplicas, segundo o teste de Tukey, ($p < 0,05$).

Sob as condições estudadas as SH estimularam o crescimento radicular, número de raízes laterais e área superficial em diferentes concentrações de máxima resposta segundo sua origem, sendo 5 mg C L⁻¹ para as SH-And, 10 mg C L⁻¹ para as SH-Vc e 20 mg C L⁻¹ para as

SH-Org. Estas concentrações de máxima resposta geraram incrementos de 8%, 80% e 21%, no comprimento radicular, de 5%, 37% e 35% na emissão de raízes laterais e de 7%, 40% e 3% na área superficial radicular para as substâncias húmicas de SH-And (5 mg C L⁻¹), SH-Org (20 mg C L⁻¹) e SH-Vc (10 mg C L⁻¹), respectivamente, comparados com o controle, pelo que serão as concentrações utilizadas nas próximas avaliações.

Massa seca radicular e da parte aérea – a produção de massa seca radicular e foliar também foi influenciado pelas fontes e concentrações de SH utilizadas. Os modelos de regressão polinomial foi o que melhor se ajustou para as três SH com coeficientes de SH-Org (R²>0,96), SH-And (R²>0,80), e SH-Vc (R²>0,74) (Figura 12). Segundo este modelo a massa seca radicular e da parte aérea foi mais estimulada pelas SH-Org comparadas com as SH-Vc e SH-And (SH-Org>SH-And>SH-Vc) (Figura 12A).

As concentrações mais responsáveis foram as mesmas que estimularam os parâmetros radiculares e observaram-se valores de MSR inferiores ao controle, em concentrações de 40 mg C L⁻¹ para as SH-And e SH-Vc, entretanto a produção de MSR sob efeito das SH-Org embora também foi afetada pela concentração de 40 mg C L⁻¹, mas as reduções não foram significativas (Figura 12A). A produção da MSPA apresentou uma tendência crescente com maiores concentrações para as SH-And e SH-Vc enquanto para as plântulas tratadas com SH-Org a MSPA reduziu-se na máxima concentração testada (40 mg C L⁻¹) (Figura 12B).

O acúmulo de massa seca pode ser considerado como um dos principais indicadores de eficiência bioestimulante das SH segundo Baldotto e Baldotto. (2013). Nas condições do presente estudo a produção de biomassa radicular foi estimulada em concentrações de 5 mg C L⁻¹ (SH-And), 10 mg C L⁻¹ (SH-Vc) e 20 mg C L⁻¹ (SH-Org) as quais exerceram incrementos na produção de MSR de 26%, 80% e 36% para as SH-And, SH-Org e SH-Vc respectivamente quando comparadas com o controle. Enquanto a MSPA apresentou incrementos máximos de 35%, 113% e 67% em concentrações de 40, 20 e 40 mg C L⁻¹ para as SH-And, SH-Org e SH-Vc respectivamente. Este estímulo no crescimento inicial permite um uso mais eficiente da energia solar, incremento da disponibilidade de carboidratos e maior eficiência fotossintética, de acordo com Almeida et al. (1998).

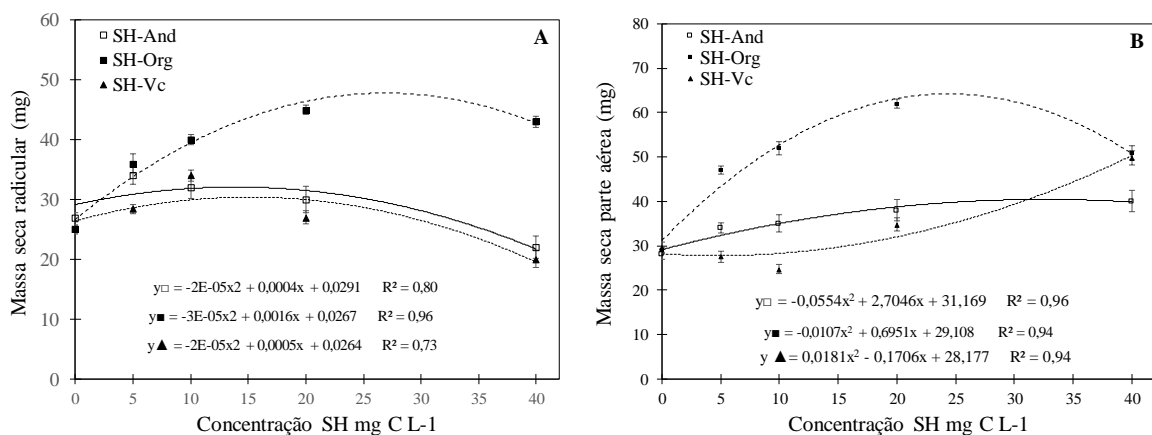


Figura 12. Massa seca radicular e da parte aérea de plântulas de milho aos 6 DAE tratadas com SH de três origens: Organossolo (SH-Org), Andisol (SH-And) e Vermicomposto (SH-Vc), em cinco concentrações (0, 5, 10, 20, e 40 mg C L⁻¹). Barras representam o valor médio ± ES (erro padrão) para cinco réplicas, segundo o teste de Tukey, (p<0,05).

Os resultados são consistentes com os reportados por outros estudos onde foram utilizados SH de diferentes origens relatando a indução do crescimento radicular das plantas tratadas com SH em diferentes espécies vegetais como arroz (GARCÍA et al., 2016b), tomate

(DOBBSS et al., 2010), plantas de milho (CANELLAS et al., 2013). Incrementos de 36% a 135% na emissão de raízes laterais foram reportados por Martinez-Balmori et al. (2014), em plantas de milho sob efeito de AH extraídos de vermicomposto em diferentes estádios de maturidade. Plantas de arroz apresentaram estímulo de 66% na emissão de raízes laterais e 26% no comprimento radicular sob efeito de doses de 40 e 20 mg C L⁻¹ de AH de vermicomposto, com incrementos de 79% na produção de massa seca radicular (GARCÍA, 2013). Canellas e Façanha. (2004), relatam incrementos de 56% na área radicular superficial de plantas de milho sob efeito de AH extraídos de diferentes profundidades de um Argisolo e ausência de estímulo da produção de massa seca radicular.

A grande variabilidade de respostas das SH esta influenciada, principalmente, pela fonte e concentração utilizada (VAUGHAN e MALCOM, 1995; ROSE et al, 2014). Os resultados demonstram que todas as fontes de SH utilizadas exerceram influência positiva, em concentrações diferentes, porém o efeito foi mais expressivo para as SH-Org e SH-Vc (SH-Org>SH-Vc>SH-And) para os parâmetros radiculares e produção de massa seca radicular. No caso da produção de massa seca da parte aérea foi observada uma tendência ao incremento com o aumento das concentrações de SH, resultados similares aos observados por Rodrigues et al. (2017) em plantas de milho tratadas com AH comerciais.

O maior estímulo das SH de Organossolo (SH-Org) e Vermicomposto (SH-Vc) poderiam estar relacionado com as características próprias de cada uma como relatado no Capítulo I (Tabela 6), onde foi observado um predomínio de grupos Carboxil (C_{COO-H,R}) e carbonos alifáticos substituídos (C_{alkyl-O} e C_{alkyl H,R}) assim como maior alifaticidade destas SH em relação às SH extraídas do Andisol, nas quais foram encontradas maiores porcentagens de carbonos aromáticos (C_{Ar-HR}) seguidos por menores porcentagens de grupos alifáticos (C_{Alkyl H,R}), baixa presença de grupos Carboxilos (C_{COO-H,R}) e características mais hidrofóbicas. A presença de C alifáticos substituídos, não substituídos e grupos carboxílicos foram relacionados com o estímulo de alguns parâmetros radiculares (García et al. 2016).

4.5.3. Experimento III: avaliação do efeito das substâncias húmicas em plantas de milho submetidas a estresse salino

a) Parâmetros de crescimento e taxa de crescimento relativo

Produção de massa seca e altura das plantas – a aplicação de substâncias húmicas (SH) reduziu os efeitos da salinidade na produção de massa seca da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR) (Figura 13 A e B). Aos 15 DAE não foram observados os efeitos da salinidade nos parâmetros em estudo, mas existiu um efeito significativo das SH-Vc no tratamento salinizado (ES+SH-Vc) causando incrementos de 13 e 64 % no conteúdo de MSPA e MSR respectivamente em relação ao tratamento salinizado (ES) (SH-Vc).

Entretanto aos 21 DAE a não aplicação de SH demonstrou os efeitos da salinidade no conteúdo de MSPA e MSR causando perdas de massa de 22 e 40% em relação ao controle. Perdas de biomassa que tem relação com estudos prévios em milho (BILLAH et al., 2017), feijão (AYDIN; KANT; TURAN, 2012), noz (AKÇA; SAMSUNLU, 2012) e castanhas (AMBEDE et al., 2012) submetidas a estresse salino.

Quando as SH das três origens foram aplicadas nas plantas sob estresse salino, o efeito da salinidade diminuiu, gerando acréscimos do conteúdo de biomassa seca em relação ao tratamento salinizado (ES) de 30, 31 e 26% para MSPA e de 70, 67 e 71% no caso da MSR para os tratamentos ES+SH-And, ES+SH-Org e ES+SH-Vc, respectivamente, (SH-Org>SH-And>SH-Vc) (Figura 13A e B).

No segundo momento avaliado, a razão MSR/MSPA apresentou os menores valores para o tratamento salinizado (ES) (0,8 g raiz por g parte aérea) em relação aos tratamentos

salinos com adição de SH das três origens, nas quais houve uma maior participação do sistema radicular na produção de massa seca, exibindo valores médios de 1 (Figura 13C).

A aplicação de SH, independentemente de sua origem, reduziu os efeitos da salinidade no sistema radicular, ao estimular seu desenvolvimento. Resultados que tem relação com os efeitos das SH no desenvolvimento radicular de diversas espécies, sobretudo no crescimento inicial (BALDOTTO et al., 2009; CANELLAS e OLIVARES, 2014). Conseqüentemente, um maior desenvolvimento do sistema radicular equivale a uma maior possibilidade de exploração no solo e maior tolerância a diferentes tipos de estresse ambiental (BERBARA e GARCÍA, 2014).

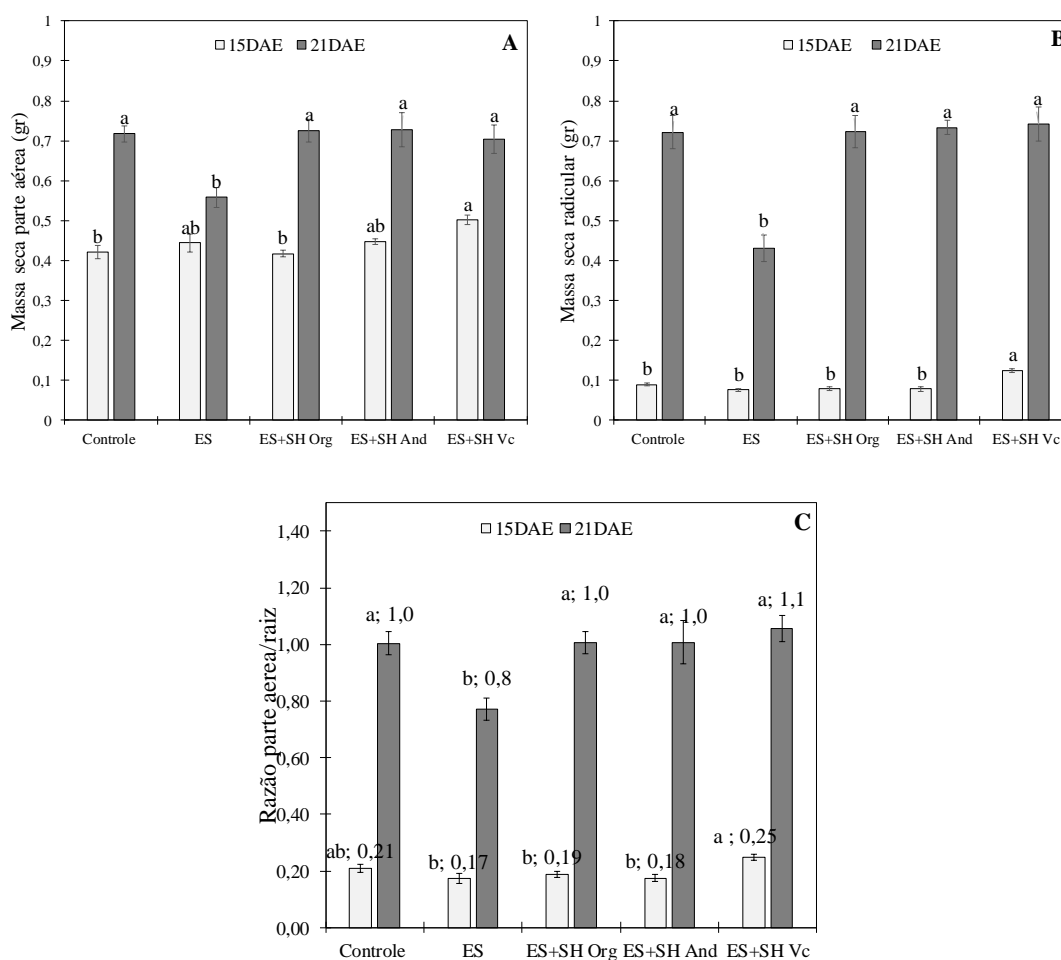


Figura 13. Produção de massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e razão raiz/parte aérea média de plantas de milho submetidas durante 15 e 21 dias a estresse salino (ES) e aplicação de substâncias húmicas (SH) de três origens diferentes. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A altura de plantas de milho submetidas a estresse salino e adição de substâncias húmicas aos 15 e 21 DAE são apresentados na Figura 14. Nos primeiros 15 DAE embora não existiu um efeito significativo da salinidade (ES), foi observado o efeito das SH nos tratamentos salinizados ES+SH-And e ES+SH-Vc com incrementos de 14 e 8% na altura, comparadas com os salinizados.

Na segunda avaliação aos 21 DAE foi mais notável os efeitos da salinidade verificando-se uma redução de 14% da altura nas plantas sob estresse salino sem adição de SH, entretanto as plantas sob estresse salino com adição de SH dos tratamentos ES+SH-Org e ES+SH-Vc e SH-And registraram acréscimos na altura de 11, 14 e 3%, respectivamente, em relação ao tratamento sob estresse salino, mas só existiu significância estatística para o tratamento ES+SH-Vc (SH-Vc>SH-Org>SH-And).

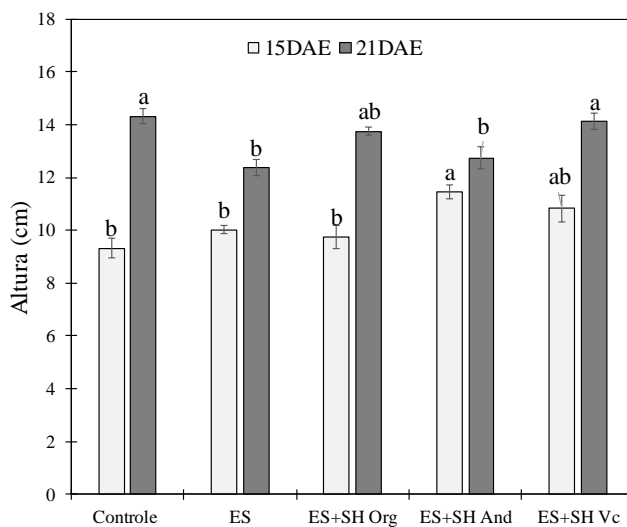


Figura 14. Altura média de plantas de milho submetidas durante 15 e 21 dias a estresse salino (ES) e aplicação de substâncias húmicas (SH) de três origens diferentes. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias a seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

b) Pigmentos fotossintéticos

Na Figura 15 são apresentadas as concentrações de pigmentos fotossintéticos das plantas com aplicação de SH em condições de estresse salino aos 21 DAE. A aplicação de SH nas plantas sob estresse salino exerceu um efeito que variou com a origem das SH.

Verificou-se que a aplicação de SH nas plantas sob estresse salino (ES+SH-Org e ES+SH-Vc) estimularam significativamente a produção de pigmentos a, a+b em relação às plantas salinizadas (ES) e ao controle, entretanto os carotenóides apresentaram um acréscimo não significativo para estes tratamentos. O teor de clorofila b não apresentou um comportamento relacionado com a salinidade, mas no tratamento ES+SH-Org foi o que mais incrementou o conteúdo deste pigmento. O tratamento ES+SH-And apresentou o menor estímulo na produção de pigmentos em relação a todos os tratamentos (Figura 15).

A aplicação de SH dos tratamentos SH-Org e SH-Vc em plantas sob estresse salino exerceram um estímulo porcentual em relação ao tratamento sob estresse salino sem SH de 29 e 21% no teor de clorofila a, de 22 e 9% de clorofila a+b e de 18 e 8% de carotenóides para cada SH (SH-Org>SH-Vc).

O incremento nos teores de clorofila a, a+b e carotenóides dos tratamentos salinizados e com adição de substâncias húmicas observado, tem relação com a capacidade das SH de incrementar a área foliar e, conseqüentemente, uma maior eficiência fotossintética segundo Canellas e Olivares. (2014). Embora estes efeitos sejam variáveis e relacionados com sua concentração (NARDI et al., 2002), estado fisiológico da planta (MOYA et al., 2016) e origem do extrato húmico (YANG et al., 2004).

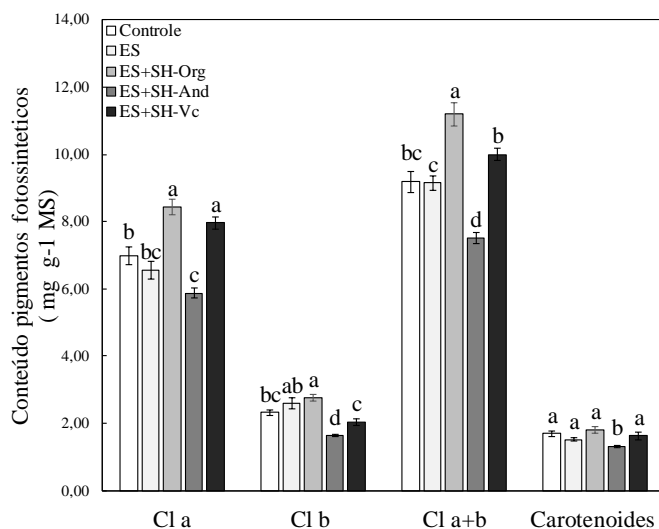


Figura 15. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plantas de milho aos 21 DAE submetidas a estresse salino (ES) e aplicação de substâncias húmicas (SH) de três origens diferentes. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em condições de estresse salino o estímulo no teor de pigmentos causado pelas SH permitiria à planta uma melhor eficiência fotossintética, permitindo-lhe um maior acúmulo de biomassa seca (Figura 13). Resultados que tem concordância com estudos prévios realizados por Aydin et al. (2012) em plantas de feijão, com acréscimos de mais de 100% na produção de biomassa e pigmentos fotossintéticos nas plantas tratadas com AH sob estresse salino em relação às não tratadas com AH, efeitos que foram atribuídos pelo mesmo autor à capacidade de armazenar sais dos AH por longos períodos, diminuindo os efeitos da salinidade. O efeito protetor ante o estresse salino também foi observado por Bakry et al., (2014b) em plantas de linho salinizadas e tratadas com AH, as quais tiveram um melhor rendimento e estímulo de parâmetros morfológicos e de conteúdo de pigmentos em relação às não salinizadas.

c) Taxa de crescimento relativo

Os valores de TCR dos tratamentos salinos com adição de substâncias húmicas foram maiores para ES+SH-Org ($0,9 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), ES+SH-And ($0,8 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e ES+SH-Vc ($0,6 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) em relação aos tratamentos sob estresse salino sem adição de substâncias húmicas ($0,4 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (Figura 16).

Em termos percentuais a TCR foi inferior em 57% para a parte aérea e 17% para a radicular para o tratamento sob estresse salino em relação ao controle, entretanto a aplicação de SH dos tratamentos ES+SH-Org, ES+SH-And e ES+SH-Vc incrementou em 140, 111 e 46% a TCR-foliar e em 28, 29 e 3% a TCR-radicular (SH-Org > SH-And > SH-Vc).

A redução da TCR das plantas salinizadas (ES) observado tem relação com o apresentado por outros estudos, onde foram encontrados baixos valores de TCR em plantas de milho submetidas a estresse salino (100mM) e alto conteúdo de Na^+ no sistema radicular (WILLADINO et al., 1999; NETO E TABOSA, 2000), assim como reduções da TCR de 70% em plantas de goiabeira sob efeito de 150 mM de NaCl (TÁVORA et al., 2001).

Os resultados da TCR podem ser relacionados com o acúmulo de biomassa seca e o teor de pigmentos fotossintéticos estimulado pelas substâncias húmicas que reduziram os efeitos da salinidade significativamente.

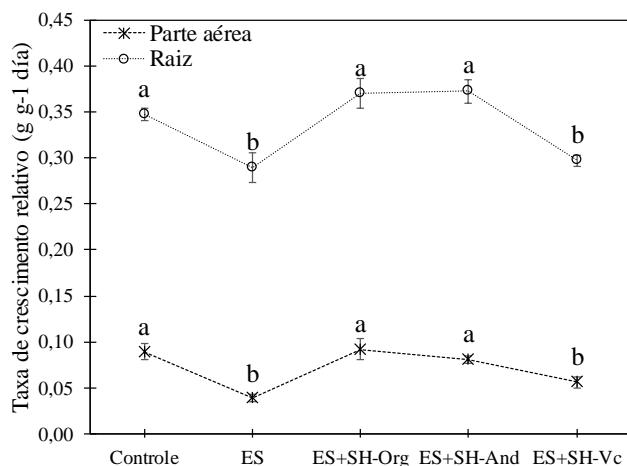


Figura 16. Taxa de crescimento relativo foliar (TCRF) e radicular (TCRR) de plantas de milho submetidas a estresse salino (NaCl-100mM) e substâncias húmicas de três origens. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

O comportamento registrado para o tratamento com SH-Vc poderia ser explicado pelo fato de que este tratamento acumulou os maiores valores de massa seca radicular e da parte aérea, tanto no primeiro como no segundo momento de avaliação. Considerando que a TCR é em função do crescimento inicial por um intervalo de tempo segundo Reis e Muller, (1979) e está diretamente relacionado com o tamanho alcançado no período anterior. Pelo que não pode ser considerado como um índice negativo nestas condições. Em condições de crescimento normal a TCR tem tendência a se reduzir com o tempo pois as plantas reduzem seu crescimento gradativamente.

d) Teor relativo de água

A avaliação do teor relativo de água (TRA) é considerada uma das avaliações mais utilizadas para determinar os efeitos fisiológicos do déficit de água nas células vegetais. Ele mede o estado hídrico da planta e expressa a quantidade absoluta de água que ela precisa para alcançar a saturação total em um momento determinado (GONZÁLES E GONZÁLES-VILAR, 2001).

A Figura 17 mostra o teor relativo de água (TRA) das plantas de milho submetidas a estresse salino e sob adição de SH das três origens. O TRA apresentou uma redução no tratamento com salinidade, enquanto os tratamentos sob estresse salino com substâncias húmicas responderam com porcentagens de TRA maiores. Este comportamento foi similar em todas as SH e significativamente similar ao controle. As plantas sob estresse salino com adição de substâncias húmicas apresentaram um incremento na porcentagem de TRA de 12,79, 8,79, e 8,35% para os tratamentos ES+SH-Org, ES+SH-And e ES+SH-Vc, respectivamente, quando comparadas com as plantas salinizadas sem adição de SH.

De acordo com os resultados obtidos a aplicação de SH independentemente de sua origem reduziria os efeitos de ajustamento osmótico em plantas salinizadas de milho aos 21 DAE ao incrementar o TRA, aumentando a disponibilidade de água para as plantas.

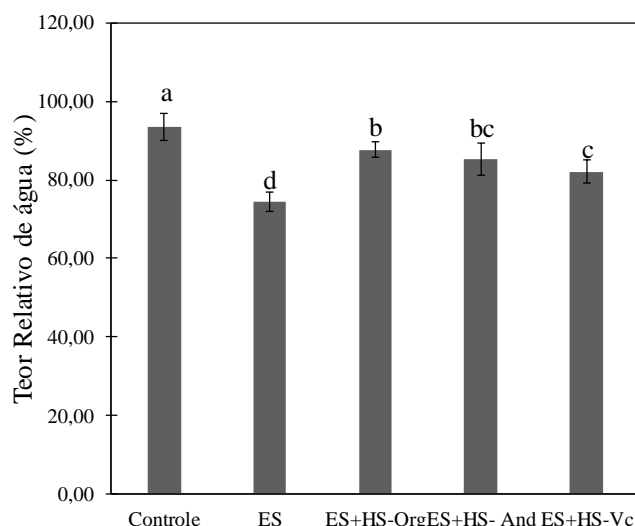


Figura 17. Teor relativo de água (TRA) de plantas de milho submetidas durante 21 dias a estresse salino (ES) e aplicação de substâncias húmicas (SH) de três origens diferentes. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

e) Permeabilidade relativa

A extensão das lesões das membranas sob efeito do estresse salino (ES) pela medição indireta da permeabilidade relativa foliar e radicular das plantas aos 21 DAE é apresentada na Figura 18. Observou-se que a permeabilidade relativa radicular (PR-Radicular) e foliar (PR-Foliar) das plantas sob estresse salino foi de 68 e 48% valores maiores que a PR do controle e alguns tratamentos das plantas salinizadas e com adição de SH.

A aplicação de SH das três origens nas plantas sob estresse salino (ES) reduziu a PR-radicular significativamente. A redução da PR-radicular foi de 37, 29 e 27% para os tratamentos ES+SH-Vc, ES+SH-And e ES+SH-Org, respectivamente, em relação ao tratamento salinizado. No caso da PR-foliar foi observado uma redução significativa para os tratamentos com ES+SH-Org, ES+SH-And de 26 e 11% comparada com o tratamento salinizado (ES), o que não foi observado nas plantas tratadas com ES+SH-Vc que apresentou incrementos de 17% na PR em relação ao tratamento salino.

A exposição à salinidade incrementa a permeabilidade das membranas e, consequentemente, os teores de prolina em milho, segundo Aydin et al. (2005). Os resultados observados no estudo poderiam indicar que as SH isoladas de Andisol e Organossolo (ES+SH-And e ES+SH-Org) foram mais eficientes, reduzindo os efeitos da salinidade tanto na permeabilidade radicular como a foliar, por outro lado as substâncias húmicas de Vermicomposto (ES+SH-Vc) exerceram um efeito bem definido, unicamente a nível radicular. O decréscimo da permeabilidade pela ação das SH observado, tem similaridade com estudos realizados por Aydin et al. (2012) quem observou que a aplicação de AH em plantas de feijão salinizadas reduziu significativamente a PR foliar.

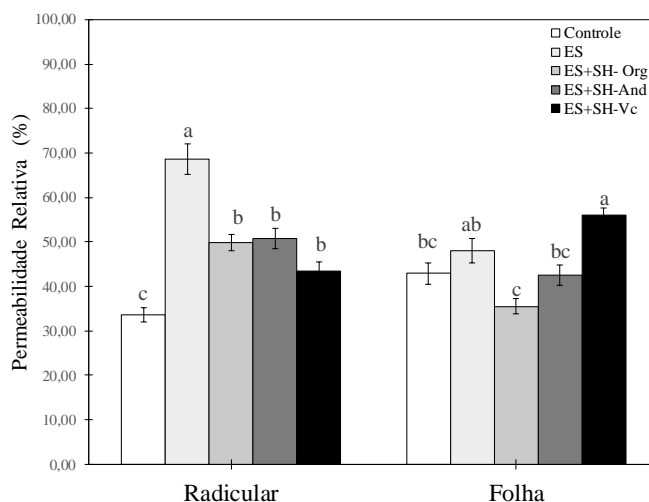


Figura 18. Porcentagens de permeabilidade radicular de plantas de milho submetidas a estresse salino (100 mM) e substâncias húmicas de três fontes aos 21 DAE. Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para quatro réplicas, médias no fator avaliado (raíz e folha) seguidas de a mesma letra não apresentam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A aplicação de SH em plantas sob estresse salino reduziu significativamente os efeitos negativos da salinidade em parâmetros morfológicos, como o acúmulo de massa seca, altura e taxa de crescimento relativo, além de melhorar as relações osmóticas nas plantas salinizadas. Os mecanismos fisiológicos protetores das SH ante diversos tipos de estresse ainda estão em estudo. Mas são relacionados, em parte com incrementos no teor de prolina pela ação dos AH (LADAN MOGHADDAM e SOLEIMANI, 2012) a qual também é produzida pelas plantas com tolerância à salinidade como um mecanismo de adaptação (TURAN E AYDIN, 2005; BERTELI et al., 1995). Ante outro tipo de estresse como o hídrico, a aplicação de AH manteve os níveis de ácido abscísico em valores às plantas controle (GARCIA et al., 2014).

4.6. CONCLUSÕES

A aplicação das substâncias húmicas das três origens (Organossolo, Andisol e Vermicomposto) exerceram um efeito inibidor da germinação, IVG e um acréscimo nas porcentagens de plântulas anormais em todos os tratamentos. O efeito inibidor foi mais evidente nas substâncias húmicas extraídas de solos (Andisol e Organossolo). Apesar do efeito inibidor observado na germinação, a aplicação das três substâncias húmicas incrementou o crescimento radicular e a produção de biomassa seca das plântulas normais em concentrações de 10 mg C L⁻¹.

As substâncias húmicas aplicadas às plântulas de milho após a germinação incrementaram o crescimento radicular, a emissão de raízes laterais e acúmulo de massa seca nas plântulas de milho em concentrações de 5, 10 e 20 mg C L⁻¹ para SH-And, SH-Vc e SH-Org respectivamente. O estímulo de cada SH foi na seguinte ordem: SH-Org>SH-Vc>SH-And.

A aplicação de substâncias húmicas reduziu os efeitos do estresse salino (NaCl 100mM) ao incrementar a produção de biomassa seca, teor de pigmentos fotossintéticos, teor de água e reduzir a permeabilidade radicular. Não sendo observada uma relação com a origem das substâncias húmicas.

5. CAPÍTULO III

INTERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE DIFERENTES ORIGENS E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DE MILHO

5.1. RESUMO

O presente capítulo teve como objetivo avaliar a influência da interação de substâncias húmicas de três origens: Organossolo (SH-Org), Andisols (SH-And) e Vermicomposto (SH-Vc) e do fungo micorrízico *Denticulata heterogama*, na cultura do milho. Para cumprir tais propósitos, foram medidos nas plantas parâmetros bioquímicos, morfológicos, nutricionais e de colonização do FMA. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na UFFRJ, Seropédica-RJ. Utilizou-se como substrato uma mistura de dois solos de baixa fertilidade esterilizados por solarização, e uma vez comprovada a ausência de esporos de FMA nativos, foi estabelecido o experimento. Utilizaram-se sementes de milho híbrido BR-3025 e como solo-inóculos esporos de *D. heterogama*. As concentrações de SH utilizadas foram de 5, 10 e 20 mg C L⁻¹ para SH-And, SH-Vc e SH-Org, respectivamente, e foram aplicadas aos 15, 25 e 45 DAE via radicular. As avaliações foram realizadas aos 50 DAE. Os resultados mostram que a aplicação de substâncias húmicas e a inoculação com *D. heterogama* estimularam significativamente parâmetros morfológicos como conteúdo de biomassa em relação aos tratamentos não inoculados. O conteúdo de carboidratos e proteínas totais também foi estimulado por esta interação. Observou-se um maior teor foliar de 10 dos 11 nutrientes avaliados nas plantas inoculadas com FMA e com adição de SH em relação às não inoculadas. Embora as três SH tenham exercido algum estímulo nos diferentes parâmetros avaliados, a aplicação de SH-Vc e inoculação com FMA foi a que apresentou um estímulo, mais sobressaliente, o qual foi confirmado com uma alta eficiência micorrízica e que pode estar relacionado com a maior abundância de arbúsculos observados. Os parâmetros densidade de esporos e teor de glomalina total foi estimulado pela aplicação das três SH sem uma influência marcada em relação à origem da SH.

Palavras-chave: Simbioses. Colonização micorrízica. Absorção de nutrientes.

5.2. ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of the interaction of humic substances from three origins: Organosol (SH-Org), Andisols (SH-And) and Vermicomposto (SH-Vc) and mycorrhizal fungus *Denticulata heterogama*. To fulfill these purposes, biochemical, morphological, nutritional and FMA colonization parameters were measured in the plants. The experiment was conducted in a greenhouse at UFFRJ, Seropédica-RJ. A mixture of two low fertility soils sterilized by solarization was used as the substrate, and once the absence of native AMF spores was proven, the experiment was established. Seeds of hybrid corn BR-3025 and as soil-inoculum spores of *D. heterogama* were used. The concentrations of HS used were 5, 10 and 20 mg C L⁻¹ for SH-And, SH-Vc and SH-Org, respectively, and were applied at 15, 25 and 45 days post emergency (DPE) via root. The evaluations were performed at 50 DPE. The results show that the application of humic substances and inoculation with *D. heterogama* significantly stimulated morphological parameters as biomass content in relation to uninoculated treatments. The carbohydrate and total protein content was also stimulated by this interaction. A higher leaf content of 10 of the 11 nutrients evaluated in the plants inoculated with FMA and with addition of SH in relation to those not inoculated was observed. Although the three SHs exerted some stimulus on the different parameters evaluated, the application of SH-Vc and inoculation with FMA was the one that presented a more sparing stimulus, which was confirmed with a high mycorrhizal efficiency and that may be related to the greater abundance of observed shrubs. The parameters spore density and total glomalin content were stimulated by the application of the three HS without a marked influence in relation to the SH origin.

Keywords: Symbioses. Mycorrhizal colonization. Nutrients absorption.

5.3. INTRODUÇÃO

Ante o cenário atual no mundo, de degradação dos recursos naturais produto da industrialização da agricultura, vem sendo estudados com maior interesse o uso de métodos alternativos para produzir culturas respeitando os sistemas naturais e as interações entre seus fatores locais de clima-solo-biota. Dentre destes fatores a matéria orgânica do solo (MOS) e a biota do solo tem gerado um grande interesse ao ser a base da fertilidade e saúde do solo.

A matéria orgânica é um fator de grande importância no desenvolvimento da biota do solo responsável pela mobilização e disponibilização de nutrientes para as plantas, onde estão incluídos os fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Os FMA são um importante componente da microbiota do solo, capazes de estabelecer associações simbióticas com mais de 90% das plantas terrestres e com uma ampla distribuição nos diferentes habitats do mundo (BERUDE et al., 2015). Os FMA têm a capacidade de afetar positivamente o crescimento das plantas ao auxiliar na absorção de nutrientes e água do solo outorgando-lhe maior capacidade de sobrevivência e tolerância a diferentes tipos de estresse (SMITH e READ, 2008), além de aumentar a decomposição e a ciclagem de carbono e nutrientes, pelo que desempenham um papel chave no funcionamento e sustentabilidade dos agroecossistemas (TRUBER, 2013; SILVA, 2016).

A adição de diferentes fontes de componentes orgânicos, como celulose, ou compostagens em substratos não esterilizados ou em solos, tem gerado estímulos na quantidade de hifas intra e extraradiculares (GRYNDLER et al., 2002), que foi confirmado logo após em um sistema hidropônico (GRYNDLER et al., 2005). Em condições axênicas, a aplicação de AH estimulou a produção de esporos de *Glomus proliferum* e o crescimento de *Lunaria crusiata* (NOBRE et al., 2013), assim como a colonização micorrízica de *Glomus clarum* em raízes de trevo e manjeriço (LIMA, 2008).

Os efeitos das substâncias húmicas no desenvolvimento vegetal e no solo pode acontecer por diferentes formas (NARDI e PIZZEGHELLO, 2002), bem seja com um efeito similar ao auxínico ou relacionados com suas características estruturais. As substâncias húmicas ao ser o maior componente da matéria orgânica do solo podem estar em maior contato com as hifas dos FMA (GRYNDLER et al., 2009) o que poderia estimular a micorrização além do crescimento vegetal por um aumento da atividade enzimática e do metabolismo do nitrogênio (LIMA, 2008).

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da interação de substâncias húmicas de três origens (SH-Org, SH-And e SH-Vc) e do fungo micorrízico *Denticulata heterogama*, no desenvolvimento e nutrição da cultura do milho.

5.4. MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1. Material vegetal e condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, as plantas foram cultivadas durante 50 dias em vasos de 5 L no período de setembro-novembro de 2016, no Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ. Durante o experimento as condições ambientais no interior da casa de vegetação foram medidas diariamente com um Datalogger (Marca AKSO AK172). A temperatura média variou entre 24 e 29°C e a umidade relativa entre 64 e 80% (Figura 19).

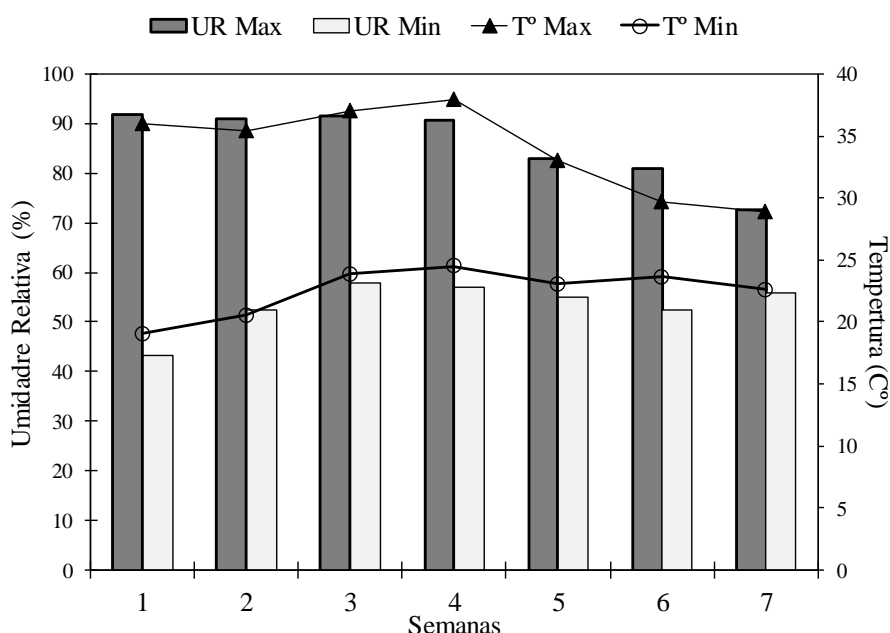


Figura 19. Variações médias semanais de temperatura máxima e mínima (linhas) e de umidade relativa do ar (barras) registradas durante a condução do experimento em casa de vegetação. Seropédica, RJ. UFRRJ. Outubro-Novembro de 2016.

a) Cultivar de milho e microrganismos

As sementes de milho (*Zea mays L.*) híbrido BR-3025 foram fornecidas pela EMBRAPA-Agrobiologia, Seropédica, RJ. A variedade foi selecionada devido a sua rusticidade e produção em sistema agroecológico (SIPA).

A espécie de FMA utilizada foi *Dentiscutata heterogama* (T.H. Nicolson & Gerd.) Sieverd., F.A. de Souza & Oehl., linhagem A2 (CNPAB 002) proveniente da Coleção de Fungos Micorrízicos da Embrapa Agrobiologia (COFMEA), Seropédica, RJ. A mesma foi aplicada na forma de solo-inóculo com uma densidade de 120 esporos/g de solo.

b) Características do solo-substrato

Como substrato utilizou-se uma mistura da camada sub-superficial (20-30 cm) de dois solos de baixa fertilidade localizados na UFRRJ e classificados como Planossolo e Argissolo. Utilizou-se as camadas subsuperficiais dos solos para reduzir a interferência das substâncias húmicas próprias da camada superficial e a presença de fungos micorrízicos nativos. A terra

coletada foi desinfetada por solarização durante 30 dias, com viradas periódicas, com a intenção de reduzir o potencial do inóculo nativo de FMA (RANDING et al., 2009). Técnicas de esterilização, como autoclavagem, embora mais eficientes, foram evitadas visando a não alteração das características químicas da terra coletada e a simulação das condições que se dão nos ambientes agrícolas quando realizadas inoculações de FMA.

A presença de esporos de FMA nativos no substrato após a referida desinfecção foi avaliada. Para isso, 10 amostras de 50g de substrato foram coletadas e realizou-se a extração de esporos de FMA, seguindo a metodologia proposta por Gerdeman e Nicolson (1993). Os esporos foram quantificados em microscópio estereoscópico. Para a identificação das espécies presentes no substrato montaram-se lâminas de microscopia utilizando como solução de montagem polivinil-lacto-glicerol (PVLG) e PVLG + reagente de Melzer. Seguidamente, prosseguiu-se à observação das lâminas contendo os esporos em microscópio óptico. As espécies presentes no substrato foram identificadas com base nas características morfológicas dos esporos e consulta de bibliografia especializada (INVAM, 2018). Foi detectada a presença de esporos, principalmente do gênero *Glomus*, porém velhos e não viáveis. Não foram observados esporos da espécie *Dentiscutata heterogama*, a qual posteriormente foi inoculada no experimento.

As características químicas do substrato utilizado no experimento são apresentadas na Tabela 9. A adubação do substrato foi realizada semanalmente com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada com ½ concentração de fósforo (P) e diluída a 25% durante a fase de crescimento inicial (2 semanas após emergência).

Tabela 9. Características químicas do substrato utilizado no experimento.

ID	pH	P	K	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al	H + Al	C
		mg/dm ³		cmol _c /dm ³			g/kg	
Substrato	5,90	25	34	3,3	1,7	0,1	4,2	10,65

Análises realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo da UFRRJ (EMBRAPA, 2009).

c) Desenho experimental

O delineamento experimental foi inteiramente causalizado, com arranjo fatorial 4 x 2, com cinco repetições por tratamento. O primeiro fator foram as 3 substâncias húmicas (SH): Organossolo (SH-Org), Andisol (SH-And) e Vermicomposto (SH-Vc) mais 1 controle e o segundo fator foram as interações biológicas (inoculado e não inoculado com FMA).

d) Cultivo das plantas de milho

Para a condução do experimento utilizaram-se vasos contendo 5 kg do substrato acima descrito. Semearam-se cinco sementes de milho, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaClO) 0,5 %. No momento da semeadura, nos tratamentos com inoculação adicionou-se 1g de inóculo de FMA contendo aproximadamente 120 esporos de *D. heterogama* na cova de cada semente, totalizando aproximadamente 720 esporos/vaso. Após a emergência das plantas foi realizado um desbaste aos 10 dias após a emergência (DAE) deixando apenas 2 plantas/vaso.

As doses de substâncias húmicas utilizadas foram de 20 mg C L⁻¹ para as extraídas de Organossolo (SH-Org), 5 mg C L⁻¹ para as extraídas de Andisol (SH-And) e 10 mg C L⁻¹ para as de Vermicomposto (SH-Vc). Estas doses foram previamente determinadas como ótimas para cada SH no ensaio de doses resposta (ver Capítulo II). Foram realizadas três aplicações

radiculares de SH, aos 15, 30 e 45 DAE das plantas de milho. Colocaram-se 20 ml/planta/vaso contendo cada concentração segundo a SH aplicada. A umidade do solo foi mantida ao 70% da capacidade de campo do substrato.

O experimento foi concluído aos 50 DAE sendo colhidas 40 plantas para as avaliações morfológicas, bioquímicas e nutricionais.

e) Avaliações morfológicas

Passados 50 DAE procedeu-se a coleta do experimento. A altura das plantas foi determinada com auxílio de uma trena métrica considerando o corte no recuo do solo até a folha +1. O diâmetro do colmo foi medido usando um paquímetro digital. Imediatamente, a parte aérea das plantas (após separação das folhas e o caule) foi colocada em sacos de papel e secada em estufa de circulação forçada de ar (60°C) por 72 horas até atingir peso contante. Posteriormente, avaliou-se a massa seca da parte aérea (MSPA) utilizando uma balança analítica.

As raízes foram removidas do substrato e lavadas em água corrente. Aproximadamente, 1g de raízes finas foi retirada para posterior avaliação da colonização micorrízica. O restante do sistema radicular foi colocado em sacos de papel e secado em estufa, como referido para a parte aérea, para determinação de massa seca radicular (MSR).

5.4.2. Quantificações bioquímicas foliares: carboidratos totais (CT), carboidratos redutores (CR) e proteínas (PT)

Foram coletadas amostras foliares de aproximadamente 1 g da última folha completamente expandida. No momento da coleta as folhas foram acondicionadas em papel alumínio e mantidas em nitrogênio líquido. Uma vez no laboratório, as mesmas foram conservadas em ultrafreezer (-80°C) até a realização das determinações.

Aproximadamente 0,200 mg de tecido foliar foi macerado e em seguida acrescentados 20 ml de água destilada quente e 0,5 g de carvão ativado e levado para aquecimento até descoloração. Seguidamente o líquido foi filtrado e a quantificação realizada em espectrômetro Shimatzu 1800 UV. Todos os resultados foram expressos em mg g⁻¹ de massa fresca de tecido foliar.

a) Carboidratos redutores (CR)

A determinação de CR foi realizada segundo a metodologia descrita por Noelting & Bernfeld (1948). Adicionou-se ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) e procedeu-se à leitura no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm. Foi usada uma curva padrão realizada a partir de concentrações conhecidas de glicose.

b) Carboidratos totais (CT)

Os CT foram determinados segundo o descrito por Dubois et al. (1956), adicionando fenol 5% e ácido sulfúrico ao extrato. Após 15 minutos de repouso, foi lida a absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 490 nm. Foi usada uma curva padrão realizada a partir de concentração conhecidas de glicose.

c) Proteínas totais

O teor de proteínas foi obtido pela reação do reagente Biureto, sendo adicionado ao extrato e após 10 minutos lida a absorbância a um comprimento de onda de 545 nm. Utilizou-se como curva padrão desenhada a partir de concentrações conhecidas de soro de albumina.

d) Determinação de pigmentos fotossintéticos

A determinação de pigmentos foi realizada segundo a metodologia de Arnon (1949). Pesaram-se aproximadamente 0,200 mg de cada replica e anotou-se o peso de cada amostra para posterior determinação de mg de pigmentos/g de massa seca. Para a determinação da porcentagem de massa seca foi pesado 1g de folha e colocado em estufa durante 24 horas a 105°C até peso constante.

Cada amostra foliar previamente pesada foi colocada em tubos Falcom com capacidade para 50 ml contendo 10 ml de acetona a 80% (v/v) e deixada 72 horas em refrigeração no escuro. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimatzu UV-vis 1800) em absorbâncias de 470, 645, 663 e 750 nm, usando a acetona como branco. Os teores de pigmentos foram calculados baseados nas equações descritas por Lichtenthaler. (1987) usando as fórmulas:

$$\begin{aligned} \text{Chl } a &= 12,25 (\text{Abs } 663 \text{ nm}) - 2,79 (\text{Abs } 646 \text{ nm}) \\ \text{Chl } b &= 21,50 (\text{Abs } 645 \text{ nm}) - 5,10 (\text{Abs } 663 \text{ nm}) \\ \text{Chl } a + b &= 7,15 (\text{Abs } 663 \text{ nm}) - 18,71 (\text{Abs } 646 \text{ nm}) \\ \text{Carot} &= [1000(\text{Abs } 470 \text{ nm}) - 1,82(\text{Cl } a) - 85,02(\text{Cl } b)] / 198 \end{aligned}$$

Onde Chl e Carot são clorofila e carotenóides, respectivamente; Abs absorbância nas diferentes longitudes de onda.

e) Determinação de macro e micronutrientes em tecidos foliares

Além das variáveis morfológicas, realizaram-se análises referentes ao estado nutricional das plantas. Para tal finalidade, foram coletadas amostras foliares do terço médio da última folha totalmente expandida e ativa e, colocadas para secar em estufa de ar de circulação forçada a 70°C até atingir peso constante. As amostras secas foram moídas em moinho tipo Willey e realizada uma solubilização (digestão) nitro-perclórica para a determinação de P, K, S, Ca, B, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn e sulfúrica para a determinação de N. As determinações analíticas foram realizadas por espectrofotometria de absorção atômica (K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn), espectrofotometria colorimétrica (P e B), turbimetria (S) e pelo método semimicro-Kjeldahl (N) (Malavolta et al., 1997).

f) Efeitos das substâncias húmicas na colonização micorrízica, densidade de esporos e teor de glomalina

Ao finalizar o experimento foram realizadas avaliações no sistema radicular e no solo de todos os tratamentos. Nos tratamentos inoculados foi determinada a colonização micorrízica, densidade de esporos, teores glomalina do solo (Bradford) em sua fração facilmente extraível. As determinações foram feitas em três repetições em duplicata, utilizando-se a média das duas réplicas para as análises estatísticas. Também foi avaliada a colonização micorrízica nos tratamentos não inoculados com a finalidade de verificar a eficiência da solarização.

g) Avaliação da Colonização Micorrízica (CM)

As raízes finas das plantas tratadas com SH e com FMA foram coletadas e armazenadas em álcool (70%). Posteriormente, procedeu-se à clarificação e coloração das mesmas (KOSKE E GEMMA, 1989; GRACE E STRIBLEY, 1991) para observação das estruturas micorrízicas.

A colonização micorrízica foi estimada segundo a técnica descrita por Trouvelot et al. (1986). Na qual, 15 fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento foram colocados em uma lâmina de microscopia, preparando duas amostras (30 segmentos de raízes no total). Os segmentos foram observados em microscópio óptico (Olimpus BX41) e a taxa de colonização avaliada de acordo com os intervalos de classes indicados na Figura 22, para estimar o nível de colonização micorrízica de cada fragmento de raiz.

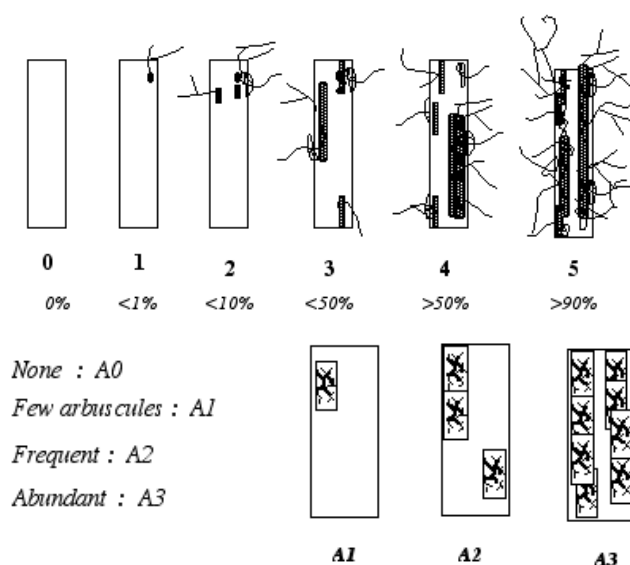


Figura 22. Escala de avaliação da porcentagem de colonização micorrízica e abundância de arbúsculos em raízes. Trouvelot et al., 1986

Logo após foram calculados os seguintes parâmetros:

Frequência micorrízica no sistema radicular:

$$F\% = (NFM/NTF) \times 100$$

Intensidade de colonização micorrízica no sistema radicular:

$$M\% = ((95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / NTF)$$

Intensidade de colonização micorrízica em fragmentos radiculares

$$m\% = ((M \times (NFT)) / NFM)$$

Onde: NMF= número de fragmento micorrizados; NTF= número total de fragmentos; n5=número de fragmentos avaliados, n4= número de fragmentos avaliados de 4.... etc.

Abundância de arbúsculos em partes micorrizadas de fragmentos de raízes:

$$a\% = ((100m_{A3} + 50m_{A2} + 10m_{A1}) / 100)$$

m_{A3} , m_{A2} , m_{A1} são a porcentagem de m , na escala $A3$, $A2$, $A1$ respectivamente com $m_{A3} = ((195n_{5A3} + 70n_{4A3} + 30n_{3A3} + 5n_{2A3} + n_{1A3}) / NTFM) \times 100/m$ e da mesma forma para $A2$ e $A1$

Abundância de arbúsculos no sistema radicular:

$$A\% = a \times (M/100)$$

h) Determinação de densidade de esporos (DE)

Os esporos foram extraídos de 50 gramas de solo segundo por peneiramento úmido (GERDEMANN e NICOLSON, 1963) seguido de duas centrifugações em água e sacarose 50% (JENKINS, 1964). A quantificação dos esporos, uma vez extraídos, foi realizada em microscópio estereoscópico. Para a identificação das espécies, com base na morfologia dos esporos, consultou-se bibliografia especializada como o Manual de Schenck e Pérez (1988) e a página web da International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM, 2018).

i) Determinação de gomalina facilmente extraível

O substrato de cada tratamento foi misturado. A partir disso, foram obtidas três réplicas de 1 g cada uma. As amostras foram processadas para a extração de proteína do solo reativa ao Bradford (BRSP) na fração facilmente extraível (GFE) (WRIGHT e UPADHYAYA, 1996; RILLING et al., 2001). A GFE foi obtida com 20 mM de citrato de sódio, pH 7.0 a 121°C, 1,5 atm, por 30 minutos. O extrato foi centrifugado a 10000 rpm/5 min para remoção de material insolúvel. A concentração de glomalina foi determinada pelo método de determinação de proteínas de Bradford. (1967), utilizando albumina bovina (SIGMA) em concentrações de 0-100 mg ml⁻¹ e as concentrações lidas em espectrofotômetro.

j) Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram submetidos a análises de variância com o teste F, pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014). Quando os efeitos foram significativos foi realizado um ANOVA e teste de Tukey para comparações de médias com um nível de significância $p < 0,05$.

No caso da porcentagem de colonização micorrízica, a densidade de esporos, a glomalina facilmente extraível e o carbono orgânico total realizaram-se análises de variância simples com o teste F e o teste Tukey para comparações múltiplas de médias com um nível de significância de $p < 0,05$ e processados pelo programa estatístico XLSTAT® 2017 versão 19.5. Os gráficos foram feitos no Microsoft Excel 2010.

5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1. Efeitos na morfologia; morfologia, massa seca, altura e diâmetro do caule

Os resultados demonstram o efeito da interação da aplicação de substâncias húmicas e o FMA *D. heterogama* (Figura 23).

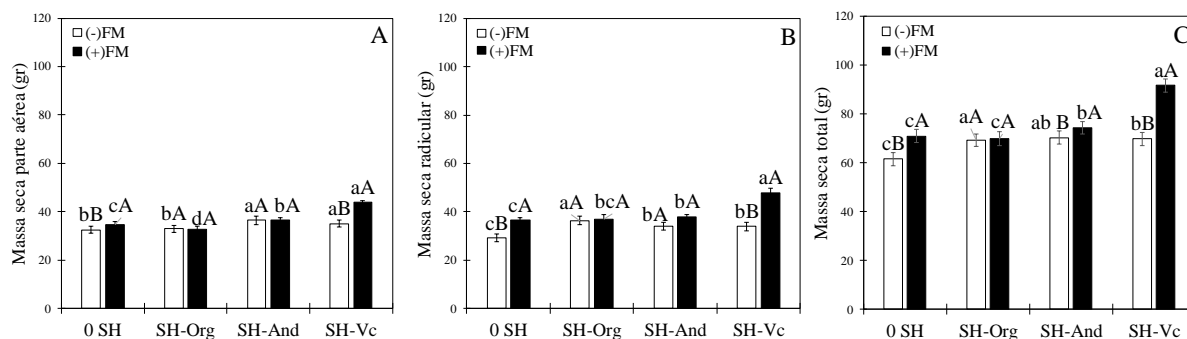


Figura 23. Massa seca da parte aérea e radicular das plantas de milho em função da origem da substância húmica e a inoculação com FMA (*D. heterogama*) (+FM) ou não (-FM), aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 5 repetições.

Pode ser observar que a aplicação de SH, independentemente de sua origem, incrementou a produção de massa seca da parte aérea (MSPA) nas plantas de milho tratadas. Porém, os efeitos foram significativos apenas para os tratamentos SH-And e SH-Vc com acréscimos de 12 e 8%, respectivamente (Figura 23A). A produção de massa seca radicular (MSR) foi estimulada pela aplicação das três SH em estudo, que em termos relativos representou 25 (SH-Org), 17 (SH-And) e 17% (SH-Vc) de acréscimo (Figura 23B). A massa seca total (MST) foi favorecida pelos três tratamentos de aplicação de SH, observando acréscimos de 13, 14 e 13% para as SH-Org, SH-And e SH-Vc (Figura 23C).

Por outro lado, a inoculação com o FMA *D. heterogama* e adição conjunta das substâncias húmicas SH-Vc (+FM) exerceu um incremento significativo da MSPA e MSR em 25 e 41% em relação ao tratamento SH-Vc sem inoculação micorrízica (SH-Vc-FM). A MST também foi estimulada significativamente pela associação micorrízica e a interação das substâncias húmicas SH-Vc (SH-Vc+FM) com incrementos de 31% em relação ao tratamento SH-Vc sem inoculação (SH-Vc-FM), como se mostra na Figura 23.

Embora as três SH em estudo estimularam o acúmulo de biomassa seca, mas aquela obtida a partir de vermicomposto (SH-Vc) foi a que mais favoreceu esta variável. Este efeito positivo foi intensificado quando a aplicação da SH-Vc foi acompanhada da inoculação com o FMA *D. heterogama* onde foi observado o melhor resultado quando comparado com os outros tratamentos.

Embora foi observado um efeito estimulante da inoculação com *D. heterogama* no incremento da biomassa seca, só a associação de FMA com SH-Vc (SH-Vc+FM) resultou em um incremento significativo em relação ao tratamento sem inoculação (SH-Vc-FM) e o restante dos tratamentos. Enquanto à interação da inoculação micorrízica e SH, existem poucos relatos na literatura. Destaca-se nesse sentido o estudo realizado por EL-KHATEEB; EL-LEITHY; ALJEMAA (2011). No mesmo, os autores verificaram um efeito sinérgico

positivo da aplicação conjunta de *Glomus* sp e AH comerciais, com incrementos significativos na produção de biomassa seca, altura e diâmetro do caule de plantas de *A. saligna*.

Na Figura 24, a seguir, são apresentados os efeitos da aplicação de substâncias húmicas de três origens e a inoculação com o FMA *D. heterogama* (+FM) na altura e diâmetro do caule de plantas de milho 50 DAE.

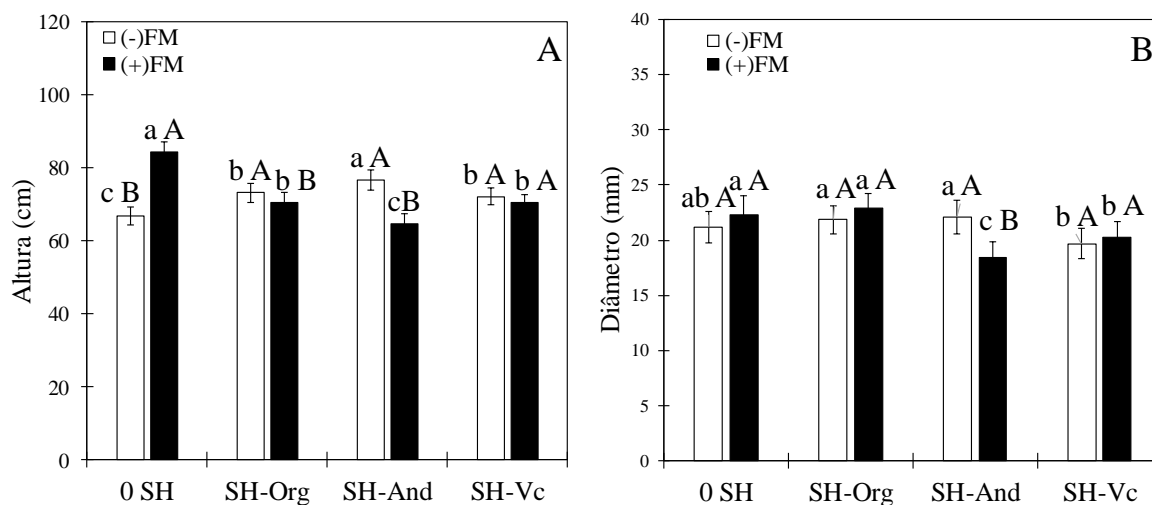


Figura 24. Altura e diâmetro médio das plantas de milho em função da origem da substância húmica e a inoculação com FMA (*D. heterogama*) (+FM) ou não (-FM), aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 5 repetições.

Os resultados demonstram que a altura das plantas foi significativamente estimulada pela aplicação das três SH avaliadas quando comparadas com o controle (0SH), seguindo a seguinte ordem: And>SH-Org>SH-Vc. A inoculação com *D. heterogama* (+FM) não proporcionou um efeito estimulante na altura dos tratamentos com SH (Figura 24A).

As três SH aplicadas estimularam a altura das plantas de milho (Figura 24A). Porém, nos tratamentos onde as plantas foram inoculadas com o FMA não foi observado o efeito da inoculação (+FM) em conjunto com a aplicação de SH sobre este parâmetro, quando comparado ao controle. A aplicação de SH-And exerceu um incremento de 15% na altura das plantas, as SH-Org aumentam este parâmetro em 10% e as SH-Vc em 8%, em relação ao controle (0SH-FM).

A aplicação de SH em plantas inoculadas com *D. heterogama* não teve um efeito significativo no diâmetro do caule das plantas de milho. Sendo inclusive registrado um decréscimo deste parâmetro nas plantas do tratamento SH-And com inoculação (+FM) (Figura 24B).

O estímulo da produção de biomassa seca e altura das plantas influenciados pelas SH observado neste trabalho tem concordância com resultados obtidos por estudos prévios. Onde a aplicação de AH isolados de vermicomposto orgânico gerou incrementos médios de 29% na altura das plantas de milho e acréscimos superiores a 100% no diâmetro do caule (Da ROCHA et al., 2013).

Em geral, pode ser observado que os parâmetros avaliados como massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca radicular (MSR) e massa seca total (MST) foram influenciados pela interação entre os fatores estudados SHs e FMA, interação que exerceu um incremento significativo destes parâmetros (Figura 23), sendo observado também que a inoculação com

D. heterogama (+FM) não apresentou um efeito estimulante na altura das plantas de milho, com relação aos tratamentos onde houve aplicação de SHs. Resultados similares onde nem sempre a interação de FMA resultou em um incremento da biomassa, ou outro parâmetro fitotécnico, ou variação na resposta da interação, foram observados por Salgado (2014) onde a inoculação dos FMA *D. heterogama* e *R. clarus* nas culturas de algodão e milho tiveram uma inibição no acúmulo de MSPA. Devido a existência de especificidade entre planta e hospedeiro (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006) não é apropriado assumir que associação sempre estimule o crescimento de planta (KLIRONOMOS, 2003), como observado nestes resultados, independentemente da interação com ou sem aplicação de substâncias húmicas, devendo ser levado em considerações vários fatores como a combinação entre espécies de FMAs e de plantas.

5.5.2. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos, carboidratos totais, redutores e proteínas totais em tecidos foliares

a) Pigmentos fotossintéticos

As concentrações de pigmentos fotossintéticos foram afetadas pela inoculação com *D. heterogama* e aplicação de SH, como se mostram na Tabela 10.

Tabela 10. Concentrações de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), clorofila a+b (Cl a+b) e carotenóides (Carot) em plantas de milho aos 50 DAE tratadas com substâncias húmicas e fungos micorrízicos.

SH	Cl a		Cl b		Cl a+b		Carotenóides	
	- FM	+FM	- FM	+FM	- FM	+FM	- FM	+FM
Sem	7,74 bA	7,89 aA	2,55 bA	2,77 aA	10,29 bA	10,46 aA	1,89 aA	1,74 aB
Org	7,96 abA	7,91 aA	2,68 bA	2,66 aA	10,65 bA	10,57 aA	1,88 aA	1,83 aA
And	8,28 aA	7,79 aB	3,90 aA	2,48 aB	12,14 aA	10,27 aB	2,02 aA	1,81 aB
Vc	8,41 aA	7,94 aB	3,97 aA	2,27 aB	12,38 aA	9,81 aB	2,03 aA	1,83 aB

Letras minúsculas nas linhas com e sem inoculação de FMA comparam médias de tratamentos com SH. Letras maiúsculas nas colunas comparam médias de tratamentos com SH com e sem inoculação de FMA (*D. heterogama*) nas interações significativas entre SHxFMA aos 50 DAE. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Pode se observar que os tratamentos SH-And e SH-Vc incrementaram significativamente o conteúdo de clorofila a, b e a+b quando comparados com o controle (-FM) sem colonização. No conteúdo de carotenóides, observou-se um padrão similar sendo que os resultados não foram estatisticamente significativos (Tabela 10). Os tratamentos com inoculação de FMA (+FM) não influenciaram significativamente os teores de pigmentos fotossintéticos, mas os valores foram maiores que no tratamento controle. Entretanto, nos tratamentos onde as plantas foram inoculadas com o FMA e com aplicação das SH-And(+FM) e SH-Vc(+FM) verificou-se uma diminuição significativa do conteúdo de clorofila a, b, a+b, assim como de carotenóides, em relação aos respectivos tratamentos sem inoculação com FMA (SH-And(-FM) e SH-Vc(-FM)).

Os resultados demonstram que as SH-And e SH-Vc foram as mais eficientes na promoção de sínteses e acumulação de pigmentos fotossintéticos. Diversos autores têm reportado resultados similares em outras culturas após aplicação de SH (MELO et al., 2015; MEGANID et al., 2015; GARCÍA et al., 2012). Yang et al. (2004), avaliaram a resposta nos

níveis de clorofila a e b em plantas após aplicação de SH extraídas de diferentes tipos de solos. Alguns autores verificaram teores diferentes para estes pigmentos em função da origem da SH aplicada, sugerindo variações nos mecanismos de interação clorofila - substância húmica, similares aos resultados obtidos neste experimento. Em relação à resposta de plantas de milho à inoculação com FMA no acúmulo de pigmentos fotossintéticos, alguns autores têm reportado um efeito positivo (SHENG et al., 2008; ZHU et al., 2012), o quais são contrários aos resultados obtidos no presente estudo.

b) Carboidratos totais, redutores e proteínas totais

O conteúdo de carboidratos totais (CT), redutores (CR) e de proteínas totais (PT) foliares de milho sob efeito da inoculação com *D. heterogama* (+FM) e aplicação de SH é apresentado na Figura 25 A, B e C. Em ausência de inoculação micorrízica a aplicação de SH-Org incrementou significativamente o conteúdo de CT seguido pelo tratamento SH-Vc. O tratamento inoculado com FMA sem aplicação de substâncias húmicas (0SH+FM) incrementou o teor de CT em relação ao tratamento controle (0SH). Por outro lado, as plantas inoculadas (+FM) com aplicação de SH-And e SH-Vc incrementaram significativamente o teor de CT em relação a seus respectivos tratamentos sem inoculação (-FM), sendo o tratamento SH-Vc (+FM) o que apresentou o incremento máximo comparado com os demais tratamentos (Figura 25A).

Em ausência de inoculação micorrízica o tratamento SH-Org apresentou os maiores valores de CR (Figura 25B), não sendo observado nenhum estímulo nos outros tratamentos com SH. Embora a inoculação micorrízica (+FM) estimule o conteúdo de carboidratos redutores comparada com o controle (0SH), não foi observado estímulo deste parâmetro ao associar FMA com SH.

O teor de PT foi incrementado significativamente pela aplicação de SH-Vc. Apesar da inoculação micorrízica (+FM) incrementar o conteúdo de PT quando comparado ao controle (0SH), a adição de SH em plantas inoculadas com FMA (+FM) não estimulou a concentração de PT (Figura 25C).

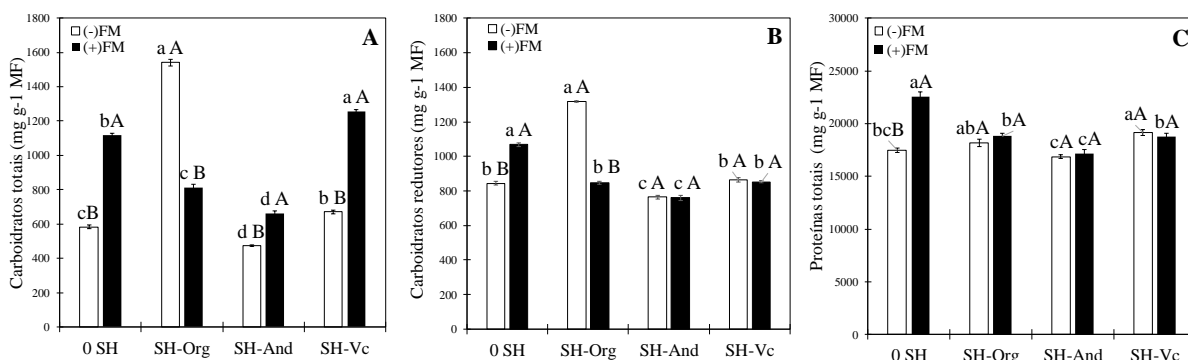


Figura 25. Conteúdo de carboidratos totais, redutores e proteínas totais das plantas de milho em função da origem da substância húmica e a inoculação com FMA (*D. heterogama*) (+FM) ou não (-FM), aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 3 repetições.

A aplicação de SH-Org estimulou o conteúdo de CT e CR em 164 e 66%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (0SH-FM). O resto dos tratamentos não

apresentaram incrementos de CT e CR. Por outro lado, o conteúdo de proteínas foi estimulado pelo tratamentos SH-Vc. A adição de SH-Vc em plantas inoculadas com FMA (+FM) estimulou o teor de CT em 81% em relação ao tratamento só com SH-Vc.

O maior estímulo na concentração de carboidratos no tratamento SH-Vc+FM poderia ser possivelmente explicado por um efeito sinérgico entre os FMA e as SH, já que ambos estimulam a atividade da P-H+-ATPases no sistema radicular permitindo uma maior transferência bidirecional de nutrientes, açúcares e água (Lima, 2008).

Por outro lado, a redução no conteúdo de carboidratos poderia estar relacionada com um uso mais acelerado ocasionado pelas SH (NARDI et al., 2007), ou com sua incorporação em diferentes rotas metabólicas ou até para serem utilizados nas sínteses de proteínas (HERNANDEZ et al., 2013).

A baixa resposta das plantas à aplicação de SH observada neste trabalho, no conteúdo de proteínas em plantas de milho é menor do que apresentado por García et al. (2012), em plantas de arroz e por Hernandez et al. (2013), em alface que relatam grandes incrementos de conteúdo de proteínas em tecidos foliares após aplicação de AH e humatos de vermicomposto.

5.5.3. Conteúdo de nutrientes em tecidos foliares de milho

a) Macronutrientes

A aplicação de SH de três origens incrementaram o conteúdo de N significativamente quando comparado com o tratamento controle (0SH) na seguinte ordem: SH-Org>SH-Vc>SH-And, o que percentualmente representou um acréscimo do teor de N de 12, 10 e 5%, respectivamente. A aplicação de SH-Vc nas plantas inoculadas (+FM) aumentou significativamente o acúmulo de N, o que representou um incremento de 14%, quando comparado com o tratamento não inoculado (-FM), além de apresentar a maior concentração deste elemento comparado com os demais tratamentos (Figura 26A).

O teor de P incrementou-se significativamente sob efeito das SH das três origens na sequência: SH-And>SH-Org>SH-Vc, incremento que percentualmente representou 50, 49 e 37%, respectivamente, em relação ao controle (0SH). A adição de SH nas plantas inoculadas (+FM) incrementou o teor de P em 12, 6 e 4%, para os tratamentos SH-Org (+FM), SH-Vc(+FM) e SH-And (+FM), respeito ao tratamento com SH não inoculado (-FM), porém este incremento foi apenas significativo nas plantas do tratamento SH-Org (+FM) (Figura 26B).

Como pode ser observado na Figura 26C, a aplicação de SH, independentemente da origem, estimulou o conteúdo de K (SH-Org>SH-Vc>SH-And), em porcentagens de 14, 10 e 7% quando comparadas ao controle sem SH (0SH). Por outro lado, a aplicação de SH das três origens incrementou significativamente o teor de K nas plantas inoculadas (+FM) comparado aos tratamentos sem inoculação (-FM) na ordem: SH-Vc>SH-And>SH-Org, com acréscimos de 15, 10 e 3%, respectivamente.

O tratamento SH-Vc aumentou a concentração de Ca em 56% comparada ao controle (0SH). As outras SH não exerceram influência significativa neste elemento. Porém a aplicação de SH em plantas inoculadas (+FM) incrementou significativamente o teor de Ca nos tecidos foliares das plantas tratadas com as SH-And e SH-Org em 63 e 44%, respectivamente, quando comparados com os tratamentos não inoculados (-FM) (Figura 26D).

A aplicação de SH gerou incrementos no teor de Mg foliar das plantas de milho, independentemente da origem, quando comparada ao controle (0SH), com acréscimos de 173 (SH-Vc), 170 (SH-And) e 167% (SH-Org). Como já referido acima para outros elementos, a aplicação de SH combinada à inoculação com *D. heterogama* incrementou significativamente o teor de Mg foliar. Os tratamentos SH-And(+FM), SH-Org(+FM) e SH-Vc (+FM) elevaram

as concentrações deste elemento em 33%, 22% e 10%, respectivamente, com relação aos tratamentos de aplicação de SH sem inoculação de FMA (-FM) (Figura 26E).

A aplicação de SH das três origens incrementou o conteúdo foliar de N, P, K e Mg em relação ao controle sem SH, enquanto o conteúdo de Ca foi maior só para o tratamento com SH-Vc. Por outro lado, a aplicação de SH das três origens em plantas inoculadas (+FM) exerceu um acréscimo significativo no conteúdo foliar de P, K e Mg em relação aos respectivos tratamentos sem inoculação (-FM).

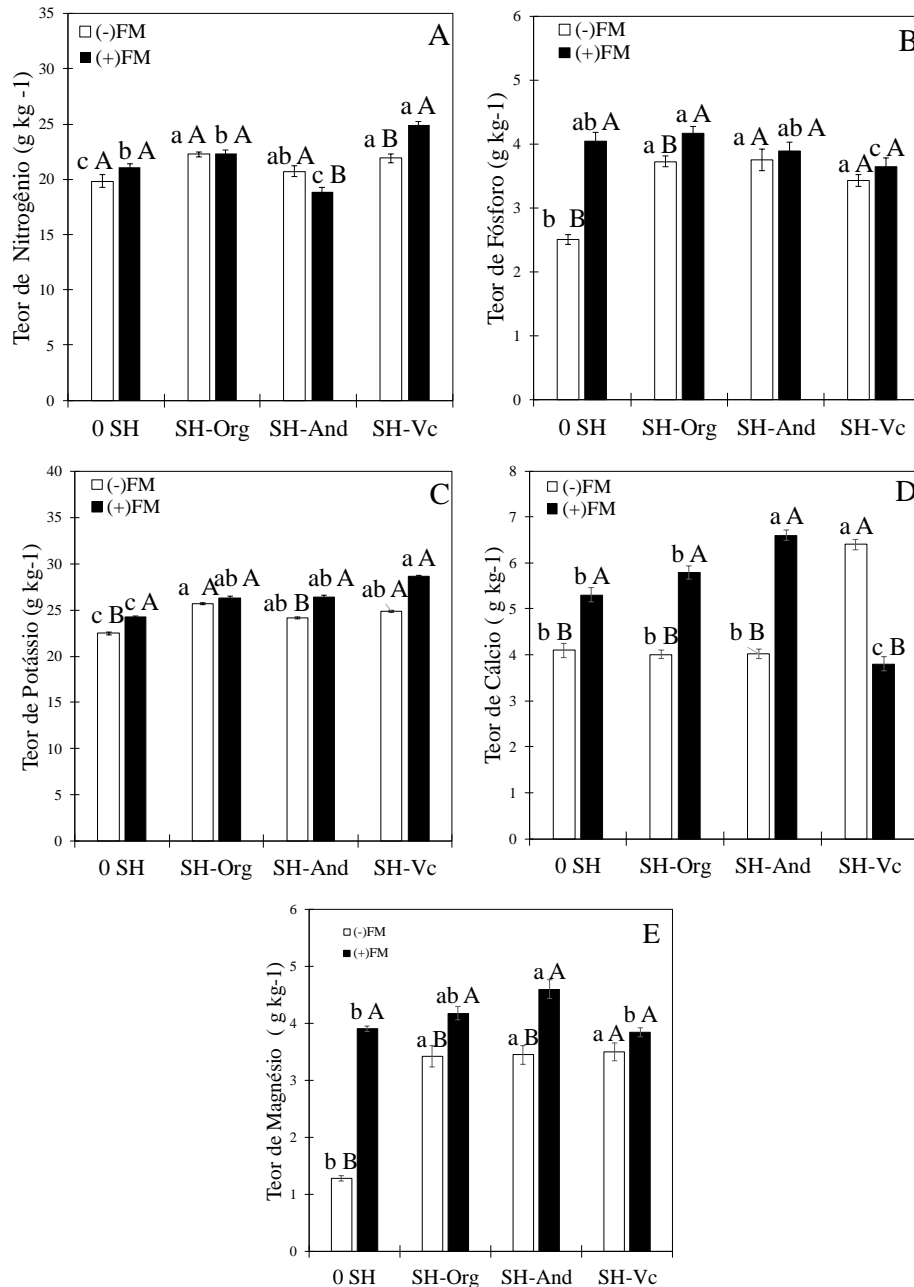


Figura 26. Teores médios de N, P, K, Ca e Mg em tecido foliar de milho em função da origem da substância húmica e a inoculação com FM (*D. heterogama*) (+FM) ou não (-FM), aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 3 repetições.

O teor de N foi maior nas plantas micorrizadas com a aplicação de SH-Vc, e o teor de Ca quando se adicionaram as SH-Org e SH-And. Verificou-se um efeito sinérgico da aplicação de SH e a inoculação micorrízica na absorção de nutrientes. Particularmente, o tratamento SH-Vc+FM estimulou a absorção de N e K, enquanto os tratamentos SH-Org+FM e SH-And+FM favoreceram a absorção de Ca e Mg, quando comparados ao tratamento micorrizado sem SH (0SH+FMA).

b) Micronutrientes

Na Figura 27 são apresentados os teores de micronutrientes no tecido foliar de plantas de milho inoculadas com *D. heterogama* (+FM) e sob aplicação de SH de três origens. As concentrações de S foram incrementadas pelas três SH aplicadas (SH-And>SH-Org>SH-Vc) em uma porcentagem média de 22 (SH-And, SH-Org) e 18% (SH-Vc) respeito ao tratamento controle. A aplicação conjunta da SH-Vc e *D. heterogama* incrementou significativamente a concentração de S, com um acréscimo de 17% para este elemento em relação ao tratamento não inoculado (-FM). Estas diferenças tornaram-se ainda mais expressivas quando comparado o tratamento SH-Vc+FM com o controle (0SH), observando-se incrementos de 37% no teor médio de S (Figura 27A).

O conteúdo de B foi maior nas plantas dos tratamentos SH-Vc e SH-Org com incrementos de 109 e 32% em relação ao controle (0SH). Os tratamentos inoculados (+FM) e com adição de SH-And apresentaram maiores concentrações de B em relação ao tratamento não inoculado (-FM) com incrementos de 28%. Porém, de modo geral, o maior teor de B foi observado quando aplicada a SH-Vc, independentemente da inoculação ou não com FMA (Figura 27B).

O teor de Zn não foi afetado significativamente pela adição de SH de nenhuma das três origens (Figura 27C). Não obstante, a aplicação de SH-And em plantas inoculadas (+FM) gerou incrementos significativos no conteúdo foliar deste nutriente, com um incremento de 370% em relação ao tratamento não inoculado (-FM).

O teor de Fe foi estimulado pela aplicação de SH-Org (19%) e negativamente afetado pela adição de SH-And (Figura 27D.). A aplicação de SH-And e SH-Vc em tratamentos inoculados (+FM) estimulou em 35 e 20% o teor de Fe comparados com os tratamentos não inoculados, mas não foi significativo em relação ao tratamento inoculado sem SH (+FM-0SH). Um padrão similar foi observado nos teores de Cu foliar, não se verificando incrementos com a aplicação de SH (Figura 27E). Apenas a aplicação conjunta da SH-Org e *D. heterogama* (+FM) exerceu um efeito estimulante deste elemento, com um incremento de 3%.

A SH-Org estimulou significativamente o teor foliar de Mn, incrementando em 27% seu conteúdo em relação ao controle. Por outro lado, a aplicação de SH-Vc em plantas inoculadas (+FM) incrementou em 35% o teor de Mn respeito ao não inoculado (-FM). A aplicação de SH-And e SH-Org em plantas inoculadas (+FM) reduziu o teor deste elemento (Figura 27F).

O teor de micronutrientes foi afetado com muita variabilidade pelas SH utilizadas. O teor de S foi incrementado sob efeito das SH das três origens enquanto o teor de Fe e Mn só foi estimulado sob efeito das SH-Org, e o de B pelas SH-Vc. Por outro lado, a absorção de Cu e o Zn não foi favorecida por nenhuma das SH aplicadas. A aplicação de SH-Vc em plantas inoculadas melhorou o conteúdo dos micronutrientes S, B, Fe e Mn. O tratamento com SH-And+FM gerou acréscimos no teor de Zn, enquanto o tratamento SH-Org+FM incremento o teor de Cu foliar.

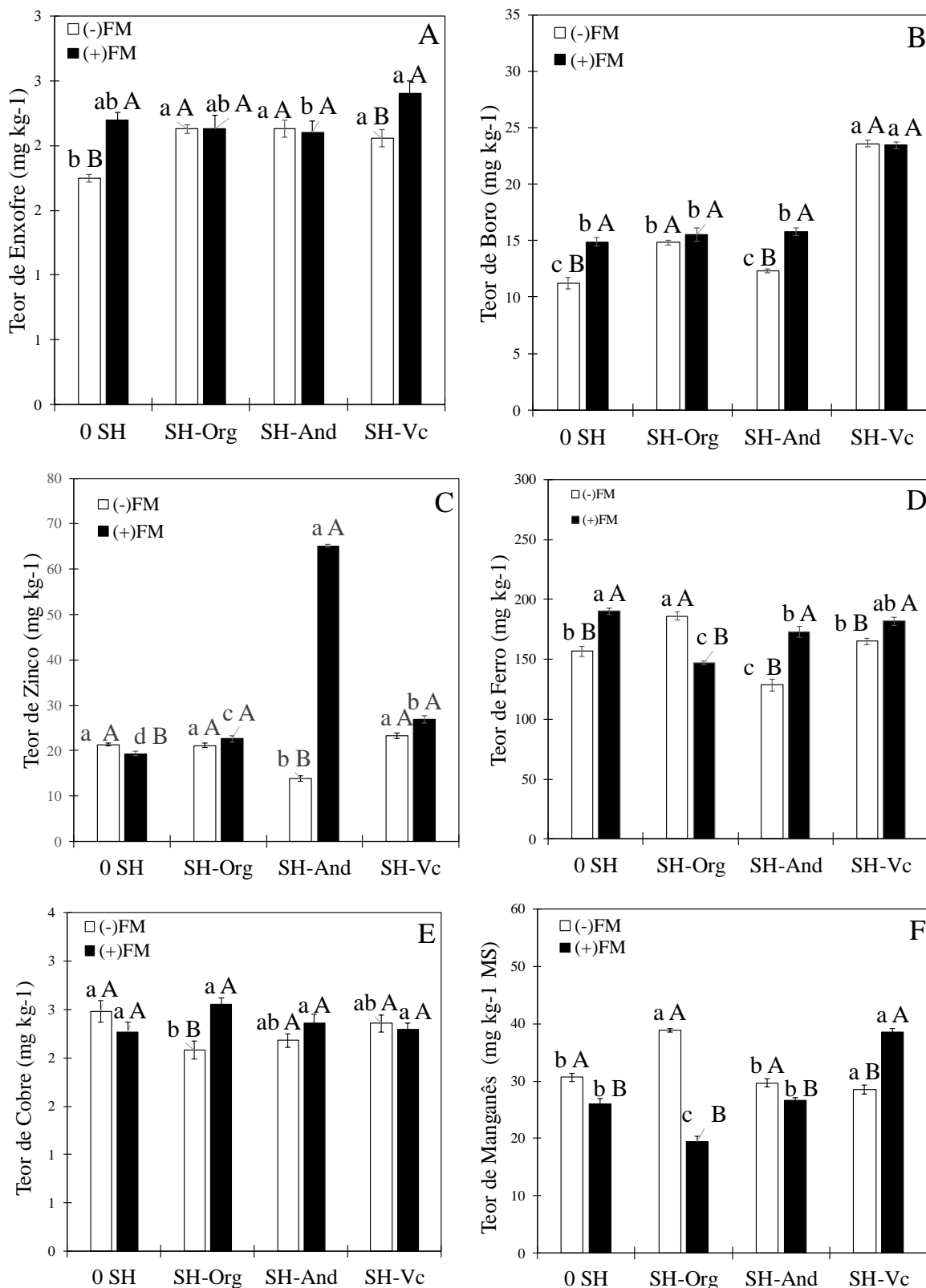


Figura 27. Teores médios de S, B, Zn, Fe, Cu e Mn em tecido foliar de milho em função da origem da substância húmica e a inoculação com FMA (*D. heterogama*) (+FM) ou não (-FM), aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 3 repetições.

A ordem de estímulo na absorção de nutrientes exercido pelas SH aplicadas, em relação ao controle (0SH) foi: N e K: SH-Org>SH-Vc>SH-And; P e S: SH-And>SH-Org>SH-Vc; B e Mg: SH-Vc>SH-Org>SH-Vc; Ca: SH-Vc; Fe e Mn: SH-Org. Por outro lado, a adição de SH em plantas inoculadas (+FM) incrementou os teores de nutrientes como descrito a seguir: N, S, B, Fe e Mn: SH-Vc; Zn: SH-And>SH-Vc>SH-Org; P, K, Mg: SH-Vc>SH-And, Cu: SH-Org e SH-And. Neste contexto, dos 11 elementos avaliados, o efeito das SH das três origens incrementou a concentração de 9. Por outro lado, a aplicação de estas mesmas SH em plantas inoculadas com *D. heterogama* estimulou a concentração de todos os elementos, verificando-se o efeito sinérgico SH-FMA.

Os efeitos estimulantes das SH na concentração de nutrientes em tecidos foliares observado no presente estudo tem relação com os resultados de estudos prévios. Eyheraguibel et al.(2008) reportou incrementos de 107, 11, 19 e 77% na concentração de N, P, K e Ca de plântulas de milho cultivadas em solução nutritiva e AH em relação ao controle sem SH. BALDOTTO et al.(2009) avaliou o efeito da aplicação de SH isoladas de vermicompostos e torta de filtro em plantas de abacaxi. Os autores verificaram aumentos de 52, 71, 50, 58 e 60% na concentração foliar de N, P, K, Ca e Mg, respectivamente, sem diferenças entre as fontes de SH utilizadas.

Igualmente, existem relatos de efeitos neutros ou positivos na concentração de alguns nutrientes como o Ca. Neste sentido, Barral et al. (2009) documentou ausência de efeitos significativos no teor de Ca em tecidos foliares de plantas de feijoeiro sob ação de AH de três origens (Turfa, composto e comercial). Assim mesmo, reduções no conteúdo de Ca em folhas de milho como resposta à aplicação de AH provenientes de vermicompostos e lodo sanitário foram reportados por Morozesk (2014). No sentido oposto, Silva et al. (2011) reportou incremento nos teores de Ca foliar de feijão como resultado de adubação orgânica com biofertilizante bovino.

O efeito da aplicação conjunta de FMA e AH representa um tema ainda pouco estudado. Porém, os resultados aqui obtidos sugerem uma relação sinérgica, especialmente para a absorção de N. Segundo Quaggiotti et al. (2004), a maior concentração de N em tecidos de plantas de milho tratadas com SH poderia estar relacionada com a maior absorção radicular de NO₃⁻ que aumentaria a expressão de genes pela regulação das sínteses de RNAm em milho.

Anzanello et al.(2011), avaliaram o efeito da inoculação de enxertos micro propagados de videira com *Scutellospora heterogama* (Atualmente *Dentiscutata heterogama*), reportando um incremento de 16% no teor de N em tecidos respeito às plantas não inoculadas.

Lima. (2008), estudo o efeito da interação AH e FMA na absorção de N em forma de nitrato em raízes transformadas de trevo e manjerição observando que a inoculação com *Glomus clarum* (Atualmente *Rhizophagus clarum*) com adição de AH de vermicomposto em concentrações de 20 mg C L⁻¹ expressaram maior atividade da bomba de prótons (P-H⁺-ATPase e H⁺-PPase) da nitrato redutase e da glutamina sintetase, em baixas concentrações de N em forma de nitrato (0,5 mmoles L⁻¹) pelo que a concentração de N na solução influencia os efeitos da associação micorrízica.

No caso da maior absorção de outros elementos nos tecidos de plantas sob efeito de SH e FMA poderia estar relacionado com a capacidade dos FMA de incrementar com suas hifas a área de exploração no solo. Isto conseqüentemente permite uma maior absorção de nutrientes, podendo fornecer fósforo, nitrogênio, potássio, zinco e cobre em porcentagens de 80, 25, 10, 25 e 60% respectivamente (SIQUEIRA et al., 2002; NIKOLAOU et al., 2002; SCHREINER, 2007; NUNES et al., 2008; MARSCHNER e DELL, 1994), especialmente dos nutrientes menos disponíveis como P e Zn. Neste sentido, a inoculação micorrízica tem sido relacionada diretamente com maiores concentrações foliares de nutrientes em plantas de

banana (Oliveira e Oliveira, 2005) e maracujá com incrementos de 42%N, 82%K 34%P quando inoculadas com FMA (NETTO et al., 2014).

As características predominantemente aniônicas das SH permitem que sejam absorvidas, aumentando o número de cargas negativas no citoplasma e proporcionando maior absorção de cátions (Costa, 2001). Adicionalmente, as SH têm a capacidade de formar fosfohumatos no caso do P, os quais podem ser absorvidos mais facilmente pelas plantas (Garcia-Mina et al., 2004). O resultado da aplicação de SH na absorção de P tem se verificado no incremento de produção de massa seca de milho (22,42%) ao aplicar 100 kg há⁻¹ deste elemento com adição de AH, em relação aos tratamentos com a mesma quantidade de P sem AH (REZAZADEH et al., 2012).

As três SH independentemente de sua origem exerceram um efeito estimulante combinado de absorção de diferentes micro e macro nutrientes ao ser aplicados em plantas inoculadas com FMA, este efeito poderia ser devido a que o substrato utilizado procedia de uma camada subsuperficial de solos com baixo conteúdo de nutrientes (Tabela 9) e a aplicação de SH aumento o conteúdo de nutrientes fazendo mais eficiente a simbiosis micorrízica para as plantas.

5.5.4. Efeitos das substâncias húmicas na colonização micorrízica, densidade de esporos, teor de glomalina

a) Colonização micorrízica

Nos tratamentos inoculados com *D. heterogama* foram observadas estruturas arbusculares típicas da colonização micorrízica como apresentados na Figura 28.

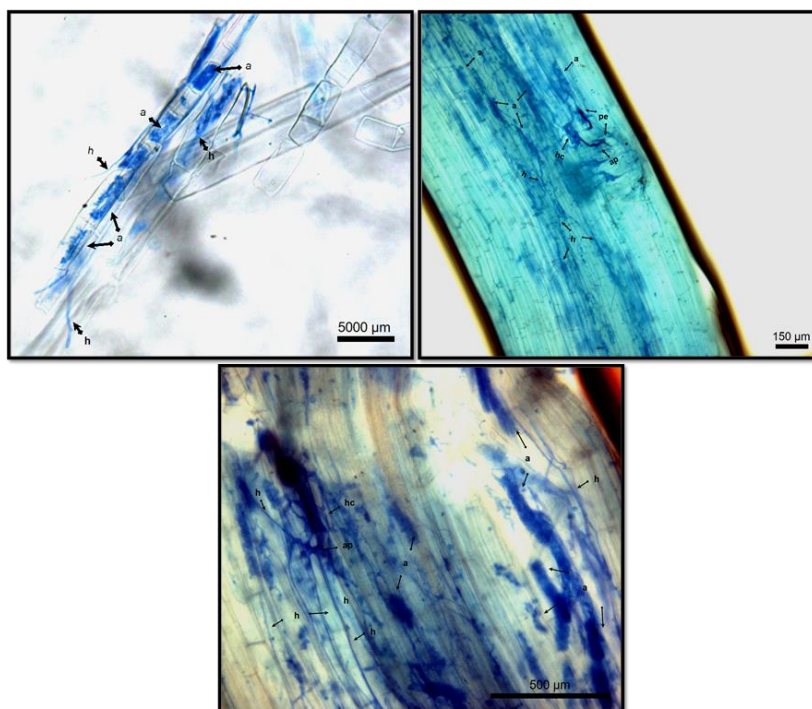


Figura 28. Raízes de milho BR-3025 colonizada por fungos micorrízicos arbusculares. Fotomicrografia de raiz com aumento de 20X, após coloração. h: hifas; a:arbusculos; ap:apresorio.

Não foi observado colonização por FMA nos tratamentos não inoculados, confirmando-se que o processo de solarização foi eficiente para a eliminação de FMA nativos. Entretanto, em todos os tratamentos foram observados outros tipos de microrganismos endófitos radiculares não micorrízicos os quais podem ter estado presentes por vários fatores, como haver sobrevivido à solarização, ter sido introduzidos na água de riego ou podem ter vindo com as sementes de milho as quais podem conter endófitos através de uma transmissão vertical solo-planta-semente como proposto por Baker e Smith (1966) e Haridoim et al. (2012). Microrganismos endófitos também podem ser encontrados dentro de estruturas fúngicas, como esporos, existindo uma forte relação entre organismos endófitos e FMA o que sugere competência ou cooperação entre eles (LI e GUAN., 2007).

As porcentagens de colonização de raízes com *D. heterogama* foram altos (>90%) para todos os tratamentos (Figura 29). Com valores de 96% para o tratamento inoculado sem aplicação de SH e de 98, 95 e 92% para os tratamentos com aplicação de substâncias húmicas dos tratamentos SH-And, SH-Vc e SH-Org.

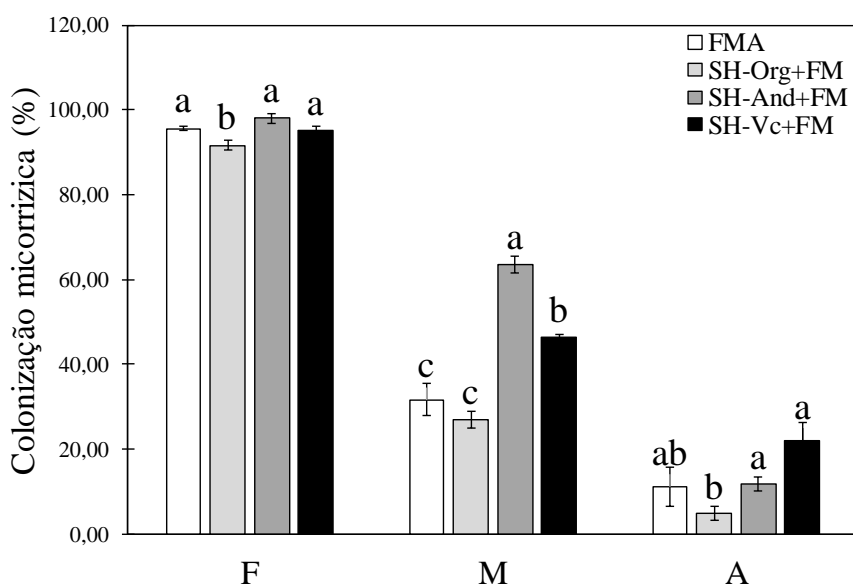


Figura 29. Estimativa de colonização micorrízica em raízes de milho inoculado com FMA (*D. heterogama*) com adição de substâncias húmicas de três origens aos 50 DAE. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre inoculadas ou não e minúsculas entre origem das substâncias húmicas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o erro padrão da amostra para 3 repetições. F:Frequencia de colonização micorrízica; M:Intensidade de colonização micorrízica e; A: abundância de arbúsculos no sistema radicular.

No caso da intensidade de micorrização (M) o comportamento foi similar à frequência, mas neste caso existiu uma diferencia significativa entre os tratamentos SH-And (64%) e SH-Vc (46%) e o tratamento inoculado sem aplicação de SH (FMA) com só o 32% de intensidade. Os tratamentos com SH-Org apresentaram a menor porcentagem de intensidade com só o 27%.

A porcentagem de abundância de arbúsculos (A) foi significativamente maior para o tratamento SH-Vc (22%), seguido pelos tratamentos SH-And (12%) cujo valor não foi muito diferente do tratamento inoculado sem SH que foi de 11%, o tratamento com SH-Org foi o de mais baixo porcentagem de arbúsculos com tão só o 5%. O estímulo da colonização

micorrízica com a aplicação de AH de vermicomposto tem sido reportado por Lima, (2008) em raízes de trevo e manjerição com baixos níveis de N-NO₃, onde altos níveis de N-NO₃-teriam um efeito inibidor da colonização.

Existem vários fatores determinantes do processo de infecção como são os fatores climáticos, o solo, os genótipos dos FMA e das plantas que são determinantes para o processo de infecção e colonização radicular (SIQUERIA et al., 2002; SILVEIRA et al., 2002). Processo de colonização que representa um custo significativo de carbono da planta por parte da espécie de FMA e que podem ser regulados pelo genótipo hospedeiro (GRAHAM e EISSENSTAT, 1994). Pelo que a maior presença de estruturas arbusculares nos tratamentos com aplicação de HS-Vc pode estar relacionada com o tipo de carbono aportado por esta SH.

b) Densidade de esporos e teor de glomalina facilmente extraível

Verificou-se que a aplicação das três SH estimulou a esporulação, sendo as substâncias húmicas do tratamento SH-Vc e SH-Org as que produziram maior quantidade de esporos (Figura 30). As SH-And estimularam a densidade de esporos em menor quantidade que as demais SH.

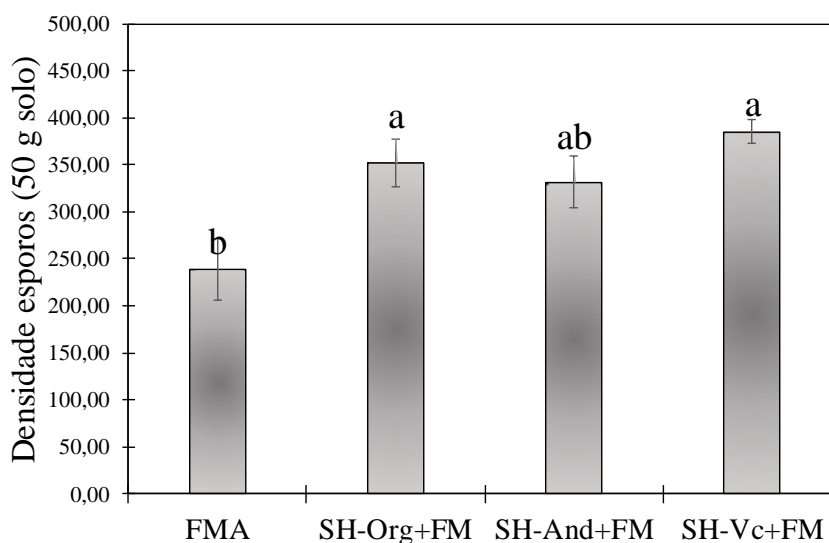


Figura 30. Densidade de esporos (DE) em um substrato cultivado com milho em casa de vegetação e inoculado com *D. heterogama* e com adição de substâncias húmicas de três origens. Letras minúsculas iguais ausência de diferencia significativa entre os tratamentos segundo o teste de Tukey, ($p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para 3 repetições.

O estímulo da esporulação sob efeito das substâncias húmicas observados no presente estudo, tem similaridade com os estudos reportados por Nobre et al.(2013), quem observou um incremento significativo da esporulação de *Glomus proliferum* associado com *Lunaria cruciata* sob efeito de AH isolados de vermicompostos em concentrações de 20 e 80 m C L-1 em condições in vitro.

O estímulo na colonização micorrízica e densidade de esporos sob efeito das substâncias húmicas de três origens observados no presente estudo tem relação com os resultados reportados em estudos anteriores, onde observou-se que a adição de matéria orgânica do solo estimula o desenvolvimento de fungos micorrízicos principalmente o

crescimento do micélio e colonização radicular, e a adição de SH promove o desenvolvimento intra e extra radicular das hifas de *Glomus claridum* (GRYNDLER et al., 2005, 2009).

Estudos realizados por Nunes et al., (2009) encontraram uma relação positiva de alguns indicadores como altura da planta, massa seca, teor de N, P e K com a colonização radicular de FMA. Pelo que maior porcentagem de colonização micorrízica reflete-se num maior crescimento das plantas e na maior absorção de nutrientes em relação às plantas não inoculadas, como tem sido observado em diversas culturas como o feijão (NEERAJ., 2011).

c) Glomalina facilmente extraível

Na Figura 31 podem ser observados os resultados referentes à concentração de glomalina facilmente extraível (GFE) em um solo cultivado com milho em casa de vegetação e inoculado com *D. heterogama* e com adição de substâncias húmicas de três origens

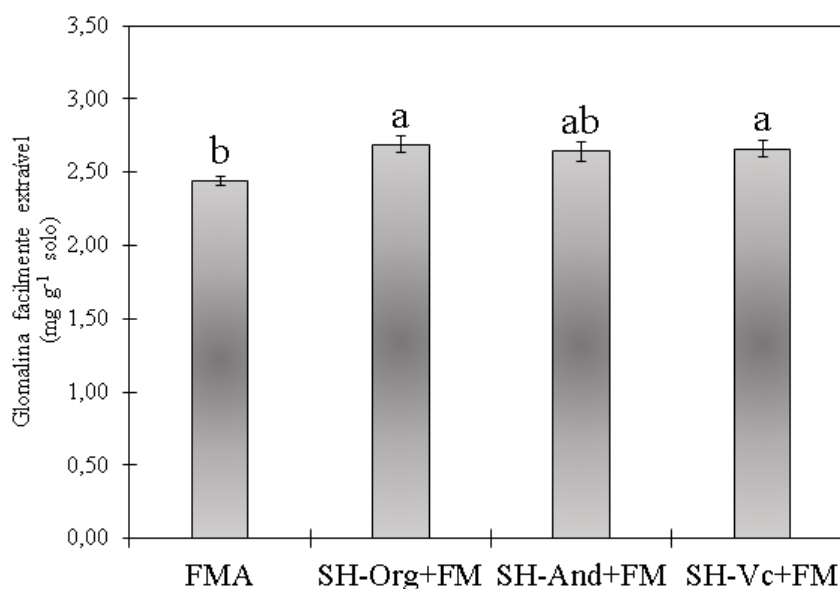


Figura 31. Concentração de glomalina facilmente extraível (GFE) em um solo cultivado com milho em casa de vegetação e inoculado com *D. heterogama* e com adição de substâncias húmicas de três origens. Letras minúsculas iguais ausência de diferencia significativa entre os tratamentos segundo o teste de Tukey, ($p < 0,05$). Barras representam o valor médio \pm ES (erro padrão) para 3 repetições.

O teor de glomalina facilmente extraível (GFE), que é a mais recentemente depositada no solo, apresentou um incremento médio significativo de 9% para os tratamentos inoculados com *D. heterogama* e adição de SH das três origens em relação ao tratamento com FMA sem SH (Figura 31). Os tratamentos com SH-Org e SH-Vc foram os que maiores valores de GFE apresentaram (2,69 e 2,66 mg g⁻¹ solo).

Níveis elevados de GFE têm sido relacionados com uma atividade microbiana mais equilibrada em florestas secundárias que incrementam a taxa de decomposição das hifas e maior deposição de GFE (DA SILVA et al., 2016), sendo a decomposição de hifas um aspecto muito importante na contribuição de GFE no solo (LUTGEN et al., 2003).

Os resultados da Figura 32 indicam que a adição de substâncias húmicas do tratamento SH-Vc nas plantas inoculadas foi mais eficiente, apresentando uma eficiência micorrízica 35% maior que o tratamento só com aplicação de SH-Vc sem inoculação micorrízica. O que

pode estar relacionado com os resultados observados na produção de biomassa para este tratamento e sua relação com a concentração de N em folha (Figura 23; Figura 26).

Entre os tratamentos utilizados destacou-se o tratamento com SH-Vc+FM o qual apresentou a maior concentração de nutrientes, produção de massa seca e abundância de estruturas arbusculares e densidade de esporos o qual viu-se refletido na maior eficiência micorrízica. Por outro lado, as Substâncias húmicas do tratamento SH-And+FM estimularam principalmente a intensidade de micorrização e em menor porcentagem a abundância de arbúsculos o qual viu-se refletido na baixa eficiência micorrízica em relação a seu tratamento com SH-And não inoculado. Enquanto os tratamentos com SH-Org apresentaram a menor eficiência micorrízica e menor colonização, e intensidade micorrízica, com menor abundância de estruturas arbusculares.

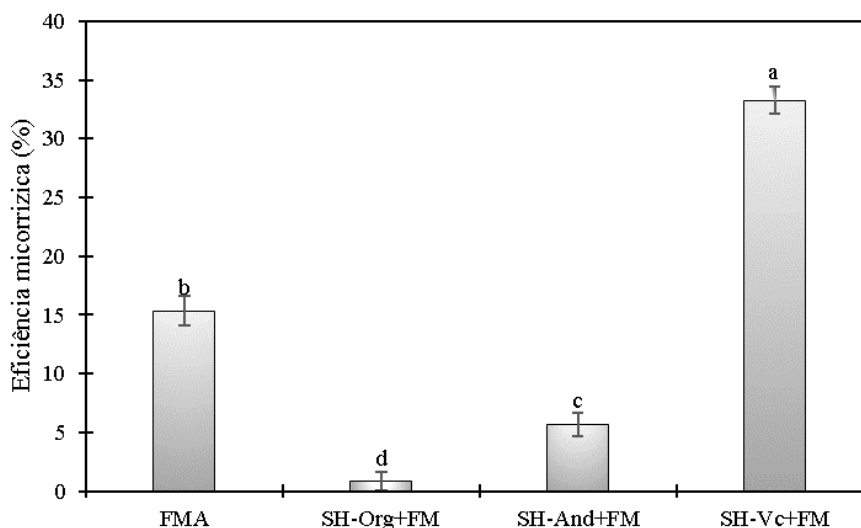


Figura 32. Eficiência micorrízica de plantas de milho inoculadas com *D. heterogama* e com adição de SH de três origens aos 50 DAE em relação aos tratamentos com adição de SH sem inocular.

Altas porcentagens de colonização micorrízica não sempre podem ser relacionados com maior crescimento, pois existem vários fatores que influenciam na resposta da planta á micorriza (TRESEDER, 2013), podendo existir baixa porcentagem de colonização e alto rendimento (KARANIK ET AL., 2008).

Resultados similares forma observados por Salgado (2014) onde a maior colonização promovida pelo FMA *D. heterogama* no milho não proporcionou maior acúmulo de nutrientes e nem e maior crescimento. Da mesma forma, resultados similares foram observados por Martins et al. (2000) e Soares & Martins (2000). Não se sabe o nível ótimo de colonização para se obter benefícios para planta, e se essa varia segundo a espécie de simbiontes envolvidos e as características do sistema investigado (CARDOSO et al., 2010).

Dos resultados obtidos pode se inferir que a aplicação das substâncias húmicas em plantas inoculadas com *D. heterogama* favorece a produção de massa seca pela maior absorção de alguns elementos como o N e K, embora a porcentagem de colonização não tenha sido significativa, foi observada uma abundância significativa de arbúsculos as quais estão envolvidas na transferência de nutrientes, estímulo de estruturas micorrízicas que pode ter estimulado a sua vez a esporulação e conseqüentemente os teores de glomalina no solo.

Embora as três substâncias húmicas tenham apresentado um efeito estimulante de vários parâmetros avaliados, o tratamento com aplicação de SH-Vc em plantas inoculadas

com FMA foi o tratamento que melhores respostas apresentou, sobre todo ao estimular a concentração de nutrientes como N, P e K os quais tem uma grande importância na produtividade da cultura de milho ao ser constituintes essenciais das moléculas e processos bioquímicos envolvidos na síntese e metabolismo de carboidratos (MALAVOLTA e CROCOMO, 1982; BORGES, 2006).

Ao serem as substâncias húmicas do tratamento SH-Vc procedente de um vermicomposto as mais eficientes e por sua procedência podem ser consideradas para ser usadas em combinação com inoculação de FMA em sistemas agrícolas familiares e/ou orgânicos já que aumentam a disponibilidade de nutrientes do solo e não inibem a ação positiva dos FMA. Pelo que estudos futuros poderiam ser focados na procura de formas de extração de SH alternativas para sua extração e testes com FMA.

5.6. CONCLUSÕES

A associação de substâncias húmicas com *D. heterogama* apresentou um efeito sinérgico no desenvolvimento do milho ao incrementar a absorção de alguns macronutrientes e micronutrientes, e conseqüentemente o acúmulo de biomassa seca. Sendo as substâncias húmicas extraídas de vermicompost (SH-Vc), as que maior efeito positivo apresentaram quando associadas com as micorrizas.

A colonização micorrizica afetou-se positivamente com a aplicação de substâncias húmicas de vermicomposto (SH-Vc) e Andisol (SH-And), as quais incrementaram abundância de arbusculos. No solo, a aplicação das três substâncias húmicas incrementou a quantidade de esporos e teores de glomalina.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados confirmam a hipótese em estudo. Foi comprovado que as substâncias húmicas em função de suas características químicas e estruturais outorgadas pelos processos de formação e materiais de origem, têm um efeito diferenciado sobre a cultura de milho nas diferentes etapas de desenvolvimento e condições testadas.

As três substâncias húmicas apresentaram diferenças químicas e estruturais relacionadas com sua origem, onde as substâncias húmicas de Andisol (SH-And) foram mais aromáticas que as substâncias húmicas de Organossolo (SH-Org) e Vermicomposto (SH-Vc). Entretanto as características das frações (AH e AF) amostraram-se bem definidas, onde os ácidos húmicos (AH) tiveram uma maior presença de estruturas aromáticas as quais lhe conferem propriedades, mas hidrofóbicas e apolares, e os ácidos fúlvicos (AF) foram mais lábeis, polares e hidrofílicos. O uso dos diferentes extratores não exerceu um efeito marcante em nenhuma das frações das três substâncias húmicas em termos de presença estrutural.

As substâncias húmicas quando aplicadas após da germinação na etapa de plântulas apresentaram um estímulo de vários parâmetros radiculares em diferentes concentrações e com diferente intensidade. As substâncias húmicas com características mais alifáticas como as de Vermicomposto (SH-Vc) e Organossolo (SH-Org) incrementaram em maiores porcentagens estes parâmetros em concentrações de 10 e 20 mg C L⁻¹ respectivamente, e as de Andisol (SH-And) com características mais aromáticas exerceram um efeito menos intenso e na menor concentração testada (5 mg C L⁻¹).

A aplicação de SH em plantas submetidas a estresse salino diminuem os efeitos negativos da salinidade ao incrementar a altura, biomassa de plantas e conteúdo de pigmentos a e a+b em relação aos tratamentos salinos sem SH. Além de incrementar a tolerância à salinidade ao aumentar o teor relativo de água (TRA) e diminuir a permeabilidade relativa radicular e foliar.

A interação SH e inoculação com *D. heterogama* apresentou um efeito sinérgico na morfologia e nutrição das plantas incrementando o conteúdo de biomassa radicular e total e estimulando a concentração de 10 dos 11 elementos avaliados em relação aos tratamentos não inoculados com FMA. No sistema radicular a interação substâncias húmicas com micorrizas incrementou a abundância de arbúsculos nos tratamentos com substâncias húmicas extraídas de Vermicomposto (SH-Vc) e Andisol (SH-And). No solo a aplicação das três substâncias húmicas incrementou a densidade de esporos e conteúdo de glomalina facilmente extraível em relação aos tratamentos inoculados com FMA sem SH.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os extratores utilizados não tenham exercido um efeito bem definido nas características químicas e estruturais das frações ácidos húmicos e ácidos fúlvicos, é necessário realizar estudos futuros focados em avaliar o efeito do extrator na bioatividade, visando a estabelecer se as reorganizações estruturais ocasionadas pelos extratores e observadas no presente estudo têm efeito na atividade biológica.

Os efeitos das substâncias húmicas na salinidade precisam de um estudo mais detalhado, mediante o uso de técnicas de avaliação de genes marcadores do estresse.

As interações das substâncias húmicas extraídas de vermicomposto com os fungos micorrízicos devem ser estudadas com maior profundidade utilizando mais outras espécies de FMA e outros cultivos, já que eficiência dessa interação pode ser utilizada como uma alternativa para sistemas de produção orgânica e familiar.

É necessário pesquisar métodos de extração de substâncias húmicas de compostagens ao alcance dos produtores e com extratores de fácil acesso.

Futuros estudos relacionados com avaliações morfológicas de plantas sob efeito de substâncias húmicas poderiam considerar a altura como parâmetro pouco expressivo para a avaliação dos efeitos das substâncias húmicas na morfologia vegetal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, N. O.; NOVOTNY, E. H.; OLIVEIRA, A. L.; RUMJANEK, V. M.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Geochemical Exploration*, v. 129, p. 95–102, 2013.

AKÇA, Y.; SAMSUNLU, E. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, proline and nutrient accumulation, and k/na ratio in walnut. *Pak. J. Bot.*, v. 44, n. 5, p. 1513–1520, 2012.

AMBEDE, G. J.; NETONDO, G. W.; MWAI, G. N.; MUSYIMI, D. M. NaCl salinity affects germination, growth, physiology, and biochemistry of bambara groundnut. *Braz. J. Plant Physiol*, v. 24, n. 3, p. 151–160, 2012.

AMINIFARD, M. H.; AROIEE, H.; NEMATI, H.; AZIZI, M.; HAWA, Z.; JAAFAR, E. Fulvic acid affects pepper antioxidant activity and fruit quality. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 68, p. 13179–13185. 2012.

ANZANELLO, R.; VITOR, P.; DE SOUZA, D.; CASAMALI, B. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. v. 70, n. 2, p. 409–415. 2011.

AOSA. Association of Official Seed Analysis. Seed vigor testing handbook. 93 p. 1983.

ARAGÃO, C. A.; DANTAS, B. F.; ALVES, E.; CATANEO, A. C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho super doce tratadas com ácido giberélico. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 25, n. 1, p. 43–48, 2003.

ARAÚJO, P. C. de; PERIN, A.; MACHADO, A. T. de; ALMEIDA, D. L. de. Avaliação de diferentes variedades de milho para o estágio de "verde" em sistemas orgânicos de produção. Em: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia. A inovação tecnológica e a competitividade no contexto dos mercados globalizados: resumos expandidos. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo; Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2000. 1 CD ROM.

ARNON, D.I. Copper enzyme in isolated chloroplasts. I. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* v.24, n. p.1-15. 1949.

ARTEAGA, M.; GARCÉS, N.; NOVO, R.; GURIDI, F.; PINO, J. A; ACOSTA, M.; PASOS, M. Influence of Liplant Bioestimulant Systematic Application on Some Soil Biological Indicators. *Revista de Protección Vegetal.* v. 22, n. 2, p. 110–117, 2007.

ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant and Soil*, v. 336, n. 1, p. 313–322, 2010.

ATIYEH, R. M.; ARANCON, N. Q.; EDWARDS, C.A.; METZGER, J. D. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*, v. 84, n. 1, p. 7–14, 2002.

AYDIN, A.; KANT, C.; TURAN, M. Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. *African Journal of Agricultural Research*, v. 7, n. 7, p. 1073–1086, 2012.

AYUSO, M.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; PASCUAL, J.A. Stimulation of Barley Growth a N D Nutrient Absorption by Humic Substances Originating from Various Organic Materials. *Bioresource Technology*, v.57, n.3, p. 251–257, 1996.

BAGLIERI, A.; GENNARI, M.; IOPPOLO, A.; LEINWEBER, P.; NÈGRE, M. Comparison Between the Humic Acids Characteristics of Two Andisols of Different Age by: FT IR and ¹H NMR Spectroscopy and py FIMS. v. 50, n. 2, p. 148–158, 2012.

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

BAKER, K.F.; SMITH S.H. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *An. Rev Phytopathol*, v.14, p. 311–334. 1966.

BAKRY, B. A.; IBRAHIM, O. M.; EID, A. R.; BADR, E. A. Effect of Humic Acid, Mycorrhiza Inoculation, and Biochar on Yield and Water Use Efficiency of Flax under Newly Reclaimed Sandy Soil. *Agricultural Sciences*, v. 5, n. 14, p. 1427–1432, 2014a.

BAKRY, B. A.; TAHA, M. H.; ABDELGAWAD, Z. A.; ABDALLAH, M. M. S. The Role of Humic Acid and Proline on Growth, Chemical Constituents and Yield Quantity and Quality of Three Flax Cultivars Grown under Saline Soil Conditions. *Agricultural Sciences*, v. 5, n. 14, p. 1566–1575, 2014b.

BALDOTTO, M.A; MUNIZ, R.C; ESTRELA, L; BALDOTTO, B; DOBBSS, L.B. Root Growth of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Treated with humic acids isolated from typical soils of Rio de Janeiro State, Brazil. *RevCeres*, Viçosa. v. 58, n. 4, p. 504–511, 2011.

BALDOTTO, E. B.; BALDOTTO, M.; GIRO, V.; CANELLAS, L.; OLIVARES, F.; BRESSAN-SMITH, R. Desempenho do abacaxizeiro «vitória» em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. *R. Bras. Ci. Solo*, n. 33, p. 979–990, 2009.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Gladiolus development in response to bulb treatment with different concentrations of humic acids. *Revista Ceres*, v. 60, n. 1, p. 138–142, 2013.

BARRER, S. E. El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, v.7, n.1, 123-132, 2009.

BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Science*, v.15, n. 273, p.413-428, 1962.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress-water studies. *Plant soil*, v.39, p.205-207, 1973.

BECKETT, R., JUE, Z., AND GIDDINS, J. C. Determination of molecular weight distributions of fulvic and humic acids using flow field fractionation. *Environ. Sci. Technol.*, v.21, p.289–295, 1987.

BEFROZ FAR, M. R.; HABIBI, D.; ASGHARZADEH, A.; SADEGHI, M.; TOOKALLOO, M. R. Vermicompost, plant growth promoting bacteria and humic acid can affect the growth and essence of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Scholars Research Library*, v. 4, n. 2, p. 8–12, 2013.

BENITES, V. M. Caracterização química e espectroscópica da matéria orgânica e suas relações com a gênese de solos da Serra do Brigadeiro, Zona da Mata Mineira. 1998. 125f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 1998.

BENITES, V. M., MADARI, B., MACHADO, P. L. O. A. Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, p. 7, 2003.

BENITES, V. M.; MENDONÇA, E. S.; SCHAEFER, C. E. G. R.; NOVOTNY, E. H.; REIS, E. L.; KER, J. C. Properties of black soil humic acids from high altitude rocky complexes in Brazil. *Geoderma*, v.127, p.104–113, 2005.

BENITES, V.M.; CAIAFA, A.N.; MENDONÇA, E.S.; SCAHEFFER, C.E.G.R.; KER, J.C. Solos e vegetação nos Complexos Rupestres de Altitude da Mantiqueira e do Espinhaço. *Floresta e Ambiente*, v.10, p.76-85, 2003.

BENITES, V.M.; SCAHEFFER, C.E.G.R.; MENDONÇA, E.S.; MARTIN NETO, L. Caracterização da matéria orgânica e micromorfologia de solos sob Campos de Altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.25, p.661-674, 2001.

BERBARA, R. L. L.; GARCÍA, A. C. Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment: Volume 1. Em: *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environmental*.v. 1, p. 1–376.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. III - Fungos Micorrízicos Arbusculares: Book, v. Cap III, n. 54–80, p. 432, 2006.

BERUDE, M. C.; SAMPAIO DE ALMEIDA, D.; RIVA, M. M.; ALVAREZ CABANÊZ, P.; ALVES DO AMARAL, A. Micorrizas e sua importância agroecológica. *Enciclopédia Biosfera*. Centro científico Conhecer-Goiânia, v. 11, n. 22, p. 132, 2015.

BHARTI, N.; BARNAWAL, D.; SHUKLA, S.; KRISHNA, S.; KATIYAR, R. S.; KALRA, A. Integrated application of *Exiguobacterium oxidotolerans*, *Glomus Fasciculatum*, and vermicompost improves growth, yield and quality of *Mentha arvensis* L. in salt-stressed soils. *Ind Crop Prod*. Elsevier B.V. v. 83. p. 717–728, 2016.

BLEE, K. A.; ANDERSON, A. J. Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. *Plant Molecular Biology*, v.50, p.197–211, 2002. Em: KIERS, E.T.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation. *Ecology*.n.87, v. 7. p. 1627-1636, 2006.

BOLLAG, J.M.; MYERS, C.; PAL, S.; HUANG, P. M. The role of abiotic and biotic catalysts in the transformation of phenolic compounds, 1983. In: Huang PM, Berthelin J, Bollag JM, McGill WB, Page AL, eds. *Environmental impacts of soil component interactions*. Chelsea: Lewis Publisher. p. 297-308. 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid a sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing of principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.248-254, 1976.

BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for sustainability. *Journal of the Indian Institute of Science*. v. 92, n. 1, p. 37-62, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuaria. Brasília, DF: Mapa/ACS.395p. 2009.

BRUCCOLERI, A.; SORENSON, B.; LANGFORD, C. Molecular modeling of humic structures. *Humic Substances—Structures, Models and Functions*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 193–208. 2001.

BÜLENT, B.; ALI, M.; ÇELİK, H.; VAHAP, A. Effects of Humic Substância on Plant Growth an Mineral Nutrients Uptake of Wheat (*Triticum durum* cv. Salihli) Under Conditions of Salinity. *Asian Journal of Crp Science*, v. 1, n. 2, p. 87–95, 2009.

BUYTAERT, W.; DE BIEVRE, B.; WYSEURE, G.; DECKERS, J. The impact of land use changes on the hydrological behaviour of Histic Andosols in the south Ecuadorian páramo. *Hydrological Processes*, v.19, p. 3985-3997, 2005.

CALDERONI, G.; SCHNITZER, M. Effects of age on the chemical structure of paleosol humic acids. *Geochim. Chosmochim. Acta*, v.48, p.2045-2051, 1984. Em: DICK, D. P. GOMES., J. e ROSINHA, P. B. Caracterização de substâncias húmicas extraídas de solos e de lodo orgânico. *R. Bras. Ci. Solo*, 22:603-611. 1998.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, v. 383, n. 1–2, p. 3–41, 2014.

CAMEL, S. B.; REYES-SOLIS, M. G.; FERRERA-CERRATO R.; FRANSON, R. L.; BROWN, M. S.; BETHLENFALVAY, G. J. Growth of VA mycorrhizal mycelium through bulk soil. *Soil Science Society of America Journal, Madison*, v. 55, p. 389-393, 1991.

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

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; 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, 2012b.

CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Chemical nature of soil humified fractions and their bioactivity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 39, n. 3, p. 233–240, 2004.

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

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

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.; SANTOS, G. A.; MORAES, A. A.; RUMJANEK, V. M.; OLIVARES, F. L. Avaliação de características de Ácidos Húmicos de resíduos de Origem Urbana: I. Métodos Espectroscópicos (UV-Vis, IV, RMN ¹³ C-CP / MAS) e microscopia electronica de barredura. *Ver. Bras. Ci. Solo*, v.24, p. 741–750, 2000.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G. P.; RUMJANEK, V. M.; REZENDE, C. E.; SANTOS, G. A. Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 27, n. 5, p. 935–944, 2003.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; SANTOS, G. D. A. Modelos estruturais de substâncias húmicas. *Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Rio de Janeiro, UENF, p. 244–267, 2005.

CANELLAS, L. P.; ZANDONADI, D. B.; BUSATO, J. G.; BALDOTTO, M. A.; SIMÕES, M. L.; MARTIN-NETO, L.; FAÇANHA, A. R.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. *Soil Science*, v. 173, n. 9, p. 624–637, 2008.

CANELLAS, L.; DOBBSS, A.; OLIVEIRA, J.; CHAGAS, N.; AGUIAR, V.; RUMJANEK, E.; NOVOTNY, F.; OLIVARES, R.; SPACCINI, A.; PICCOLO. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *European Journal of Soil Science*, v. 63, p. 315–324, 2012a.

CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; OKOROKOVA, A.L. Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H⁺ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiology*, v.130, n.4, p.1951–1957. 2002.

CARDOSO, E. J. B. N.; CARDOSO, I. M.; NOGUEIRA, M. A.; BARETTA, C. R. D. M.; PAULA, A. M. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. Em: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. (Ed.). Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil. Lavras: UFLA, p. 153-214, 2010.

CHAI, X.; TAKAYUKI, S.; CAO, X.; GUO, Q.; ZHAO, Y. Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere*, v. 69, n. 9, p. 1446–1453, 2007.

CHEFETZ, B.; HATCHER, P.; HADAR, Y.; CHEN, Y. Chemical and biological characterization of organic matter during composting of municipal solid waste. *J. Environ. Qual.*, v.25, p.776-785, 1996.

CHEN J, LEBOEUF EJ, DAI S, BA G. Fluorescence spectroscopic studies of natural organicmatter fractions. *Chemosphere* 50:639–647. 2003.

CHEN.; AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. Em: MacCARTHY, P.; CLAPP, C.E.; MALCOLM, R.L.; BLOOM, P.R. (Eds.) Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison/Wisconsin, p.161-186, 1990.

CHEN, Y.; CLAPP, C. E.; MAGEN, H. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 50, n. 7, p. 1089–1095, 2004.

CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Sci Soc Am J*, v. 41. p.352–358. 1977.

ÇIMRIN, K. M.; TÜRKMEN, Ö.; TURAN, M.; TUNCER, B. Phosphorus and humic acid application alleviate salinity stress of pepper seedling. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 36, p. 5845–5851, 2010.

CIPRIANO-SILVA, R.; VALLADARES, G. S.; PEREIRA, M. G.; DOS ANJOS, L. H. C. Caracterização de organossolos em ambientes de várzea do nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, v. 38, n. 1, p. 26–38, 2014.

CLIRSEN. Reunión preparatoria para el Atlas de suelo de Latinoamerica. Rio de Janeiro 2010. Ecuador Base de datos edáfica. *Suelos del Ecuador*. 2010.

COELHO, M.S.; MENDONÇA, DE SÁ E.; DE LIMA, P.C.; GUIMARÃES, G.P.; CARDOSO, M.I. Qualidade da matéria orgânica de solos sob cultivo de café consórciado com adubos verdes. *Rev. Bras. Ci. Solo*, v.37, p.1576-1586, 2013.

CONTE, P, SPACCINI R, ŠMEJKALOVÁ D, NEBBIOSO A, PICCOLO A. Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite humic acid. *Chemosphere*.v.69. p. 1032–1039, 2007.

CONTE, P.; SPACCINI, R.; CHIARELLA, M.; PICCOLO, A. Chemical properties of humic substances in soils of an Italian volcanic system. *Geoderma*, v. 117, n. 3–4, p. 243–250, 2003.

CONTE, P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Advanced CPMAS-13C NMR techniques for molecular characterization of size-separated fractions from a soil humic acid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 386, n. 3, p. 382–390, 2006.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; OLIVEIRA, A. C.; JOSÉ, L.; GUIMARÃES, M.; MOREIRA, J. A. A.; WALTER, E.; MATRANGOLO, J. R. Variedades de Milho em Sistema Orgânico de Produção na Safra 2009/10. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, p. 2560, 2010.

CUNHA, T.J.F.; MENEGUELLI, N.A.; CONCEIÇÃO, M.; MACHADO, P.L.O.A.; FREIXO, A.A. Avaliação de extratores de substâncias húmicas de um Latossolo Vermelho Distroférrico. Rio de Janeiro. Embrapa Solos. Boletim de Pesquisa, n.7. p.15, 2000.

DA ROCHA, E.; ANDRADE, P.; BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, B. L.; DEL GIUDICE, M. P. Bioestimulante extraído de resíduo orgânico reciclado por compostagem. IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, n. 2007, p. 1–10, 2013.

DA ROSA, C. M.; CASTILHOS, R. M. V.; VAHL, L. C.; CASTILHOS, D. D.; PINTO, L. F. S.; OLIVEIRA, E. S.; LEAL, O. DOS A. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. *Rev. Bras. Ci. Solo*, v. 33, n. 4, p. 959–967, 2009.

DA SILVA, C.F; PEREIRA, M. G.; DOS SANTOS, V. L.; MIGUEL, D. L.; DA SILVA, E.M.R. Fungos Micorrízicos Arbusculares: Composição, comprimento de micélio extrarradicular e glomalina em áreas de mata atlântica, rio de janeiro arbuscular mycorrhizal fungi: composition, length extraradical mycelium and glomalin in areas of atlantic forest, Rio de Janeiro. *Ciência Florestal*, v. 26, n. 2, p. 419–433, 2016.

DA SILVA, F. L.B., CLAUDIVAN, F. DE LAC.; DE SOUSA, G.G.; NEVES, A.L.R; DA SILVA, G.L.; SOUSA, C.H.C. "Interação entre salinidade e biofertilizante bovino na cultura do feijão-de-corda." *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 15, n. 4, p. 383, 2011.

DA SILVA, M. A. C.; DOS SANTOS, W. O.; SIMOURA, N. T.; TESCH, J. A.; RUAS, K. F.; COLODETE, C. M.; TANNURE, F. P.; DE OLIVEIRA BARBIRATO, J.; RAMOS, A. C.; DOBBS, L. B. Ácidos húmicos de vermicomposto estimulam o crescimento in vitro de plântulas de *Cattleya warneri* (Orchidaceae). *Rodriguésia*, v. 66, n. 3, p. 759–768, 2015.

DAHLGREN, R. A.; SAIGUSA, M.; UGOLINI, F. C. The Nature, Properties and Management of Volcanic Soils. *Adv. Agron*, v.82, n.3, p. 113–182. 2004.

DELFINO, S.; TOGNETTI, R.; DESIDERIO, E.; ALVINO, A. Effect of foliar application of N and humic acid on growth and yield of durum wheat. *Agron. Sustain. Dev.*, 25: 183-191. 2005.

DEMIR, K., GÜNES, A., INAL, A.; ALPASLAN, M. Effects of humic acids on the yield and mineral nutrition of cucumber (*Cucumis sativus* L.) Grown with different salinity levels. *Acta Hort.*, v.492, p.95-104, 1999.

DOBBSS, L. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, M.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; FAÇANHA, A. R. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 6, p. 3681–3688, 2010.

DOBBSS, L. B.; RUMJANECK, V. M.; BALDOTTO, M. A.; VELLOSO, A. C. X.; CANELLAS, L. P. Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de latossolos brasileiros. *Rev. Bras. Ci. Solo*, v. 33, n. 1, p. 51–63, 2009.

DRIVER, J. D.; HOLBEN, W. E.; RILLING, M.C. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 37, n. 01, p. 101-106, 2005.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, v. 196, p. 3–14, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-356, 1956.

EBELING, A.G.; ANJOS, L.H.C.; PEREIRA, M.G.; VALLADARES, G.S.; PÉREZ, D.V. Substâncias húmicas e suas relações com o grau de subsidência em Organossolos de diferentes ambientes de formação no Brasil. *Rev Cienc Agron*, v. 44, p.225–233, 2013.

EBELING, A. G.; ANJOS, L.H.C; PEREZ, D. V.; PEREIRA, M. G. Substâncias húmicas em Organossolos háplicos de várias regiões do Brasil. n. 1, p. 325–336, 2011.

EGLI, M.; ALIOTH, L.; MIRABELLA, A.; RAIMONDI, S.; NATER, M.; VEREL, R. Effect of Climate and Vegetation on Soil Organic Carbon, Humus Fractions, Allophanes, Imogolite, Kaolinite, and Oxyhydroxides in Volcanic Soils of Etna (Sicily). *Soil Science*, v. 172, n. 9, p. 673–691, 2007.

EL-KHATEEB, M. A.; EL-LEITHY, A. S.; ALJEMAA, B. A. Effect of Mycorrhizal Fungi Inoculation and Humic Acid on Vegetative Growth and Chemical Composition of *Acacia saligna* Labill. Seedlings under Different Irrigation Intervals. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, v. 3, n. 3, p. 283–289, 2011.

EMBRAPA - Embrapa Informação Tecnológica. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3rd ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p. 353. 2013.

EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008. BRS 3025: híbrido triplo da Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/milho-e-sorgo/busca-de-publicacoes/-/publicacao/897218/brs-3025-hibrido-triplo-da-embrapa>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Editor Técnico Fabio Cesar da Silva. 2da Edição Ver. Ampl. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, 627 p, 2009.

ESWARAN, H.; REICH, F.P.; KIMBLE, J.M.; BEINROTH, F.H.; PADAMNAB- HAN, E.; MONCHAROEN, P. Global carbon stocks. 2000. Em: LAL, R., KIMBLE, J.M., ESWARAN, H., STEWART, B.A. (Eds.), Global Climate Change and Pedogenic Carbonates. CRC/Lewis, Boca Raton, FL, 2001.

ESWARAN, H.; VAN DEN BERG, E.; REICH, P. Organic Carbon in Soils of the World. Soil Science Society of America Journal, v. 57, n. 1, p. 192, 1993.

EYHERAGUIBEL, B.; SILVESTRE, J.; MORARD, P. Effects of humic substances derived from organic waste enrichment on the growth and mineral nutrition of maize. Bioresource Technology, v. 99, n. 10, p. 4206–4212, 2008.

FAÇANHA, A. R.; FAÇANHA, A.L.O; OLIVARES, F.L; GURIDI, F.; SANTOS, G.D.A; VELLOSO, A.C.X; RUMJANEK, V.M; BRASIL, F; SCHRIPEMA, J; BRAZ-FILHO R; DE OLIVEIRA M.A; CANELLAS, L.P. 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.

FAO. Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos, v. 103, p. 117, 2007.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F.; Germinação: do básico ao aplicado. Artmed: Porto Alegre, 2004, 324p.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedure in multiple comparisons. Ciênc. agrotec. [online]. 2014, vol.38, n.2, pp. 109-112.

FLAIG, W; BEUTELSACHER, H; RIETZ, E. Chemical composition and physical properties of humic substances. In: Soil components: Gieseking JE, ed. Organic components, vol 1. New York: Springer-Verlag; 1-211. 34. 1975.

FONTANA, A. Fracionamento da Matéria Orgânica e Caracterização dos Ácidos Húmicos e sua Utilização no Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo. 81 p. 2009.

FONTANA, A. Caracterização Química e Espectroscópica da Matéria Orgânica em Solos do Brasil. Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, p. 60, 2006.

FONTANA, A.; PEREIRA, M. G.; ANJOS, L. H. C.; BENITES, M. B. Distribution of organic carbon in the humic fractions of diagnostic horizons from Brazilian soils. Communication in Soil Science Plant and Analysis, New York v. 39, n. 4, p. 951–971, 2008.

FUJITAKE, N.; KAWAHIGASHI, M. “¹³C NMR Spectra and Elemental Composition of Fractions with Different Particle Sizes from an Andosol Humic Acid,” Soil Sci. Plant. Nutr. 45, 359–366 (1999). Em: BAGLIERI, A.; GENNARI, M.; IOPPOLO, A.; LEINWEBER, P. NÈGRE, M. Comparison Between the Humic Acids Characteristics of Two Andisols of

Different Age by: FTIR and ¹HNMRSpectroscopy and py FIMS. *Geochemistry International*, 2012, Vol. 50, No. 2, pp. 148–158.2012.

GAMPER, H.; PETER, M.; JANSA, J.; LÜESCHER, A.; HARTWIG, U.A.; LEUCHTMANN A. Arbuscular mycorrhizal fungi benefit from 7 years of free air CO₂ enrichment in well-fertilized grass and legume monocultures. *Global Change Biology*, 10: 189–199. 2004.

GARCÍA, A. C. Frações Sólidas Humificadas de Vermicomposto: seus Efeitos em Plantas e Capacidade para a Retenção de Metais Pesados. Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, p. 117, 2013.

GARCÍA, A. C.; DE SOUZA, L. G. A.; PEREIRA, M. G.; CASTRO, R. N.; GARCÍA-MINA, J. M.; ZONTA, E.; LISBOA, F. J. G.; BERBARA, R. L. L. Structure-Property-Function Relationship in Humic Substances to Explain the Biological Activity in Plants. *Nature. Scientific Reports*, v. 6, p.1-10, 2016a.

GARCÍA, A. C.; IZQUIERDO, F. G.; HERNÁNDEZ, O. L.; MARGARITA, M.; ARMAS, D. DE; LÓPEZ, R. H.; REBATO, S. M.; BALMORI, D. M.; LUIS, R.; BERBARA, L. Biotechnology of humified materials obtained from vermicomposts for sustainable agroecological purposes. *African Journal of Biotechnology*, v. 12, n. 7, p. 625–634, 2013.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; DE SOUZA, L. G. A.; TAVARES, O. C. H.; ZONTA, E.; GOMES, E. T. M.; GARCÍA-MINA, J. M.; BERBARA, R. L. L. Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 192, p. 56–63, 2016b.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; SPERANDIO, M. V. L.; CASTRO, R. N.; BERBARA, R. L. L. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecological Engineering*, v. 47, p. 203–208, 2012b.

GARCÍA, A.; BERBARA, R.; FARÍAS, L.; IZQUIERDO, F.; HERNÁNDEZ, O.; CAMPOS, R.; CASTRO, R. Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 13, p. 3125–3134, 2012a.

GARCIA, A.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; RUMJANEK, V. M.; CASTRO, R. N.; DOS SANTOS, F. S.; DE SOUZA, L. G. A.; BERBARA, R. L. L. Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Journal of Geochemical Exploration*, v. 136, p. 48–54, 2014.

GARCÍA, A.C.; QUINTERO, P.; JAVIER, J.; BALMORI, M.; LÓPEZ, H.; IZQUIERDO, G. Effects of a humic liquid extract obtained from vermicompost on growing and yield corn. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, v. 25, n. 1, p. 38–43, 2016c.

GARCÍA-MINA, J. M.; ANTOLÍN, M. C.; SANCHEZ-DIAZ, M. Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: A study based on different plant species cultivated in diverse soil types. *Plant and Soil*, v. 258, n. 1-2, p. 57–68, 2004.

GERDEMANN, J.; NICHOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol.*, v.46, p. 235-244, 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of roots. *New Phytologist - NEW PHYTOLOG.* 84. 489-500.1469-8137.1980.

GOLCHIN, A.; OADES, J.; SKJEMSTAD, J.; CLARKE, P. Study of free and occluded particulate organic matter in soils by solid state ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy and scanning electron microscopy. *Australian Journal of Soil Research*, v. 32, n. 2, p. 285, 1994.

GÓNZALEZ H, ZAPATA R, SADEGHIAN S. Caracterización de los ácidos húmicos en suelos de la zona cafetera de Caldas. *Cenicafé*.v.60. p.25–40. 2009.

GONZÁLEZ L.; GONZÁLEZ-VILAR M. Determination of relative water content. In: Roger MJR (Ed) *Handbook of plant ecophysiology techniques*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 207-212. 2001. Em: HAYSSAM M. ALI.; MANZER H. SIDDIQUI.; MOHAMMED O. BASALAH.; MOHAMED H. AL-WHAIBI, AHMED M. SAKRAN AND ABDULLAH AL-AMRI. Effects of gibberellic acid on growth and photosynthetic pigments of *Hibiscus sabdariffa* L. under salt stress. *African Journal of Biotechnology* V. 11. n.4. pp. 800-804. 2012.

GRACE C; STRIBLEY P. A safer procedure for routine staining of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, v.95, p.1160-1162, 1991.

GRAHAM, J.H.; DUNCAN, L.W.; EISSENSTAT, D.M. Carbohydrate allocation patterns in citrus genotypes as affected by phosphorus nutrition, mycorrhizal colonization and mycorrhizal dependency. *New Phytologist*, v.135, p.335-343, 1997.

GRYNDLER, M.; HRŠELOVÁ, H.; CAJTHAML, T.; HAVRÁNKOVÁ, M.; ŘEZÁČOVÁ, V.; GRYNDLEROVÁ, H.; LARSEN, J. Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of asymbiotic hyphal growth and root colonization. *Mycorrhiza*, v. 19, n. 4, p. 255–266, 2009.

GRYNDLER, M.; HRŠELOVÁ, H.; SUDOVÁ, R.; GRYNDLEROVÁ, H.; ŘEZÁČOVÁ, V.; MERHAUTOVÁ, V. Hyphal growth and mycorrhiza formation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum* BEG 23 is stimulated by humic substances. *Mycorrhiza*, v. 15, n. 7, p. 483–488, 14 Nov. 2005.

GRYNDLER, M.; VOSÁTKA, M.; HRŠELOVÁ, H.; CHVÁTALOVÁ, I.; JANSKA J. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and cellulose in growth substrate. *Appl Soil Ecol* 19:279–288. 2002.

GUARESCHI, R. F.; PEREIRA, M. G.; PERIN, A. Frações da matéria orgânica em áreas de Latossolo sob diferentes sistemas de manejo no Cerrado do estado de Goiás. *Ciências Agrárias*, v.34, p.2615-2628, 2013.

HARDOIM, P. R.; HARDOIM, C. C. P.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages. Plos One, v. 7, n. 2, p. e30438, 17 Feb. 2012.

HAYES, M.H.B. Emerging concepts of the compositions and structure of humic substances. In: Hayes, M.H.B., Wilson, W.S. (Eds.), Humic Substances in Soils. 1997.

HERNÁNDEZ DEL VALLE, G.; GONZÁLEZ, O. H.; GURIDI IZQUIERDO, F.; ARBELO FORTES, N. Influência de la siembra directa y las aplicaciones foliares de extracto líquido de Vermicompost en el crecimiento y rendimiento del frijol. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias, v. 21, n. 2, p. 86–90, 2012.

HERNANDEZ, O. L.; HUELVA, R.; GURIDI, F.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Humatos isolados de vermicomposto como promotores de crescimento em cultivo orgânico de alface. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias, v. 22, n. 1, p. 70–75, 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water- culture method for growi ng plants without soil. California Agricultural of Experimental Station Bull, v.347, p.1- 32, 1950.

ILLMER, P.; OBERTEGGER, U.; SCHINNER, F. Microbiological Properties in Acidic Forest Soils with Special Consideration of KCl Extractable Al. Water, Air, and Soil Pollution, v. 148, n. 1/4, p. 3–14, 2003.

IMAYA, A.; YOSHINAGA, S.; INAGAKI, Y.; TANAKA, N.; OHTA, S. Volcanic ash additions control soil carbon accumulation in brown forest soils in Japan. Soil Science and Plant Nutrition, v. 56, n. 5, p. 734–744, 2010.

INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY. Formación de las sustancias húmicas. (On line) Colorado, Estados Unidos, IHSS. Disponible em: <http://humic-substances.org/>. Consultado: 05/12/2016.

INVAM (International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi). Culture Methods. Disponible em: < <http://invam.wvu.edu/methods/cultures> >. Consultado: 04/03/2017.

JANNIN, L., ARKOUN, M., OURRY, A., LAÎNÉ, P., GOUX, D., GARNICA, M., FUENTES, M., SAN FRANCISCO, S., BAIGORRI, R., CRUZ, F., HOUDUSSE, F., GARCIA-MINA, J.M., YVIN, J.C.; ETIENNE, P.: “Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: involvement of N, C and S metabolisms”. Plant Soil, p. 297–319, 2012.

JANSA, J.; MOZAFAR, A.; KUHN, G.; ANKEN, T.; RUH, R.; SANDERS, I. R.; FROSSARD, E. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. Ecological Applications, v. 13, n. 4, p. 1164–1176, 2003.

JARAMILLO, J. D. Caracterización De La Materia Orgánica Del Horizonte Superficial de un Andisol Hidromórfico Del Oriente Antioqueño. Rev. Acad. Colomb. Cienc., v. 35, n. 134, p. 23–33, 2011.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, v. 48, p. 692, 1964.

JEZDINSKÝ, A., PETŘÍKOVÁ, K., SLEZÁK, K., POKLUDA, R. Effect of drought stress and *Glomus* inoculation on some physiological process of sweet pepper (*Capsicum annuum* L. cv. "Slávy"). *Acta Univ. Agriculturae Silv. Mendelianae Brun*, v.60, p. 69–76. 2012.

JODICE, R. Parametri chimici e biologici per la valutazione della qualità del compost. In: *Proceedings of the Compost Production and Use International Symposium*, S. Michelle all'Adige, 20- 23 June, p.363-384, 1989.

KARANIKA, E.D.; VOULGARIA, O.K.; MAMOLOSA, A.P.; ALIFRAGISB, D.A.; VERESOGLOUA, D.S. Arbuscular mycorrhizal fungi in northern Greece and influence of soil resources on their colonization. *Pedobiologia*, v.51, p.409-418. 2008.

KAUFFMAN III, G.L.; KNEIVEL, D.P.; WATSCHKE, T.L. Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Science*, v. 47, p.261-267. 2007.

KAYA, C.; TUNA, A. L.; OKANT, A. M. Effect of foliar applied kinetin and indole acetic acid on maize plants grown under saline conditions. *Turk J Agric For*, v. 34, p. 529–538, 2010.

KLIRONOMOS, J. N. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, Tempe, v. 84, n. 9, p. 2292-2301, 2003.

KONONOVA, M. M. *Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona: Oikos-tau, 1982.

KONONOVA, M. M. *Soil organic matter. Its nature, its role in soil formation and in soil fertility*. Oxford: Pergamon; 544. 32. 1966.

KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. *Glomus nanolumen* (Endogonaceae), a new species from Hawaii. *Mycologia*, v. 81, n.6, p.935-938. 1989.

KULIKOVA, N.A., STEPANOVA, E.V., KOROLEVA, O.V. Mitigating Activity of Humic Substances: Direct Influence on Biota. In: Perminova I.V., Hatfield K., Hertkorn N. (eds) *Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice*. NATO Science Series (Series IV: Earth and Environmental Series), v.52, p. 285-309, 2005

KUMADA, K. *Chemistry of soil organic matter*. Amsterdam, Elsevier. 5. p. 241. 1987. Disponível em: <http://www.ihss.gatech.edu/>. Consultado:01/09/2015.

KUMADA, K.; AIZAWA, K. The infrared spectra of humic acids. *Soil Plant Food*, 3,152-15. 1958. Em: YONEBAYASHI, K E HATTORI, T. Chemical and biological studies on environmental humic acids II. ¹H-nmr and IR spectra of humic acids. 1989. *Nutrition*, 35:3, 383-392, DOI: 10.1080/00380768.1989.10434771 Date: 17 January 2017

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait) Ait. f. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 236-284, 1976.

LABOURIAU, L.G. A germinação das sementes. Washington: secretaria da OEA, 1983.

LABRADOR, J. Avances en el conocimiento de la dinámica de la Materia Orgánica dentro de un contexto agroecológico. Agroecologia, v.7, p.91-108, 2012.

LADAN MOGHADDAM, A. R.; SOLEIMANI, A. Compensatory effects of humic acid on physiological characteristics of pistachio seedlings under salinity stress. Acta Horticulturae, n. 940, p. 253–255, 2012.

LAIRD, D. A.; CHAPPELL, M. A.; MARTENS, D. A.; WERSHAW, R. L.; THOMPSON, M. Distinguishing black carbon from biogenic humic substances in soil clay fractions. Geoderma, v. 143, n. 1–2, p. 115–122, 2008.

LAL, R. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. Geoderma, v. 123, n. 1–2, p. 1–22, 2004.

LI, A. R.; GUAN, K. Y. Mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of pedicularis species from Northwest of Yunnan Province, China. Mycorrhiza, v. 17, n. 2, p. 103-110, 2007.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, v. 148, p. 350–382, 1987.

LIMA, L. W. Metabolismo do Nitrogênio e Atividade de Bombas de Prótons em Raízes Transgênicas com Ácido Húmico e Simbiose Micorrízica Arbuscular. Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo. p. 153, 2008.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias de substâncias orgânicas na região do infravermelho. Quim. Nova, v.27. n.4. 670-673. 2004.

LOSS, A.; PEREIRA, M. G.; BERNINI, T. A.; VALLADARES, G. S. Caracterização química e hidrofóbica de organossolos e solos com horizonte hístico. Comunicata Scientiae, v. 6, n. 1, p. 113–122, 2015.

LUCERO, M.; BARROW, J.R.; OSUNA, P.; REYES I. A cryptic microbial community persists within micropropagated *Bouteloua eriopoda* (Torr.) Torr. cultures. Plant Sci, v. 174, p.570–575, 2008.

LUTGEN, E. R.; MUIR-CLAIRMONT, D.; GRAHAM, J.; RILLIG, M. C. Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland. Plant and Soil, v. 257, n. 1, p. 71–83, Nov. 2003.

LUTTS S., KINET J.M., BOUAHRMONT J. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Ann. Bot., v.78, p.389–398, 1996.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177.1962.

MALAN, C. Review: Humic and Fulvic Acids. A Practical Approach. Fertiliser Association of Southern Africa Symposium, n. Fig 1, p. Paper 6, 2015.

MALAVOLTA, E.; CROCOMO, O.J. Funções do potássio nas plantas. In: SIMPÓSIO SOBRE POTÁSSIO NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 1982, Londrina. Potássio na agricultura brasileira: Anais. Piracicaba: Instituto da Potassa & Fosfato / Instituto Internacional da Potassa, p.51-65, 1982.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação nutricional das plantas: princípios e aplicações. Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fosfato, Piracicaba, São Paulo, 319 p, 1997.

MAŁGORZATA SZCZEPANEK, EDWARD WILCZEWSKI. Effect of humic substances on germination of wheat and barley under laboratory conditions. *University of Technology and Life Sciences in Bydgoszcz. Scientiarum Polonorum Acta Agricultura* v.10.p. 79-86. 2011

MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. London: Academic Press. 1995. Em: LIMA, L.W. Metabolismo do Nitrogênio e Atividade de Bombas de Prótons em Raízes Transgênicas com Ácido Húmico e Simbiose Micorrízica Arbuscular. Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo. p. 153, 2008.

MARTIN D, SRIVASTAVA PC, GHOSH D, ZECH W. Characteristics of humic substances in cultivated and natural forest soils of sikkim. *Geoderma*.v.84. p.345–362. 1998.

MARTÍNEZ, C. X.; BRAVO, I.; MARTIN, F. J. Composición molecular de ácidos húmicos evaluada mediante pirólisis – cromatografía de gases – espectrometría de masas e hidrólisis térmica asistida y metilación en suelos altoandinos de Colombia. *Rev. Colomb.Quim*, v. 42, n. 4, p. 22–29, 2013.

MARTÍNEZ, D.; HUELVA, R.; PORTUONDO, L.; GURIDI, F. Evaluación del efecto protector de las Sustancias Húmicas Líquidas en plantas de maíz cultivar P-2928 en condiciones de salinidad. *Centro Agrícola*, v. 39, n. 1, p. 29–32, 2012.

MARTINEZ-BALMORI, D.; SPACCINI, R.; AGUIAR, N. O.; NOVOTNY, E. H.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Molecular characteristics of humic acids isolated from vermicomposts and their relationship to bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 47, p. 11412–11419, 2014.

MARTINS, M. A.; GONÇALVES, G. F.; SOARES, A. C. F. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares associados a compostos fenólicos, no crescimento de mudas de mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, n. 07, p. 1465-1471, 2000.

MATUS, F.; RUMPEL, C.; NECULMAN, R.; PANICHINI, M.; MORA, M. L. Soil carbon storage and stabilisation in andic soils: A review. *Catena*, v. 120, p. 102–110, 2014.

MAZHAR, A. A. M.; SHEDEED, S. I.; ABDEL-AZIZ, N. G.; MAHGOUB, M. H. RTICLES Growth, Flowering and Chemical Constituents. Performance of. Journal of Applied

MCDANIEL, P.A.; LOWE, D.J.; ARNALDS, O.; PING, C.-L. Andisols. In: HUANG, P.M.; LI, Y; SUMNER, M.E. (editors). Handbook of Soil Sciences. 2. v. 1, p. 1–52, 2012.

MEGANID, S.; AL-ZAHRANI, S.; SELIM, M. E.-M. Effect of Humic Acid Application on Growth and Chlorophyll Contents of Common Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* L.) under Salinity Stress Conditions. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, v. 4, n. 5, p. 2651–2660, 2015.

MEJIA, L. 2002. Notas sobre Taxonomía de Suelos, generalidades sobre los Principios Básicos y Estructura del sistema Taxonómico del USDA. Colombia. Centro Interamericano de Fotointerpretacion (CIAF), 1985. 97 p. Em: LARA O, M. Estudio del Proceso Físico Químico de extracción, fraccionamiento y cuantificación de Carbono Orgánico de Sustancias Húmicas de dos tipos de suelos: Andisols y Molisol, sometidos a tres sistemas de cultivos. Tesis de grado previo a la Obtención del título de Ingeniero Químico. Riobamba-Ecuador 2002.

MELO, R. O. DE; BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Corn initial vigor in response to humic acids from bovine manure and poultry litter. Semina: Ciências Agrárias, v. 36, n. 3. Supl1, p. 1863, 2015.

MENA, P. A.; JOSSE, C.; MEDINA G. Los Suelos del Páramo. Serie Páramo 5. GTP/Abya Yala. Quito. 2000.

MONTOYA, S. J.; MENJIVAR, F. J.; BRAVO, R. DEL S. Fraccionamiento y cuantificación de la materia orgánica en Andisoles bajo diferentes sistemas de producción. Acta Agronomica, v. 62, n. 4, p. 333–343, 2012.

MORA, V.; BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, A.-M.; AGUIRRE, E.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; GARCÍA-MINA, J.-M. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. Journal of Plant Physiology, v. 167, n. 8, p. 633–642. 2010.

MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2ed. atual. e ampl. - Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p. 2006.

MOROZESK, M. Efeitos dos ácidos húmicos provenientes de aterro sanitário em plantas. Disertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal no Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Espiritu Santo, p. 96, 2014.

MOTA, A.R, JOSÉ, R.; SOUZA, P.B DE.; OLIVEIRA L.M De. Efeito da substância húmica na germinação de sementes de Myracrodruon urundeuva. Revista Verde (Pombal -PB-

MOYA, F. M.; SANCHEZ, C. E.; CABEZAS, M. D.; CALDERIN, G. A.; MARRERO, L. D.; HECTOR, A. E.; PEREZ, ÁLVAREZ SANDRA. Influence of vermicompost humic acid

on chlorophyll content and acclimatization in banana clone, Enano Guantanamero. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 47, p. 2659–2670, 2016.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; ATTINIA, E. Biological Activity of Humic Substances Is Related to Their Chemical Structure. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v. 71, n. 1, p. 71–85, 2007.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; NARDI, S. Humic substance: Relationship between structure and activity. deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration*, v. 129, p. 57–63, 2013.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSWKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, p. 2.1- 2.24. 1999.

NANNIPIERI, P. Ciclo dela sostanza orgánica nel soulo: aspetti agronomici, chimici, ecologici e selvicolturali. Bologna. Em: FAÇANHA, A. R.; FAÇANHA, A.L.O; OLIVARES, F.L; GURIDI, F.; SANTOS, G.D.A; VELLOSO, A.C.X; RUMJANEK, V.M; BRASIL, F; SCHRIPEMA, J; BRAZ-FILHO R; DE OLIVEIRA M.A; CANELLAS, L.P. Bioatividade de ácidos húmicos: Efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 37, n. 9, p. 1301–1310, 2002.

NANNIPIERI, P.; GREGO, S.; DELL'AGNOLA, G.; NARDI, S. Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. In: NANNIPIERI, P. (Ed.). *Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici & selvicolturali*. Bologna: Patron. p. 67-78. 1983.

NARDI S, PIZZEGHELLO D. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 34, p. 1527–1536, 2002.

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.; GESSA, C.; FERRARESE, L.; TRAINOTTI, L.; CASADORO, G. Short communication A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. v. 32, p. 415–419, 2000a.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; RENIERO, F.; RASCIO, N. Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth. v. 64, n. 2, p. 639–645, 2000b.

NÈGRE, M., VINDROLA, D., SPERA, S., FERRARIS, L. AND GENNARI, M. Effect of the chemical composition of humic acids on their viscosity, surface pressure and morphology. *Soil Sci.* 167, PP. 636–651.2002.

NETTO, R.; FREITAS, A. F.; MARTINS, M. A.; CARVALHO, A. J. C. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares na bioprodução de fenóis totais e no crescimento de *Passiflora alata* Curtis. *Rev. Bras. Pl. Med. Campinas*, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2014.

NIKOLAOU, N.; KARAGIANNIDIS, N.; KOUNDOURAS, S.; FYSARAKIS, I. Effects of diferents P sources in soil on increasing growth and mineral uptake of mycorrhizal *Vitis vinifera* L. (cv Victoria) vines. *Journal International des Science de la Vigne et du*, v. 36, p. 195-204. 2002.

NOBRE, C. P. Fungos Micorrízicos Arbusculares em Briófitas e Raízes Modificadas de Manjerição (*Ocimum basilicum* L.) in vitro. Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo. p. 153, 2011.

NOBRE, C. P.; HUERTAS, O. C. T.; TARDIN, J. R. F.; JÚNIOR, O. J. S.; FONSECA, H. M. A. C.; BERBARA, R. L. L. Biostimulation of inoculation with *Glomus proliferum* and application of humic acid in the in vitro growth of *Lunularia cruciata*. *Acta Botanica Brasilica*, v. 27, n. 4, p. 773–778, 2013.

NOELTING, G.; BERNFELD P. On amylolytic enzymes III. The α - amylase: dosage of activity and control of the absence of amylase. *Helv. Chim. Acta*, v. 31, p.286-290. 1948.

NOVOTNY, E. H. Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo. p. 231, 2004.

NUNES, DA S. J; DE SOUZA, D. P.; MARODIN, B. G.; FACHINELLO, J. Eficiência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento do porta-enxerto de pessegueiro «aldrighi». *Bragantia*, v. 68, n. 4, p. 931–940, 2009.

OASA disponível em: <http://www.analyzeseeds.com/publications/>. Acesso em: 24/01/2015

CAMARGO, F. A de O; ZONTA, E.; SANTOS, G de A.; ROSSIELLO, R. O. P. Revisão bibliográfica. Aspectos fisiológicos e caracterização da toxidez de ácidos orgânicos voláteis em plantas physiological aspects and characterization of volatile organic acids toxicity on plants. v. 31, n. 3, p. 523–529, 2001.

ORLOV, D.S.; AMMOSSOVA, I.A; GLEBOVA G. I. Molecular parameters of humic acids. *Geoderma* 13:211–229.1975.

OLIVEIRA, M.L.E. Desenvolvimento de plântulas. Setor Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. Disponível em: <http://www.ledson.ufla.br/metabolismo-dagerminacao/etapasdagerminacao/desenvolvimento-de-plantulas/>. Consultado: 16-02-2018.

PÉREZ-MONCADA, U.; RAMÍREZ-GÓMEZ, M.; NÚÑEZ-ZARANTE, V.; FRANCO-CORREA, M.; ROVEDA-HOYOS, G. Evaluación de un sistema para la micorrización in vitro en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth). *Universitas Scientiarum*, v. 17, n. 2, p. 10, 2012.

PHILLIPS, J.M. AND AHYMAN, D.S. (Improved Procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection. *Transactions of the British Mycological Society*, v.55, p.158-161, 1970.

- PICCOLO, A. The Supramolecular Structure of Humic Substances. *Soil Science*, v. 166, n. 11, p. 810–832, 2001.
- PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 24, n. 4, p. 373–380, 1992.
- PINHEIRO, G. L.; SILVA, C. A.; FURTINI NETO, A. E. Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em resposta à aplicação de concentrações de ácido húmico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1217-1229, 2010.
- VARANINI, Z.; PINTON, R.; DE BIASI, M.G.; ASTOLFI, S.; MAGGIONI, A. Low molecular weight humic substances stimulated H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant Soil*, 153:61 -69, 1993.
- PINTON, R.; VARANINI Z.; VIZZOTO G.; MAGGIONI A. Soil humic substances affect transport-properties of tonoplast vesicles isolated from oat roots. *Plant and Soil*, v.142, p.203-210, 1999.
- PRIMO, D. C.; MENEZES, R. S. C.; SILVA, T. O. D. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. *Scientia Plena*, v. 7, n. 5, p. 1–13, 2011.
- PURIN, S.; RILLIG, M.C. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia* 51, 123-130. 2007
- QUAGGIOTTI, S., RUPERTI, B., PIZZEGHELLO, D., FRANCIOSO, O., TUGNOLI, V., NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* v.55, p.803-813. 2004.
- RANDING, O.; MEDEIROS, C. A.; SPERANDIO, C. Efeito da desinfestação do solo pela solarização sobre Fungos Micorrízicos Arbusculares. *Rev. Bras. Ci. Solo*, v. 26, p. 135–140, 2002.
- REIS, G. G.; MULLER, M. W. Análise de crescimento de plantas - mensuração do crescimento. Belém, CPATU, 1978. 35p.
- REYES, J.J. Aplicación del humus líquido (Liplant) como alternativa ecológica para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*. Mill) en suelos afectados por salinidad. Dissertação em opção al título de Máster en Agroecología y Agricultura sostenible. Universidad Agraria de La Habana (UNAH), Cuba, 2008.
- REZA AMIRJANI, M. Effect of Salinity Stress on Growth, Sugar Content, Pigments and Enzyme Activity of Rice. *International Journal of Botany*, v. 7, n. 1, p. 73–81, 2011.
- REZAZADEH, H.; KHORASANI, S. K.; HAGHIGHI, R. S. A. Effects of humic acid on decrease of phosphorus usage in forage maize var. KSC704 (*Zea mays* L.). *AJAE*, v. 3, n. 2, p. 34–38, 2012.

RILLIG, M. C.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A.; SCHMIDT, W. F.; M S TORN. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil* 233, 167–177. 2001.

RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, v.28, n.4, p.355-363, 2004.

RODRIGUES, L. A.; ALVES, C. Z.; REGO, C. H.; DA SILVA, T. R.; DA SILVA, J. B. Humic acid on germination and vigor of corn seeds. *Revista Caatinga*, v. 30, n. 1, p. 149–154. 2017.

ROMERO, E.; PLAZA, C.; SENESI, N.; NOGALES, R.; POLO, A. Humic acid-like fractions in raw and vermicomposted winery and distillery wastes. *Geoderma*, v.139, p.397-406, 2007.

ROSA, C. M. da.; CASTILHOS, R. M. V.; VAHL, L. C.; CASTILHOS, D. D.; PINTO, L. F. S.; OLIVEIRA, E. S.; LEAL, O. A. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. *R. Bras. Ci. Solo*, 33: p. 959-967, 2009.

ROSA, H.A.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M. Substâncias húmicas de turfa: Estudo dos parâmetros que influenciam no processo de extração alcalina. *Quimica Nova*, v.23. n. 4. 2000.

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. *Adv. Agron*, v.124, p.37-89, 2014.

SALGADO, F.H.M. Fungos micorrízicos arbusculares e estimulante da colonização micorrízica em culturas agrícolas em solo de cerrado. Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 59 p. 2014.

SANCHES, S.M.; DE CAMPOS, S.X.; VIEIRA, E.M. Caracterização das frações das substâncias húmicas de diferentes tamanhos moleculares. *Ecletica Química*. v.32. n. 1, p.49-56, 2007.

SANTOS, L.L.; LACERDA, J.J.J.; ZINN, Y. Partição de substâncias húmicas em solos brasileiros. *Ver. Bras. Cien. Solo*, v.37, p.955-968. 2013.

SCHENCK, N. C.; PEREZ, Y. A manual for identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. 2nd ed. Gainesville: University of Florida. 241 p. 1988.

SCHITZER, M. Humic Substance: chemistry and reactions. In: SCHNITZER, M.; KAHN, S.U. (Ed.) *Soil organic matter*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, p.1-64, 1978.

SCHITZER, M.; KODAMA, H.; RIMPEESTER, J. A. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55.1991. Em: BRIGHENTI, C. R. G; REIS E. L E REIS., C. Características físico-químicas de ácidos

húmicos em diferentes etapas da vermicompostagem. ECLÉTICA química. v. 35, n. 2, p. 69-82, 2010.

SCHNITZER M. Chemistry of Fulvic Acid, a Soil Humic Fraction, and its Relation to Lignine.p.951. 1970.

SCHREINER, R.P. Effects of native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of ‘Pinot noir’ (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorus. Applied Soil Ecology, v.36, p.205-215, 2007.

SCHULTEN, H. R.; LEINWEBER, P. New insights into organicmineral particles: composition, properties, and models of molecular structure. Biol Fertil Soils v. 30, p.399-432. 2004.

SCHULTEN, H. R, SCHNITZER M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. Soil Sci.p.115-162.1997.

SCHUMACHER, M.V.; BRUN, E. J.; HERNANDES, J. I. KONIG, F.G. Produção de serapilheira em uma floresta de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no município de Pinhal Grande-RS. Rev. Árvore [online]. v.28, n.1, p.29-37. 2004.

SENESI, N.; LOFFREDO, E. The chemistry of soil organic matter. In: SPARKS, D.L. (Ed.) Soil physical chemistry, 2a ed. 409p. 1998. Em: FONTANA, 2009.

ŠERÁ, B.; NOVÁK, F. The effect of humic substances on germination and early growth of Lamb’s Quarters (*Chenopodium album* agg.). Biologia, v. 66, n. 3, p. 470, 2011.

SHENG, M.; TANG, M.; CHEN, H.; YANG, B.; ZHANG, F.; HUANG, Y. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. Mycorrhiza, v. 18, n. 6–7, p. 287–296, 2008.

SHINDO, H.; HONNA, T.; YAMAMOTO, S.; HONMA, H. Contribution of charred plant fragments to soil organic carbon in Japanese volcanic ash soils containing black humic acids. Organic Geochemistry, v. 35, n. 3, p. 235–241, 2004.

SIEWERDT, L.; SIEWERDT, L.; SILVA, R.; JABLONSKI, A.; JUNIOR, P. S. Crescimento da parte aérea e do sistema radicular do milho cultivado em solução nutritiva adicionada de substâncias húmicas. Current Agricultural Science and Technology, v. 5, n. 2. 2012.

SILVA, A.C.; HORÁK, I.; VIDAL-TORRADO, P.; CORTIZAS, A.M.; RACEDO, J.R.; CAMPOS, J.R DA R. Turfeiras da serra do espinhaço meridional - MG. II - Influência da drenagem na composição elementar e Substâncias húmicas. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 33, n. 5, p. 1399–1408, 2009.

SILVA, A. C.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; AGUIAR, N. O.; FRADE, D. Â. R.; REZENDE, C. E.; PERES, L. E. P. Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 35, n. 5, p. 1609–1617, 2011.

SILVA, F. A. DE M.; GUERRERO LOPEZ, F.; VILLAS BOAS, R. L.; SILVA, R. B. DA. Transformação da matéria orgânica em substâncias húmicas durante a compostagem de resíduos vegetais. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 4, n. 1, p. 59–66, 2009.

SILVA, M.E.F.; DE LEMOS, L.T.; OLGA C. NUNES, O.C.; CUNHA-QUEDA, A.C. Influence of the composition of the initial mixtures on the chemical composition, physicochemical properties and humic-like substances content of composts. *Waste Management*. v. 34, n.1, p.21-27, 2014.

SILVA, R. M. da; JABLONSKI, A.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA JUNIOR, P. Crescimento da parte aérea e do sistema radicular do milho cultivado em solução nutritiva adicionada de substâncias húmicas. *Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas*, v. 5, n. 2, p. 101-110, 1999.

SILVEIRA, S.V.; SOUZA, P.V.D.; KOLLER, O. C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de abacateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, p.303-309, 2002.

SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R. & STURMER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares: características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. *Biotecnol. Ci. Desenv.*, v.25, p.12-21, 2002.

SMART, R. E.; BINGHAM, G. E.; Rapid Estimates of Relative Water Content *Plant Physiol.* Vol. 53, 258-260, 1974. Em: DUTRA, D.A.; SAMPAIO, A.H.R.; GUIMARAES, M.J.M.; DA SILVA, O.R.; CALBO, A.G.; FILHO, M.A.C. Relação entre conteúdo relativo de água e potencial de turgor obtido com wiltmeter em folhas de mamoeiro. *Embrapa*.2011.

SMITH, S.E., READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*. Califórnia: Academic Press; 3 edition. 800 p. 2008.

SOARES, A. C. F.; MARTINS, M. A. Influência de fungos micorrízicos arbusculares, associada à adição de compostos fenólicos, no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpus*). *Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa*, v. 24, n. 4, p. 731-740, 2000.

SOLIS-MEJIA, L., ISLAS-ESPINOZA, M.; VICENTA, E.M.: “Vermicomposting of Sewage Sludge: Earthworm Population and Agronomic Advantages”. *Compost Sci Util.* v.20, p. 11-17, 2012.

SOLOMON, D.; LEHMANN, J.; KINYANGI, J.; LIANG, B.; SCHÄFER, T. Carbon K-edge NEXAFS and FTIR-ATR Spectroscopic Investigation of Organic Carbon Speciation in Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* v.69, p.107–119. 2005.

SONG, G., HAYES, M.H.B., NOVOTNY, E.H., SIMPSON, A.J. Isolation and fractionation of soil humin using alkaline urea and dimethylsulphoxide plus sulphuric acid. *Naturwissenschaften*, v. 98, p.7–13, 2011.

SOUZA, F. A., STÜRMER, S. L., CARRENHO, R. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. Em: SIQUEIRA, J. O.,

SOUZA F. A., CARDOSO, E. J. B. N., TSAI, S. M. Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil. Lavras: UFLA. p. 15-73. 2010.

SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Molecular characterization of compost at increasing stages of maturity: Thermochemolysis-GC-MS and ¹³C-CPMAS-NMR spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v.55, p. 2303–2311. 2007.

STEELINK, C. Implications of elemental characteristics of humic substances. 1985. Em: AIKEN, G. R.; McKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L.; MacCATHY, P. (Eds.). Humic substances in soil, sediment, and water. Geochemistry, isolation and characterization. New York: Wiley, Interscience, 1985. Em: Canellas HUMOSFERA

STEVENSON, F. J. Organic forms of soil nitrogen. In: John Wiley, ed. Humic Chemistry: Genesis, Composition, and Reaction. New York. p 59-95. 1994.

STEVENSON, F.J. “Extraction, fractionation and general chemical composition of soil organic matter”. 1982. Em: ROSA, André Henrique. Desenvolvimento de metodologia para extração de substâncias húmicas de turfas utilizando se hidróxido de potássio. Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestres em Ciências. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 99p. 1998.

STEVENSON, F.J.; Geochemistry of Soil Humic Substances. Em: (Eds AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.) Humic Substances in Soil, Sediment and water, Wiley & Sons New York. p.13.1985.

STEVENSON, F. J.; GOH, K. M. Infrared spectra of humic acids and related substances. Geochimica et Cosmochimica Acta, Volume 35, Issue 5, p. 471-483. 1971.

SUGAI, M. A. A.; COLLIER, L. S.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J. Inoculação micorrízica no crescimento de mudas de angico em solo de cerrado. Bragantia, v. 70, n. 2, p. 416- 423, 2011.

SULTANA, N.; IKEDA, T.; ITOH, R. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. Environmental and Experimental Botany, Amsterdam, v.42, n.3, p.211-220, 1999.

SWIFT, R.S; POSNER, A.M. Gel chromatography of humic acid. J soil Sci. 22:237-249, 1971. Em: CANELLAS, L.P. E SANTOS, G.A. (Eds.) Humosfera – Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes, UENF, 2005, 309p.

TAN, K.H. Humic matter in soil and the environment: principles and controversies, CRC Press, 408p. 2003.

TÁVORA, F. A. F.; FERREIRA, G.; HERNANDEZ, F. F. Crescimento e relações hídricas em plantas de goiabeira submetidas a estresse salino com NaCl. Rev. Bras. Frutic, v. 23, n. 106, p. 441–446, 2001.

THOMAZINI, A.; DELEON MARTINS, L. Qualidade física e fisiológica de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) Cultivar mg2 em condições de casa de vegetação e laboratório. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, v. 7, n. 12, p. 1–9, 2011.

TOMATI, U., BELARDINELLI, M., ANDREU, M., GALLI, E. Evaluation of Commercial Compost Quality. *Waste Management & Research*, v. 20, p. 389-397, 2002. Em: SILVA, M. F.; GUERRERO, F.; VILLAS, R. L.; SILVA, R.G. Transformação da matéria orgânica em substâncias húmicas durante a compostagem de resíduos vegetais. *Revista Brasileira de Agroecologia Rev. Bras. de Agroecologia*. 4(1):59-66. 2009.

TREBOUET, D.; SCHLUMPF, J. P.; JAOUEN, P.; QUEMENEUR, F. Stabilized Landfill Leachate Treatment By Combined Physicochemical – Nanofiltration Processes. v. 35, n. 12, p. 2935–2942, 2001.

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. 635–43, 2010.

TROUVELOT, A.; KOUGH, J. L.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae = Aspects physiologiques et génétiques des mycorrhizes: proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae*, Dijon, 1986.

TSUTSUKI K.; KUWATSUKA S. (1978) Chemical studies on soil humic acids--II. Composition of oxygen-containing functional groups of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.* 24, 547-560. Em: Yonebashi e Hattori 1988.

USDA. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Claves para la Taxonomía de Suelos. Décima segunda Edición, 2014.

VAUGHAN, D. MALCOLM, R.E. Influences of humic substances growth and physiological processes. Em *Soil Matter and Biological Activity*. Vaughan, D., Malcolm, R.E. Eds. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht, pp. 37-76. 1985.

WAN, X., LANDHÄUSSER, S.M., ZWIAZEK, J.J., LIEFFERS, V.J. Stomatal conductance and xylem sap properties of aspen (*Populus tremuloides*) in response to low soil temperature. *Physiol. Plantarum*, v.122, p.79–85, 2003.

WANG Y, VESTBERG M, WALKER C, HURME T, ZHANG X, LINDSTRÖM K. Diversity and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan Province of mainland China. *Mycorrhiza*. v.18. p. 59-68.2008

WENCOMO, H. B. Rendimiento de materia seca y otros componentes en *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham con el uso del Liplant. v. 36, n. 1, p. 43–49, 2013.

WHITBY, H.; VAN DEN BERG, C. M. G. Evidence for copper-binding humic substances in seawater. *Marine Chemistry*, v. 173, p. 282–290, 2015.

WILLADINO, L.; HENRIQUE, M.; MARTINS, B.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, G.; DIAS ALVES, G. Resposta de genótipos de milho ao estresse salino em condições hidropônicas. *Scientia Agricola*, v. 56, n. 4, p. 1209–1213, 1999.

WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, v.198, p.97–107. 1998.

XIAOLI, C.; SHIMAOKA T.; XIAOYAN C.; QIANG, G.; YOUCAI, Z. Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere*, v. 69, n. 9, p. 1446–1453, 2007. Em: BALDOTTO, M. A; BALDOTTO, L. E.B. Ácidos húmicos. *Rev. Ceres, Viçosa*, v. 61, supl. p. 856-881, Dec. 2014.

XIAOLI, C.; SHIMAOKA, T.; QIANG, G; YOUCAI Z. Characterization of humic and fulvic acids extracted from landfill by elemental composition, ¹³C CP/MAS NMR and TMAH-Py-GC/MS. *Waste Management*, v. 28, n. 5, p. 896–903, 2008.

YANG, C. M.; WANG, M. C.; LU, Y. F.; CHANG, I. F.; CHOU, C. H. Humic substances affect the activity of chlorophyllase. *Journal of Chemical Ecology*, v. 30, n. 5, p. 1057–1065, 2004.

YANO-MELO, A.M.; FREITAS, N.O.; SILVA, F.S.; MELO, N.F.; SILVA FILHO, A. V.; MAIA, L.C. Aplicação de ácido húmico em mudas enxertadas e Micorrizadas de uva sem semente (iac 766/crimson seedless), em dois solos do vale do submédio são francisco. *Plant Signaling & Behavior*, v. 8, n. 8, p. 1–12, 2013.

YEOMANS, J.C.; BREMNER, J.M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 19:1467-1476, 1988

YIGIDER, E.; SINAN, M.; SIGMAZ, B.; AYDIN, M.; AGAR, G. Humic acids protective activity against manganese induced LTR (long terminal repeat) retrotransposon polymorphism and genomic instability effects in *Zea mays*. *PLGENE*, v. 6, p. 13–17, 2016.

YONEBAYASHI, K.; HATTORI, T. Chemical and biological studies on environmental humic acids II. ¹H-NMR and IR spectra of humic acids. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 35, n. 3, p. 383–392, 1988.

ZANCANI, M.; BERTOLINI, A.; PETRUSSA, E.; KRAJŇÁJIVÁ J, PICCOLO, A. Fulvic acid affects proliferation and maturation phases in *Abies cephalonica* embryogenic cells. *J Plant Physiol*, v.168, p.1226–1233, 2011.

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

ZANDONADI, D. B.; SANTOS, M. P.; MEDICI, L. O.; SILVA, J. Ação da matéria orgânica e suas frações sobre a fisiologia de hortaliças. *Horticultura Brasileira*, v.32, p. 14–20, 2014.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T.M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, v.79, p.117–161. 1997.

ZHANG, X.; SCHMIT, R.E. The impact of growth regulators on the alpha-tocopherol status in water-stressed *Poa pratensis* L. 1997. Em: DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, v. 196, p. 3–14, 2015.

ZHU, X.; SONG, F.; LIU, S. Q.; LIU, T.; ZHOU, X. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. *Plant. Soil. Environ*, v. 58, n. 4, p. 186–191, 2012.

ZHU, Y. G.; MILLER, R. M. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. *Trends Plant Sci.* v.8. n.9. p.407-409. 2003

ZIECHMANN W. Humic Substances. Mannheim: Wissenschaftsverlag 1994.

ZWIAZEK J.J.; BLAKE T.J. Effects of preconditioning on electrolyte leakage and lipid composition in black spruce (*Picea mariana*) stressed with polyethylene glycol. *Physiol. Plant.* n.79: 71–77. 1990. Em MOHAMMED BAJJI, M.; KINET, J.M.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation.* p1–10, 2001.

9. ANEXOS

9.1. Anexo A – Solos e Vermicomposto

Tabela 11. Características físico químicas dos solos e vermicomposto utilizados para a extração de substâncias húmicas. Valores médios de 3 réplicas.

Parâmetro	Unidade	Solo-Vermicomposto		
		Organossolo	Andisol	Vermicomposto ¹
pH (H ₂ O)	Unidade	5	5,8	7,1
P	mg kg ⁻¹	162	9,5	6,4
Al+H		12,1	4,6	---
K		0,51	0,9234	12,7
Ca	cmolc dm ⁻³	4,6	5,7	15,2
Mg		1,9	1,5	8,5
Al		1	0,01	---
Na		0,11	0,089	1,5
S. B	cmolc dm ⁻³	7,1	8,2	---
CTC (T)		19,2	12,8	---
V	%	37,045	64,097	---
N Total		4,2	2,4	16,1
Zn		3,3	7,1	137
Cu		2	2,7	4,9
Fe	mg dm ⁻³	150	90	1345
Mn		3,7	72,4	935
S		29	60	3,3
B		0,53	0,7	19,13
Silte	g kg ⁻¹	522	575	---
Argila		478	425	---
M.O	g dm ⁻³	147,06	51,72	218,43
COT		85,3	57,38	126,7
AH		2,10	4,65	6,34
AF	g kg ⁻¹	10,05	11,67	10,48
HUM		46,74	52,53	141,87
AH/AF		0,21	0,40	0,60

¹N determinado por digestão sulfúrica; B por incineração e os demais elementos por digestão nitroperclorica.

9.2. Anexo B – Plântulas de Milho

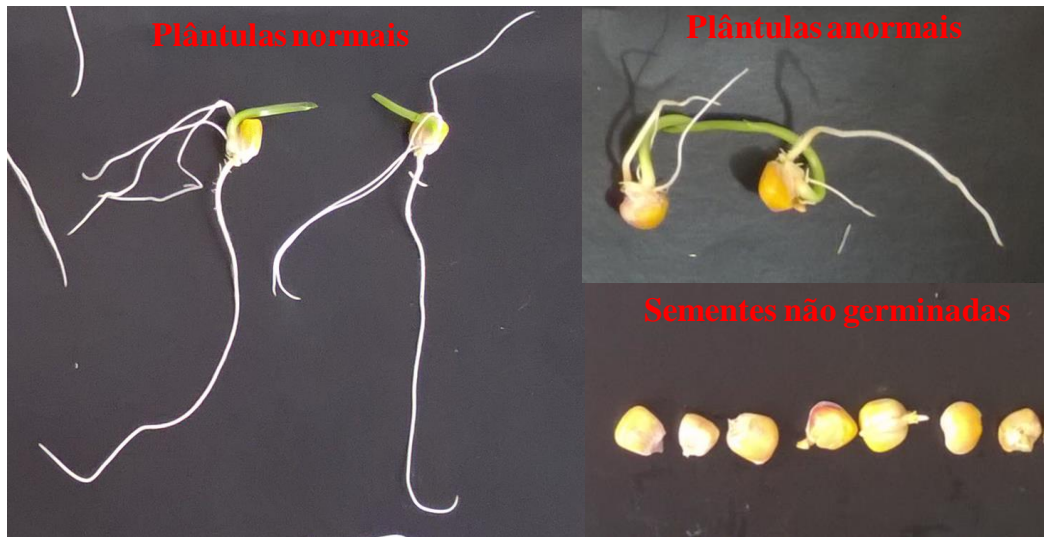


Figura 33. Plântulas normais, anormais e sementes não germinadas de milho sob efeito de substâncias húmicas.

9.3. Anexo C – Concentrações de HS

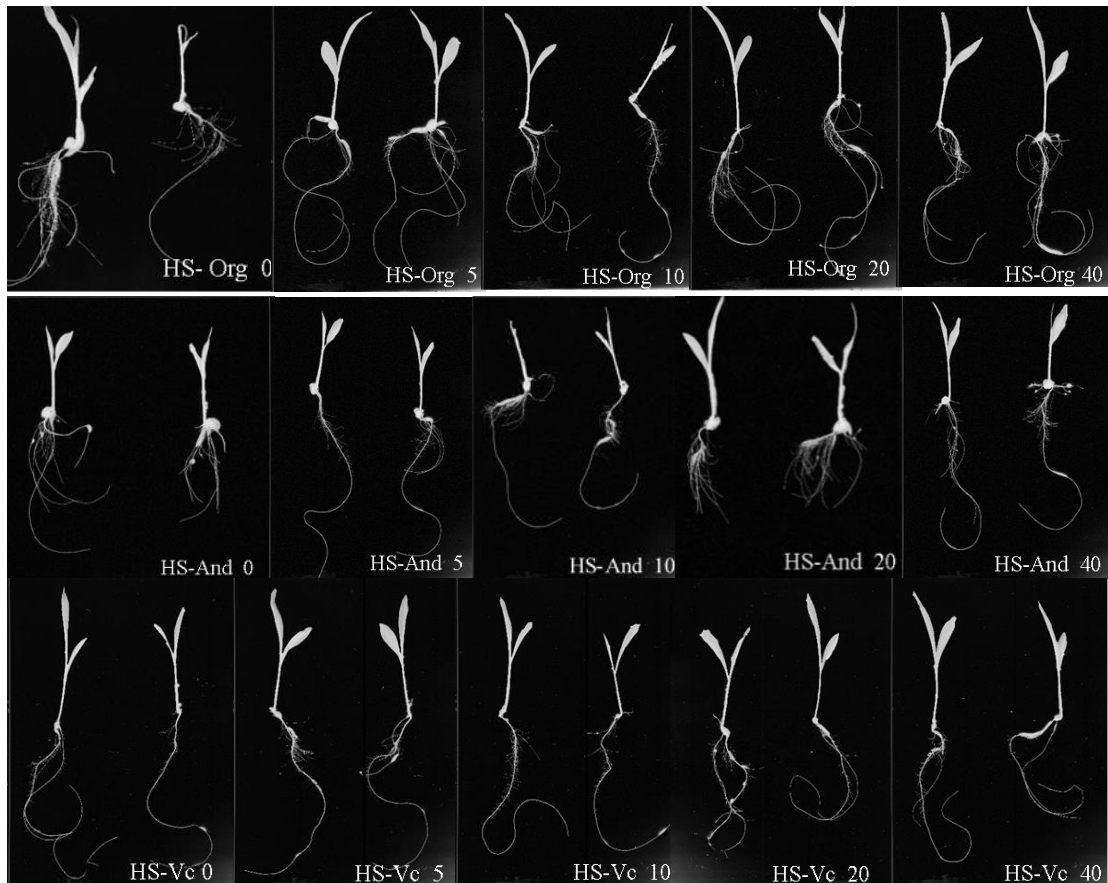


Figura 34. Efeito de cinco concentrações de HS de três origens nos parâmetros radiculares de plântulas de milhos aos 6 DAT. Imagens obtidas com Scanner Epson Expression 10000 X.