

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV

**Bioinsumos à base de substâncias húmicas podem afetar o crescimento
inicial de *Calophyllum brasiliensis* Cambess?**

DANILO MARQUES FRANÇA

Brasília – DF

Julho de 2016

DANILO MARQUES FRANÇA

Bioinsumos à base de substâncias húmicas podem afetar o crescimento inicial de *Calophyllum brasiliensis* Cambess?

Projeto final de Estágio Supervisionado, submetido à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Professor Jader Galba Busato

Brasília – DF

Julho de 2016

Bioinsumos à base de substâncias húmicas podem afetar o crescimento inicial de *Calophyllum brasiliensis* Cambess?

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientador Prof. Dr. Jader Galba Busato

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Everaldo Anastácio Pereira

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Brasília – DF

Julho de 2016

Folha de aprovação

Bioinsumos à base de substâncias húmicas podem afetar o crescimento inicial de *Calophyllum brasiliensis* Cambess?

Projeto final de Estágio Supervisionado, submetido à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Danilo Marques França
Orientador: Jader Galba Busato

COMISSÃO EXAMINADORA

__ de julho de 2016

Orientador Prof. Dr. Jader Galba Busato

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Everaldo Anastácio Pereira

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me oferecer saúde e condições de ir e voltar da universidade todos os dias para adquirir conhecimento; Ao meu orientador Jader, pela oportunidade, paciência e conhecimento transmitido em cada orientação; À minha mãe Claudete, pelo apoio e amor incondicional; Ao meu pai João, pelo investimento na minha educação e sua memória viva; À minha companheira de vida Ayelen, pelo amor e incentivo de sempre; À minha filha Clara, por ser minha maior inspiração; Aos meus irmãos Daniel e Janeth; Aos colegas de laboratório Bruno e Alan; À todos meus amigos e professores da agronomia.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
Hipótese	17
Objetivo Geral	17
Objetivos Específicos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Obtenção das sementes e quebra de dormência	18
3.2. Vermicompostagem	19
3.3. Obtenção dos ácidos húmicos	20
3.4. Obtenção do extrato húmico solúvel em água (EHSA)	20
3.5. Características dos AH e EHSA	21
3.6. Testes com plantas	21
3.6.1. Estimativa do teor de clorofila (SPAD).....	22
3.6.2. Número de folhas e número de raízes laterais	22
3.6.3. Comprimento da parte aérea e da raiz principal	22
3.6.4. Diâmetro do caule e da raiz principal	22
3.6.5. Índice de área foliar	23
3.6.6. Massas frescas e secas das partes aérea e radicular	24
3.7. Análise estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

França, Danilo Marques, **Bioinsumos à base de substâncias húmicas podem afetar o crescimento inicial de *Calophyllum brasiliensis* Cambess.** 2016. Monografia (Bacharelado em Agronomia). Universidade de Brasília-UnB.

RESUMO - Os bioestimulantes do crescimento vegetal compõem uma importante possibilidade de obtenção de mudas saudáveis e mais adaptadas ao estresse enfrentado por plântulas após o transplântio para as áreas definitivas, após a fase de viveiro. As substâncias húmicas (SH), particularmente a fração ácidos húmicos (AH), são considerados potenciais agentes de estímulo ao crescimento vegetal. O principal efeito observado com o uso de AH está relacionado ao estímulo ao crescimento de raízes laterais, um efeito semelhante ao fitohormônio auxina. Como isso, aumenta-se a capacidade de absorção de nutrientes e água pelas plantas. O extrato húmico solúvel em água (EHSA) obtido de compostos orgânicos também tem sido apontado como possível agente capaz de atuar como bioestimulante vegetal. Apesar disso, os trabalhos envolvendo o uso dessas substâncias em espécies florestais de interesse para programas de recuperação ambiental e exploração sustentada de madeira são ainda incipientes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial bioestimulante de AH e EHSA em mudas de *Calophyllum brasiliensis* Cambess durante a fase inicial de crescimento em viveiro. O experimento foi desenvolvido na estação biológica da Universidade de Brasília, empregando-se doses crescentes de AH (0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L⁻¹) e de EHSA (0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L⁻¹), ambos extraídos de vermicomposto de esterco bovino. Potenciais efeitos bioestimulantes de cada material foram avaliados independentemente, seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições, num total de 48 observações por estimulante. Aumentos de 40% no diâmetro da raiz foram observados com a aplicação de 20 mg L⁻¹ de AH. Para a dose de 40 mg L⁻¹ de AH, houve também aumento de 33% no comprimento da raiz principal. Para EHSA, a adição de 40 mg L⁻¹ resultou em incrementos de 52%, 35% e 36% no número de raízes laterais, índice de área foliar e comprimento da parte aérea, respectivamente. A utilização dos bioestimulantes influenciou de forma positiva no desenvolvimento das raízes, no crescimento e no índice de área foliar das mudas de *Calophyllum brasiliensis* Cambess.

Palavras-chave: sistemas agroflorestais; fitohormônios; bioestimulantes.

Can biostimulants based on humic substances affect the initial growth of *Calophyllum brasiliensis* Cambess?

ABSTRACT - Biostimulants of plant growth represent a major opportunity for securing healthy seedlings that are more adaptable to the stresses of the process of transplantation in definite areas, following their nursery stage. Humic substances (HS), particularly humic acid fraction (HA), are considered potential plant growth promoting agents. The main effect observed with the use of HA is related to the growth stimulation of lateral roots, an effect similar to that of auxin phytohormone, which increases the plants' ability to absorb nutrients and water. The Water-soluble humic matters obtained from organic compounds have also been indicated as a potential plant growth promoting agent. Nevertheless, studies involving the use of such substances in forest species of interest for environmental recovery programs and sustainable exploitation of wood are still incipient. The objective of the present study was to evaluate the biostimulant potential of HAs and Water-soluble humic matters in *Calophyllum brasiliensis* Cambess seedlings during their growth phase in the nursery. The experiment was carried out at the Biological Station of the University of Brasilia, using increasing doses of HA (0.0; 2.5; 5.0; 10.0; 20.0 and 40.0 mg L⁻¹) and of Water-soluble humic matter (0.0; 2.5; 5.0; 10.0; 20.0 and 40.0 mg L⁻¹), both extracted from vermicompost. The effects of potential biostimulants were evaluated independently by following an entirely randomized design with eight replications, totalizing 48 observations. An increase of 40% in root diameter was observed with the applied dose of 20 mg L⁻¹ and of 33% in length of the main root was observed with the applied dose of 40 mg L⁻¹ HA. The additions of 40 mg L⁻¹ water-soluble humic matters resulted in increments of 52%, 35% and 36% for the number of lateral roots, leaf area index and shoot length, respectively. Therefore, the use of biostimulants have proven a positive influence in root development, growth, and leaf area index of *Calophyllum brasiliensis* Cambess seedlings.

Keywords: agroforestry systems; phytohormones; biostimulants.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura no Brasil sempre esteve inserida em todo o seu contexto histórico, desde quando serviu como base e motivo para a chegada de povos de diferentes nacionalidades, até a sua importância na história política e econômica contemporânea do país. A agricultura também esteve presente nas civilizações nativas, porém praticada de maneira distinta. Neste caso, além do homem atuar como plantador de florestas, utilizava a agricultura para fins de subsistência e também como uma alternativa de interação com a terra. Por se tratar de um país com dimensões continentais e haver passado por um processo de colonização conturbado, sem nenhum critério específico, sucedeu uma exacerbada distribuição e divisão das terras, fortalecendo a relação entre governo e grandes proprietários rurais (Leal, 1997). Além disso, as práticas adotadas herdadas por diversas gerações não incluíam qualquer preocupação com a conservação dos recursos naturais, com a inexistência de conceitos associados à produção agropecuária sustentável.

Desta forma, as diferentes paisagens fitogeográficas brasileiras têm sofrido interferências antrópicas. A região Centro-Oeste, por exemplo, tornou-se uma grande fronteira agrícola e é, atualmente, um polo extremamente forte na produção de grãos e na pecuária extensiva. Como resultado, grande parte do bioma Cerrado teve sua vegetação nativa substituída por cultivos, contando com somente 8,21% de seu território protegido por unidades de conservação (MMA, 2016).

A substituição da paisagem nativa por monocultivos agrícolas tem sido apontada também como responsável por parte das alterações climáticas que afetam o planeta na atualidade (Neto et al., 2011). Quando a vegetação nativa é preservada, os solos apresentam uma estabilidade no estoque de carbono orgânico, em uma dinâmica fundamental para a conservação dos ecossistemas (Xu et al., 2009). O revolvimento

intenso do solo impacta negativamente características como a densidade, o volume de poros e na estabilidade de agregados (Carneiro et al., 2009), especialmente em regiões de clima tropical, que apresentam elevado potencial de perdas por processos erosivos (Piccolo et al., 2008), afetando o desenvolvimento de plantas e a qualidade dos diferentes compartimentos ambientais (Bertol et al., 2004).

Atualmente, a sociedade se encontra mais informada a respeito dos impactos ambientais relacionados com as práticas agrícolas, o que resulta em questionamentos a respeito de toda cadeia produtiva, que envolve fatores ambientais e sociais. Com base nisso, é crescente o interesse e o uso de práticas de cunho conservacionistas. Nesse sentido, alguns sistemas de produção agrícola têm sido apontados como capazes de garantir a oferta de alimentos, fibras e madeira sem, no entanto, reduzir a qualidade dos diferentes compartimentos ambientais. Os sistemas agroflorestais (SAF) são exemplos e se apresentam como uma alternativa de produção agropecuária que busca diminuir o efeito da intervenção humana, consorciando várias espécies dentro de uma mesma área, aproveitando as interações benéficas entre as plantas de diferentes funções, ciclos e portes (Sanchez, 1995; Marinho et al., 2014). Nos SAF, observa-se o uso eficiente de recursos naturais em função do maior aproveitamento da energia solar, da água e dos nutrientes (Moreno et al., 2007), permitindo uma redução significativa da necessidade de aplicação de fertilizantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Em SAF, o acúmulo de biomassa e de carbono orgânico no solo favorecem a atividade dos microrganismos responsáveis pela ciclagem de nutrientes, além de reduzir a emissão de gases promotores de efeito estufa para a atmosfera (Khanna, 1997; Hergoualc'h et al., 2012). Além disso, a qualidade da matéria orgânica é alterada uma

vez que formas lábeis são acumuladas ao passo que estruturas recalcitrantes de carbono são reduzidas em solos sob SAF (Marinho et al., 2014). A presença das árvores diminui a ocorrência de processos erosivos (Cannavo et al., 2011), aumentando a qualidade dos recursos hídricos. Economicamente, as árvores introduzidas também podem ser fonte de renda a partir da sua exploração sustentada, possibilitando a ampliação da renda do agricultor.

O passo inicial para a implantação de um SAF é a seleção das espécies a serem utilizadas. Essa seleção leva em consideração a experiência do produtor com as espécies, a capacidade de adaptação edafoclimática das plantas, a sua capacidade de sobrevivência e produção no sistema e o retorno econômico potencial. Para a região do Cerrado, especificamente, a espécie florestal *Callophyllum Brasilienses* Cambess, popularmente conhecida como guanandi (Lorenzi, 1998), vem ganhando destaque devido à possibilidade de retorno financeiro considerável, habilidade vigorosa de crescimento em áreas degradadas e potencial para introdução de animais e outras espécies vegetais numa mesma área. Essa espécie apresenta elevada capacidade de produção de biomassa e possui ocorrência nativa comprovada no Cerrado (Lorenzi, 1998), tendo como potencialidades o seu emprego como fonte de madeira para construção civil, naval e de móveis finos; uso comprovado em tratamentos fitoterápicos e aplicação como planta ornamental (Santa-Cecília et al., 2011; Breitbach et al., 2013).

Outro aspecto favorável à utilização do guanandi em SAF é o seu potencial de crescimento em áreas degradadas e sua contribuição para a melhoria do microclima (Embrapa, 2012). Embora seja uma espécie arbórea com boa adaptação ao Cerrado, demanda uma boa qualidade de mudas para a implementação dos SAF. O estado de sanidade das mudas é determinante para o seu desenvolvimento no campo, principalmente em condições adversas. Com o interesse em uma produção sustentável e

rentável, os bioestimulantes aparecem como uma importante possibilidade de obtenção de mudas saudáveis e mais adaptadas ao transplântio nas áreas definitivas, após a fase de viveiro.

Bioestimulantes são definidos como substâncias de origem natural ou sintética que podem ser utilizados no solo, nas sementes ou diretamente nas plantas, estimulando processos vitais e aumento da produtividade das plantas (Ávila et al., 2008). Dentro de uma abordagem de sustentabilidade agrícola, nas últimas décadas, há uma série de estudos envolvendo o papel das substâncias húmicas (SH) como bioestimulantes do crescimento vegetal (Zandonadi & Busato, 2012; Zandonadi et al., 2016). As SH são estruturas que constituem aproximadamente 60% do material orgânico presente nos solos e sedimentos, sendo consideradas elemento chave do ecossistema terrestre (Trevisan et al., 2010). De acordo com a sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS – *International Humic Substance Society*), essas substâncias são classificadas de acordo com a solubilidade em diferentes valores de pH: ácidos fúlvicos (AF), quando solúveis em meio alcalino e ácido; ácidos húmicos (AH), quando solúveis em solução alcalina e insolúveis em meio ácido e huminas (H), solúveis em qualquer valor de pH. O seu emprego como bioestimulante está relacionado à sua capacidade de estímulo ao crescimento de raízes laterais, principalmente, mesmo efeito hormonal produzido pela auxina (AIA), favorecendo a absorção de nutrientes e água pelos vegetais (Balmori et al., 2014; Zandonadi et al., 2016).

Vários trabalhos tem apontado o papel das SH sobre o estímulo da atividade da H^+ -ATPase e aumento na permeabilidade da membrana plasmática em plantas (Varanini et al., 1993; Nardi et al., 1996; Zandonadi et al., 2016). Conseqüentemente à extrusão de prótons acarretada pela H^+ -ATPase, ocorre um aumento da plasticidade da parede celular, que favorece o alongamento celular (Rayle et al., 1992; Zandonadi et al., 2013;

Zandonadi et al., 2016). Com base nisso, resultados tem demonstrado que a utilização de frações húmicas podem servir diretamente como bioestimulantes de plantas (Canellas et al., 2002; Nardi et al., 2009; Zandonadi et al., 2013; Zandonadi et al., 2016).

Atualmente, se torna cada vez mais constante o interesse pelo uso de produtos a base de SH em lavouras comerciais em função das respostas obtidas (Baldotto et al., 2009; Aguiar et al., 2016; Baldotto & Baldotto, 2016). Apesar de escassos, alguns trabalhos já publicados apontam que o uso de soluções contendo SH pode também favorecer o desenvolvimento de espécies florestais. Por exemplo, Pinheiro et al. (2010) relataram que a utilização de pequenas doses de AH aumentou a produção de matéria seca da raiz, caule e folhas em mudas de eucalipto. Entretanto, ainda são poucos estudos que abordam a utilização de SH e sua influencia sobre o crescimento inicial de mudas de espécies florestais de interesse para a implantação de SAF, principalmente para a região do Cerrado.

Além das SH extraídas de acordo o procedimento tradicional empregando-se soluções alcalinas, uma série de trabalhos tem demonstrado potencial de uso como estimulante também das substâncias extraídas de compostos orgânicos empregando-se água, denominado extrato húmico solúvel em água (EHSA) (Schmidt et al., 2011; Zandonadi et al., 2016). Schmidt et al. (2007) observaram que além de aumento considerável na absorção de nutrientes, devido ao incremento no comprimento e no número de pelos radiculares, a aplicação de EHSA promoveu alterações nos processos fisiológicos e metabólicos no crescimento de *Arabidopsis*. O uso de EHSA extraído da vermicompostagem torna uma alternativa altamente viável devido à sua forma de extração ser bastante prática, além de não gerar danos ao meio ambiente e ao produtor. A eficiência da aplicação destas substâncias são comprovadas por Brown et al. (2004) e Arancon et al. (2006) onde se justifica a interação existente no trato digestivo dos

anelídeos com microrganismos, contribuindo para uma produção significativa de SH e hormônios que auxiliam o crescimento vegetal e uma maior resistência à ação de bactérias e fungos fitopatógenos.

Hipótese

A hipótese presente neste trabalho é que a adição de soluções contendo AH ou ESHA altera o perfil de desenvolvimento inicial de mudas de guanandi, durante a fase de viveiro. Essa alteração é dependente da dose de cada bioestimulante aplicada.

Objetivo Geral

Determinar o potencial bioestimulante de AH e ESHA sobre o crescimento inicial de mudas de guanandi, apontando para a possibilidade de uso destes bioestimulantes durante a produção das mudas.

Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da aplicação de soluções contendo diferentes concentrações de AH e ESHA sobre o número de folhas (NF), número de raízes laterais (NRL), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz principal (DRP), diâmetro do caule (DC) e da raiz principal (DRP), índice de área foliar (IAF), massa fresca das partes aérea (MFA) e radicular (MFR), massa seca das partes aérea (MSA) e radicular (MSR) em mudas de guanandi.

- Avaliar o efeito da adição das diferentes doses de AH e ESHA sobre o teor de clorofila estimado pelo medidor SPAD em mudas de guanandi.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das sementes e quebra de dormência

As mudas de *Callophyllum Brasilienses* Cambess empregadas no experimento foram produzidas na estação biológica da Universidade de Brasília, entre os meses de junho e setembro de 2015. As sementes foram obtidas de um produtor comercial. Anteriormente ao crescimento das mudas, entretanto, visando maior rapidez, sincronização e uniformidade na germinação, realizou-se quebra da dormência das sementes por escarificação física, com a retirada do endocarpo e tegumento das sementes. As sementes foram então semeadas em dois canteiros preenchidos com areia, sob insolação direta. Aproximadamente 100 dias após, obtiveram-se plântulas com 2 pares de folhas definitivas, as quais foram transplantadas para vasos tipo “Leonard” (Figura 1). Os vasos foram construídos com garrafas PET cortadas à altura de 14 cm em relação à base da garrafa. A porção superior da garrafa foi acomodada em posição invertida dentro da base restante (Figura 1A). A parte superior, após acomodada à base, foi preenchida com vermiculita e areia lavada (1:1; v:v).



Figura 1 – Vaso de crescimento tipo Leonard (A) e plântulas transplantadas após germinação das sementes (B).

No local onde se encontrava a tampa da garrafa, foi empregado um tecido de algodão visando impedir a saída do substrato e permitir a ascensão da solução nutritiva por capilaridade. Em seguida os vasos foram cobertos lateralmente por um plástico de cor escura para efeito da luminosidade sobre a qualidade da solução a ser aplicada.

3.2. Vermicompostagem

Para obtenção dos potenciais bioestimulantes, foi realizado um processo de vermicompostagem de esterco bovino com resíduos orgânicos domésticos, como cascas de frutas e restos de hortaliças. Para acelerar e promover a maturação do composto, foram utilizadas minhocas vermelhas da Califórnia (*Eisenia foetida*). Todo o material foi colocado em um recipiente cerâmico com volume de 40 L. O material permaneceu todo o processo em um ambiente ao abrigo de luz direta, com umedecimento semanal. Toda a etapa de vermicompostagem durou cerca de 90 dias. Para manter boas condições de drenagem e proteger o material contra incidência direta da luz solar, o recipiente foi mantido sempre coberto com restos de palhada seca de capina.



Figura 2 – Aspecto do vermicomposto obtido após os 90 dias de atuação das minhocas vermelhas da Califórnia sobre substrato orgânico.

3.3. Obtenção dos ácidos húmicos

Para realizar o fracionamento da matéria orgânica e a extração de AH, levou-se em consideração o protocolo estabelecido pela (IHSS), de acordo com a solubilidade em meio ácido e alcalino. Para isto, 200 g de vermicomposto foram pesados em balança analítica (Scientech SA 210, CO, USA), adicionando-se 4 L de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (relação 1:20, m:v). O material permaneceu em uma mesa agitadora (Tecnal TE 140, SP, Brasil) por aproximadamente 8 horas, a 120 rpm. Devido ao alto volume da solução e para haver uma separação adequada da fração húmica, todo o material sobrenadante obtido foi filtrado com membranas de 0,2 µm. Após a coleta da solução filtrada, reduziu-se o pH até valor entre 1,5-2,0, empregando-se H₂SO₄ 18 mol L⁻¹. Após decantação da fração insolúvel em meio ácido (AH), o material sobrenadante (AF) foi aspirado por sifonamento e descartado. O material restante foi dividido em proporções iguais em tubos tipo Falcon e centrifugado a 5.000 g, por 20 min (Quimis Q222T, SP, Brasil), descartando-se novamente o sobrenadante. Os AH então obtidos foram lavados com água destilada e centrifugados, processo feito diversas vezes até que o sobrenadante estivesse completamente límpido. Os AH foram então congelados e posteriormente secos por liofilização (Liotop[®] L101, SP, Brasil).

3.4. Obtenção do extrato húmico solúvel em água (EHSA)

Para a obtenção do EHSA, utilizou-se uma adaptação do método proposto por Pinton et al. (1998). Para isto, pesou-se uma amostra de 200 g de vermicomposto em balança analítica (Scientech SA 210, CO, USA) acondicionando-a em becker de vidro, que recebeu 4 L de água destilada (relação de 1:20; m:v). Após, o material foi aquecido a 70 °C em um equipamento de banho-maria microprocessado (Quimis Q215M, SP, Brasil), sob constante agitação por um período de 4 horas. Em seguida, o material passou por um período de descanso para decantação da fração insolúvel. O material

sobrenadante foi então separado da fração insolúvel por sifonamento. A parte não solubilizada sofreu outro procedimento de extração, às mesmas condições, sendo o extrato solúvel obtido juntado ao material extraído primeiramente. Posteriormente, o conjunto total do extrato solúvel obtido foi filtrado empregando-se papel filtro com membrana de 0,2 µm, congelado e liofilizado (Liotop® L101, SP, Brasil).

3.5. Características dos AH e EHSA

A determinação quantitativa dos teores de carbono orgânico no EHSA e nos AH foi realizada empregando-se o método da dicromatometria (Walkley & Black, 1934) com modificações (Yeomans & Bremner, 1988). Para isto, utilizou-se solução de $K_2Cr_2O_7$ 0,166 mol L⁻¹ como agente oxidante, com posterior titulação do excesso de Cr^{6+} com $Fe(NH_4)_2SO_4$ aproximadamente 0,25 mol L⁻¹.

3.6. Testes com plantas

Para realizar a aplicação dos tratamentos nas mudas de guanandi, os materiais potencialmente bioestimulantes, após liofilização, foram pesados (0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg) e diluídos em um litro de solução nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). As soluções tiveram o pH ajustado para 6,5 empregando-se com KOH 0,01 mol L⁻¹. Cada vaso tipo Leonard recebeu 400 mL de solução. Semanalmente, as soluções de cada vaso foram substituídas por outras recém produzidas, até o período final de 60 dias de crescimento no viveiro. Após, as mudas foram coletadas e transportadas para laboratório para a determinação dos seguintes parâmetros: estimativa do teor de clorofila (SPAD), número de folhas (NF), número de raízes laterais (NRL), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz principal (CRP), diâmetro do caule (DC) e da raiz principal (DRP), índice de área foliar (IAF), massa fresca das

partes aérea (MFA) e radicular (MFR), massa seca das partes aérea (MSA) e radicular (MSR).

3.6.1. Estimativa do teor de clorofila (SPAD)

Para a estimativa dos teores de clorofila, utilizou-se o instrumento SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development; Minolta Camera Co, Japão), instrumento que permite estimar os teores de clorofila de acordo com a absorvância em diferentes comprimentos de ondas (SWIADER & MOREE, 2002).

3.6.2. Número de folhas e número de raízes laterais

O NF e NRL foram determinado por contagem manual.

3.6.3. Comprimento da parte aérea e da raiz principal

O CPA e CRP foram medidos com auxílio de régua graduada, tomando por base o colo da raiz como divisão entre a parte aérea e a raiz. A parte aérea levou em consideração o comprimento desde o colo da raiz até os primórdios foliares. Já para a medição da raiz, primeiramente houve a retirada do substrato aderido com água corrente e, em seguida, considerou-se a região da coifa como o final da raiz principal.

3.6.4. Diâmetro do caule e da raiz principal

Para haver uma medida precisa do DC e DRP, realizou-se a separação de ambas as partes e, utilizando-se paquímetro digital, obtiveram-se os respectivos diâmetros. O DC foi medido na região do primeiro entrenó, enquanto que para o DRP tomou-se como base a região abaixo do colo da raiz.

3.6.5. Índice de área foliar

Para determinação do IAF, foi realizado um registro das folhas através de fotografias (Figura 3). As fotografias foram obtidas utilizando-se tripé e uma máquina fotográfica modelo Canon EOS Rebel T5i. Posteriormente, as imagens foram trabalhadas empregando-se o programa de processamento e análise de imagens digitais ImageJ (Contributors worldwide, National Institutes of Health, USA). Para uma calibração adequada do programa e permitir a determinação da dimensão das folhas analisadas objetos, utilizou se uma escala afixada próximo às folhas, para referência.

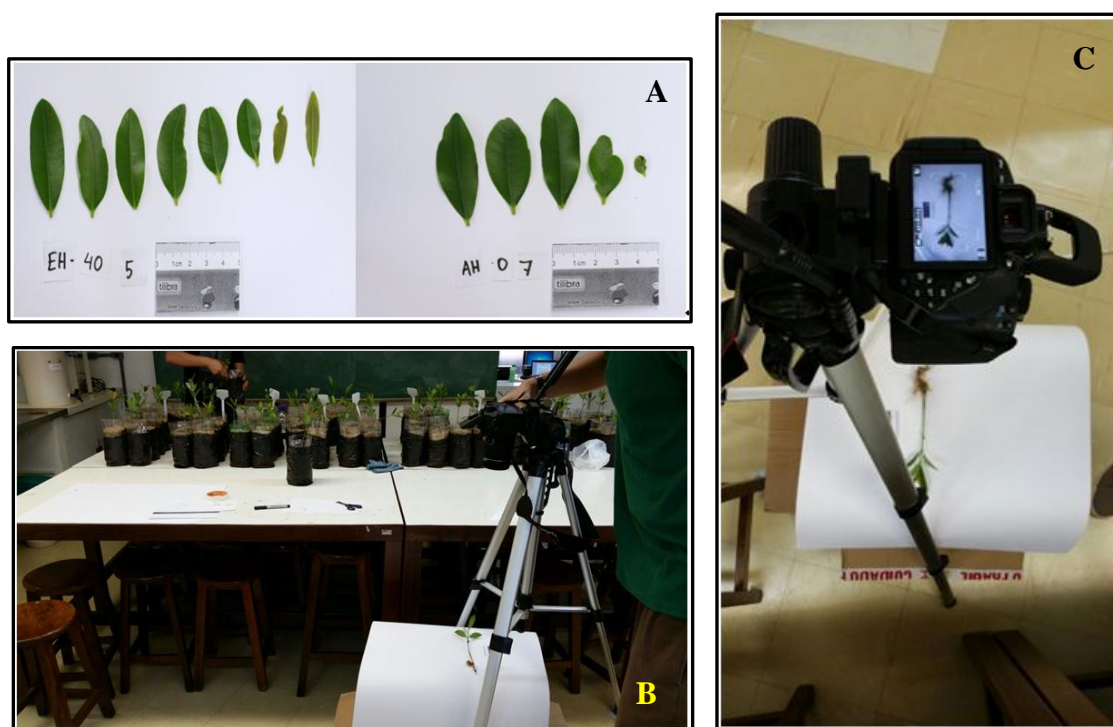


Figura 3 – Obtenção de imagens para determinação do índice de área foliar. A: detalhe da escala de 5 centímetros empregada como referência; B: Conjunto de plantas avaliadas; C: Detalhe da obtenção da imagem.

3.6.6. Massas frescas e secas das partes aérea e radicular

Partes aéreas e radiculares das mudas foram separadas com tesoura, determinando-se as respectivas massas frescas (MFA e MFR) em balança analítica (Scientech AS 210, PR, Brasil) imediatamente após o corte. Em seguida, os materiais separados foram acondicionados em sacos de papel e levados para secagem em estufa de circulação forçada de ar (Quimis 0317M, SP, Brasil), à temperatura de 60 °C. Após atingirem massa constante, o material foi pesado em balança analítica (Scientech AS 210, PR, Brasil) para determinação das MSA e MSR.

3.7. Análise estatística

Os bioestimulantes testados foram analisados separadamente, a partir da aplicação de seis doses (0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L⁻¹ de AH ou EHSA), com 8 repetições, em delineamento inteiramente casualizado. A análise dos dados foi realizada utilizando-se software estatístico R (versão 3.2.2.). Para as variáveis significativas observadas na análise de variância, empregou-se teste de Tukey ao nível de 5% ou 10% de significância de ($p < 0,05$ e $p < 0,10$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito da aplicação de AH sobre as variáveis NF, NRL, IAF, CPA, DC, SPAD, MFA, MFR, MSA e MSR (Anexo I). Já para as variáveis CRP e DRP, houve significância pelo teste de F a 10 e 5% de probabilidade, respectivamente. O fato de algumas variáveis não apresentarem significância pode ser justificado pela rusticidade apresentada por se tratar de uma espécie nativa, adaptada ao crescimento em solos empobrecidos (Artur et al., 2007), o que pode ter restringido as respostas à aplicação dos AH.

O maior valor absoluto para o CRP foi observado na aplicação da dose 40 mg L⁻¹ de AH (Figura 4), porém este valor foi estatisticamente semelhante ao controle (dose 0,0 mg L⁻¹) e às doses 2,5, 10,0 e 20 mg L⁻¹ de AH. A dose de 40 mg L⁻¹ resultou em incremento de 33% quando comparada com as dosagens de 5,0 mg L⁻¹ de AH. Segundo Gonçalves et al. (2000), o estímulo ao crescimento da raiz principal e no diâmetro da raiz são critérios importantes para avaliar a capacidade de sobrevivência da muda no campo, sendo extremamente úteis para a adaptação das mudas em condições adversas, principalmente no desempenho de fixação com menor susceptibilidade ao tombamento, na absorção e no desenvolvimento inicial após o transplântio para a área definitiva.

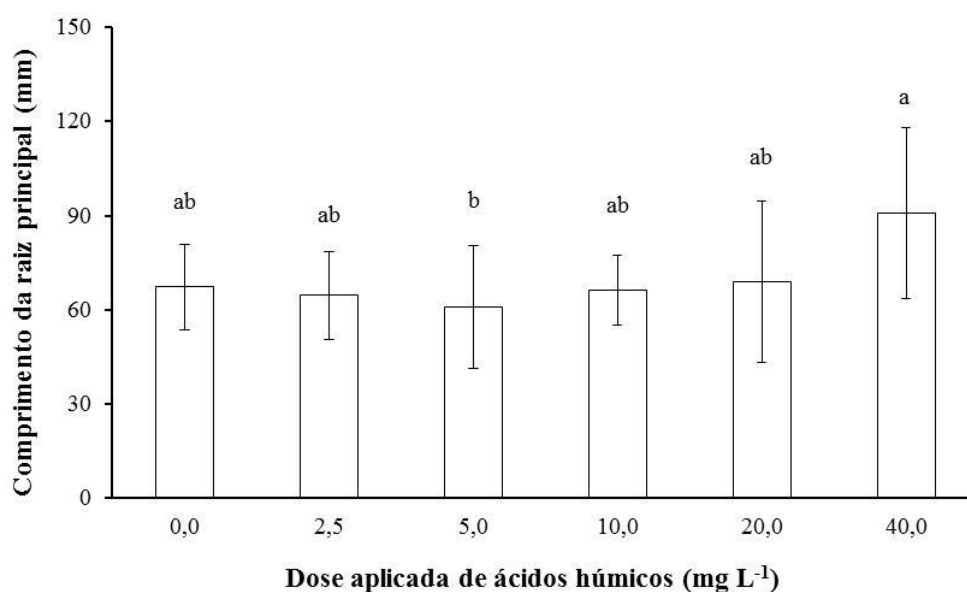


Figura 4 - Comprimento da raiz principal em mudas de *Calophyllum brasiliensis* Cambess submetidas à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos extraídos de vermicomposto de esterco bovino. Letras referem-se ao teste de médias (Tukey, $p < 0,10$). Barras representam o desvio padrão da média.

Nesse mesmo intuito de sobrevivência de mudas em condições não favoráveis, Rocha et al. (2003) divulgaram a relação entre as propriedades das SH e seus efeitos benéficos no solo, com destaque para o poder de retenção de água de até 20 vezes o valor da sua massa e sua capacidade de cimentação do solo, facilitando a formação de agregados e o crescimento radicular. Um aspecto vantajoso para os resultados é o fato de que quanto maior for o desenvolvimento radicular, mais intensa será a interação com o solo em seu entorno, visto que a exsudação de compostos orgânicos pela raiz é fundamental para um aumento da mobilidade de nutrientes, imobilização de íons tóxicos e seletividade de microrganismos (McCully, 1999).

O estímulo apresentado ao CRP aqui observado corrobora com os resultados obtidos por Façanha et al. (2002) e Canellas et al. (2002), quando observaram que plantas de milho tratadas com AH sofreram alterações significativas em sua arquitetura radicular, aumentando o número de sítios de mitose e de raízes emergidas.

A adição de soluções contendo 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 mg L⁻¹ de AH resultou em DRP maior que o tratamento controle (Figura 5). Para a dose 20,0 mg L⁻¹ de AH, o DRP foi 40% maior que o tratamento controle. Esse resultado pode ser resultante da ação dos AH na diferenciação celular das células epidérmicas da raiz e sobre a síntese proteica. Segundo Canellas et al. (2005), os AH são responsáveis por ativarem a fosforilação oxidativa, resultando em uma síntese de ATP e possibilitando a expansão do volume radicular. Sabe-se que tal efeito produzido nas mudas apresenta características que se justificam pela atividade hormonal que atua na superfície radicular, visto que a estrutura do IAA (ácido indolacético) está presente na composição molecular de SH com alto peso molecular (Schiavon et al., 2010). A presença de AIA, além de incentivar as etapas iniciais de formação do primórdio radicular, é imprescindível para ativar a divisão celular do periciclo (Casimiro et al., 2001).

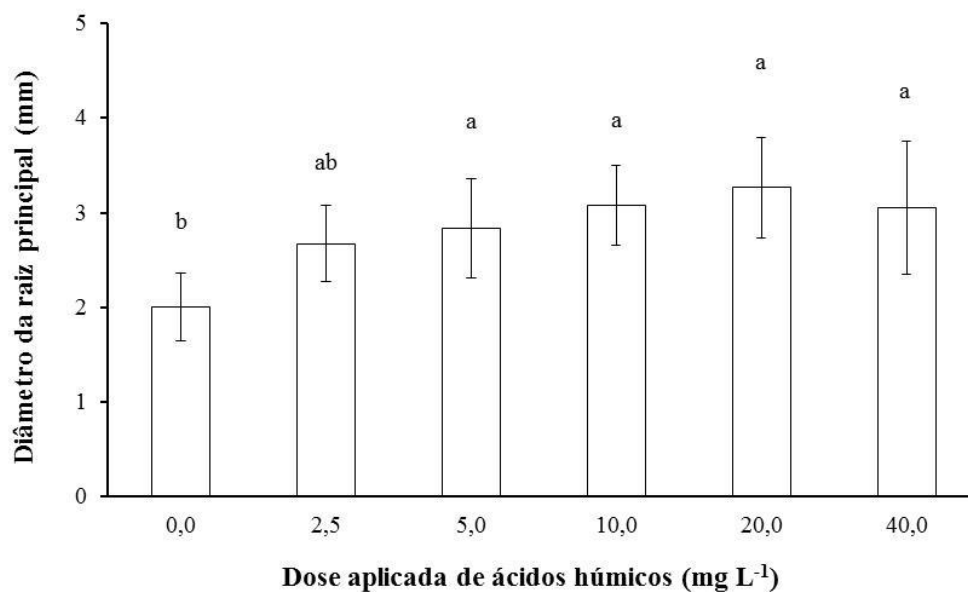


Figura 5 - Diâmetro da raiz principal em mudas de *Calophyllum brasiliensis* Cambess submetidas à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos extraídos de vermicomposto de esterco bovino. Letras referem-se ao teste de médias (Tukey, $p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média.

Ainda que o método utilizado para a medição destas variáveis seja de forma destrutiva, não permitindo futuras análises no campo, os resultados obtidos são relevantes, dado que quanto maior o DR e o CRP, maior será a área superficial para o crescimento de raízes laterais, aspecto positivo para uma absorção mais eficiente de nutrientes (Nikbakht et al., 2008). Há vários trabalhos em que a medição é realizada no mínimo 100 dias após o transplante (Steffen et al., 2011). Os dados coletados para o DRP não satisfazem as afirmações feitas por Gonçalves et al. (2000), em que o valor adequado para o diâmetro da raiz de mudas florestais varia entre 5 e 10 mm, porém estima-se que as mudas apresentariam resultados extremamente satisfatórios, uma vez que os dados foram coletados com apenas 60 dias após o transplante. Embora o material de origem e o estágio de maturação do vermicomposto possa influenciar na

bioatividade dos AH (Aguiar et al., 2012), o aumento significativo no DRP é coerente com outros estudos que concluíram que a utilização de produtos a base de SH é determinante para um incremento em parâmetros morfológicos em diversas culturas como abacaxi (Baldotto et al., 2009), eucalipto (Silva et al., 2014) e tomate (Zandonadi et al., 2016).

Nas plantas sob aplicação do EHSA, os resultados obtidos para NF, SPAD, CRP, DC, DRP, MFA, MFR, MSA e MSR não apresentaram significância quando submetidos ao teste F (Anexo I). Já as medidas para NRL, IAF e CPA foram significativas ao nível de 5% de probabilidade. As mudas tratadas com soluções contendo 40,0 mg L⁻¹ de EHSA apresentaram aumento de 52% no NRL quando comparadas ao controle, com número de raízes variando entre 31 e 67 (Figura 6). O acréscimo na emergência de pêlos radiculares pode estar relacionado com a atividade da bomba de prótons na membrana plasmática. Zandonadi et al. (2016), observaram que o uso de bioestimulantes aumentou em até 40% a extrusão de prótons em mudas de tomate. Segundo Canellas et al. (2006) esse mecanismo desencadeia a translocação de íons e outros metabólitos contra um gradiente de concentração da membrana plasmática, sendo fundamental para a expansão celular, mecanismo conhecido como teoria do crescimento ácido. Além desse mecanismo, as SH provocam a produção de raízes laterais e o acréscimo de pelos absorventes, aumentando ainda mais o potencial de absorção de nutrientes (Façanha et al., 2002; Zandonadi et al., 2013). As raízes laterais com menos de 0,8 mm de diâmetro são os principais pontos de absorção de água do sistema radicular (Canellas et al., 2005). Nas membranas celulares, encontram-se diferentes grupos de enzimas, desde as transportadoras até as receptoras de sinais. Nessa mesma perspectiva, vale ressaltar que o aumento no NRL é primordial para formação de receptores hormonais fundamentais para o influxo e efluxo de íons (Ramos et al., 2015).

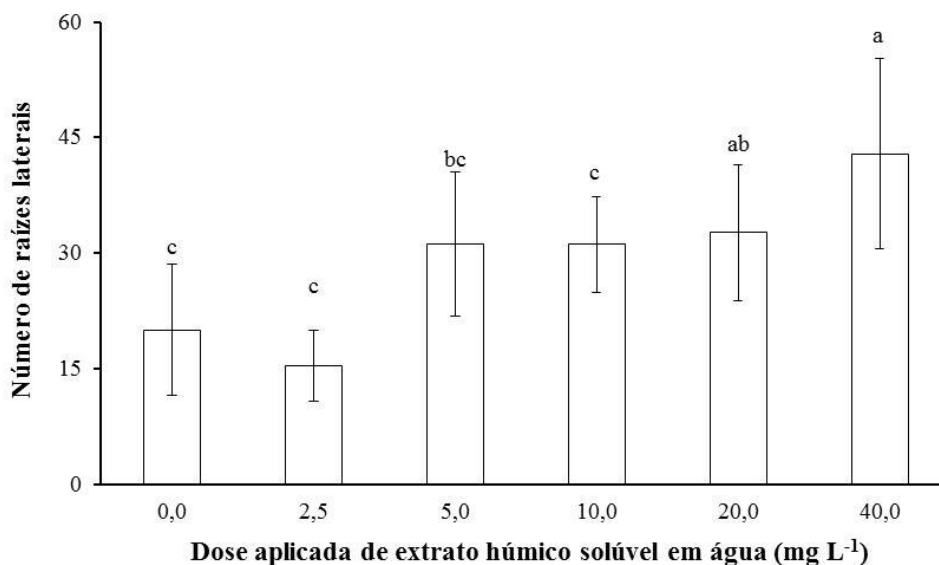


Figura 6 – Número de raízes laterais em mudas de *Calophyllum brasiliensis* Cambess submetidas à aplicação de diferentes doses de extrato húmico solúvel em água extraídos de vermicomposto de esterco bovino. Letras referem-se ao teste de médias (Tukey, $p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média.

Os dados coletados para NRL são relevantes quando se leva em consideração a demanda por nutrientes no estágio inicial de desenvolvimento de mudas e a sua adaptação em ambientes com baixo índice de pluviosidade. No Cerrado, em geral, os solos apresentam elevados teores de Al^{3+} , sendo que o excesso desse elemento é extremamente tóxico, limitando ainda mais o crescimento das raízes. Santos et al. (2007) observaram que as SH, além da sua função de agente tamponante no solo, possuem propriedades que realizam a complexação de íons tóxicos, em especial o Al^{3+} , ação favorável para o desenvolvimento da raiz. O poder das SH em atuar na complexação dos íons metálicos mostra boas perspectivas na adaptação de mudas em ambientes degradados, no desenvolvimento em sistemas biodiversos e na produção de mudas em viveiro.

Embora poucas variáveis tenham sido significativas, a adição de EHSA parece ser importante quando se considera a altura de mudas, a área foliar e a matéria seca da raiz como parâmetros empregados na avaliação da qualidade de mudas. O desenvolvimento de mudas no campo não depende somente das características do sistema radicular da planta. Nas análises feitas para o IAF, observou-se incremento de até 35% no valor médio em relação ao tratamento controle, quando as mudas foram tratadas com dosagens de 40 mg L⁻¹ de EHSA (Figura 7).

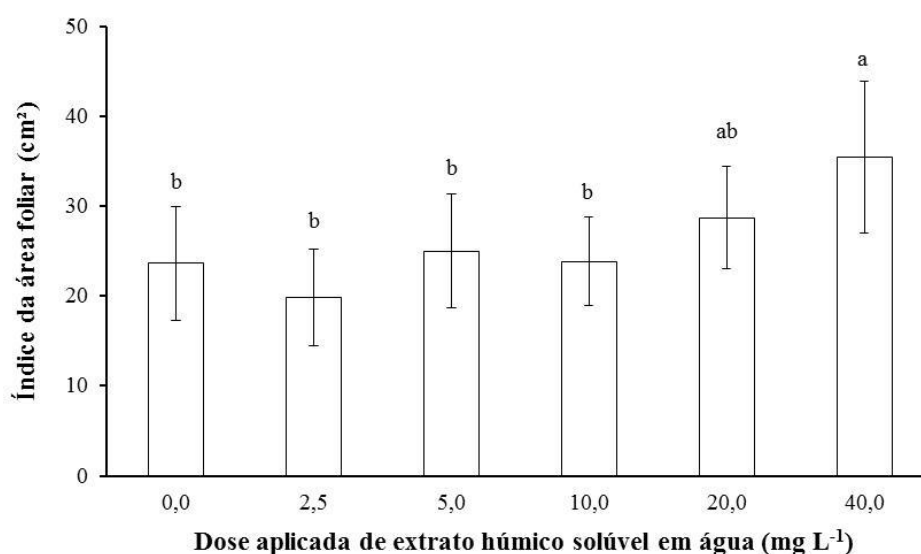


Figura 7 – Índice da área foliar em mudas de *Calophyllum brasiliensis* Cambess submetidas à aplicação de diferentes doses de extrato húmico solúvel em água extraídos de vermicomposto de esterco bovino. Letras referem-se ao teste de médias (Tukey, $p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média.

O fato de o tratamento com aplicação de 40 mg L⁻¹ de EHSA apresentar um IAF maior poderia demonstrar o potencial para maiores teores de clorofila nas folhas. Entretanto, esta inferência não foi comprovada uma vez que a estimativa SPAD não apresentou diferença entre os tratamentos.

O maior crescimento da parte aérea somado a maior área foliar encontrada nas mudas, reforçam os trabalhos realizados por Rocha & Rosa (2003). A presença do Fe^{2+} é essencial para a síntese de alguns complexos de proteína e clorofila nos cloroplastos. Os dados fornecidos no gráfico do IAF permite-nos interpretar e associar com os resultados publicado por Pinton et al. (1998), em que plantas de pepino com déficit de Fe^{2+} apresentaram clorose na folhas e redução da taxa fotossintética na área foliar quando submetidas a doses com ausência de EHSa.

Os resultados encontrados para o CPA apresentaram algumas variações, sendo um aumento de 36% no valor da média quando comparado ao controle e às dosagens de 2,5 e 10 mg L^{-1} . A aplicação de soluções contendo 2,5; 5,0 e 10 mg L^{-1} resultou em aumento da CPA em relação ao controle, porém apresentou valores inferiores em relação às respostas adquiridas nos tratamento com doses de 40 mg L^{-1} . Também é possível observar que as doses de 5,0 e 20 mg L^{-1} apresentaram resultados semelhantes. Com base nos resultados obtidos, a dose 40 mg L^{-1} apresentou maior eficiência no crescimento das mudas. Este fato pode estar relacionado com a maior disponibilidade de nitrogênio, provenientes da mineralização realizada por microrganismos presentes no vermicomposto.

O maior desenvolvimento da parte aérea das mudas é tecnicamente aceito como boa medida no seu desempenho, e pode estar relacionado com a eficiência na absorção do nitrogênio, uma vez que é um macronutriente essencial e requerido em maiores quantidades por mudas no estágio inicial de desenvolvimento (Marques et al., 2006). Também atua como constituinte de vários compostos de proteínas e aminoácidos, sendo assim, a deficiência deste nutriente inibe de forma imediata o crescimento das plantas (Corcioli et al., 2014). A forma como o nitrogênio está disponível no solo é determinante para a eficiência na sua absorção, podendo ser na forma de nitrato (NO_3^-)

ou de amônio (NH_4^+), sendo que a primeira forma é a mais encontrada (Sousa et al., 2004). Há estudos que abordam sobre a utilização de SH como facilitadores para a absorção do nitrato em plantas (Pinton et al., 1999; Cacco et al., 2000). Este mecanismo se justifica em função de um possível aumento na capacidade de absorção estabelecida pela maior atividade de proteínas de transporte na interface substrato-raiz. Seguindo nessa perspectiva, é possível interligar esse mecanismo com os resultados publicados por Nardi et al. (2002), que observaram que as SH atuam no mecanismo da membrana plasmática influenciando na atividade hormonal e absorção de alguns nutrientes, principalmente nitrogênio na forma nítrica.

Para suceder o crescimento de mudas, é necessária uma nutrição adequada para realizar a expansão celular. Os dados observados para o CPA reforçam a teoria que afirma a capacidade de oxi-redução da membrana plasmática de células vegetais, essa atividade está relacionada com a formação da parede celular e a lignificação (Berczi & Møller, 2000). Outro fator que está interligado com a absorção de nitrato e com o resultado relevante para o crescimento de mudas é ação enzimática presente nas frações de EHSA esclarecidos (Vaccaro et. al., 2009).

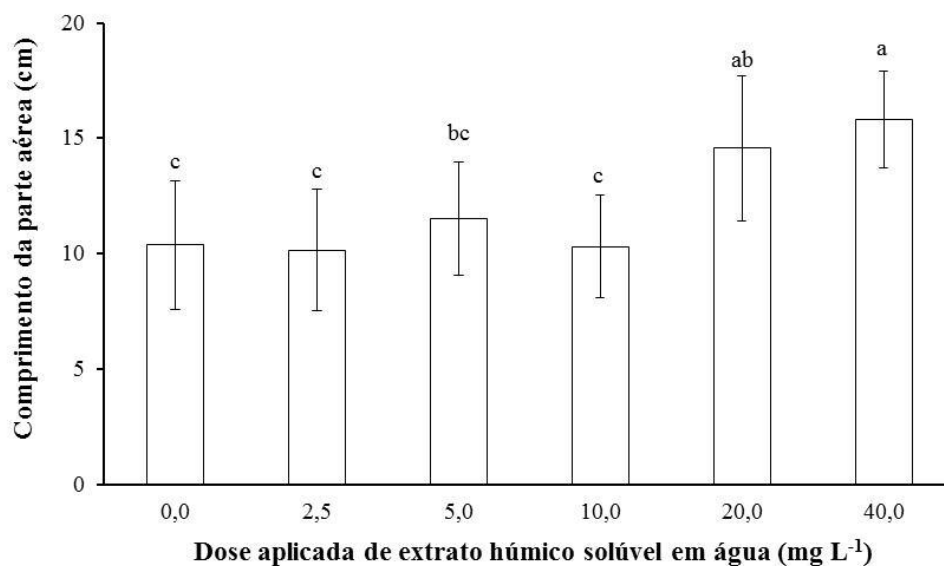


Figura 8 – Comprimento da parte aérea em mudas de *Calophyllum brasiliensis* Cambess submetidas à aplicação de diferentes doses de extrato húmico solúvel em água extraídos de vermicomposto de esterco bovino. Letras referem-se ao teste de médias (Tukey, $p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média.

5. CONCLUSÕES

- A aplicação de soluções contendo AH não alterou o NF, NRL, SPAD, CPA, DC, IAF, MFA, MFR, MSA e MSR das mudas de guanandi;
- A adição de doses contendo 40 mg L⁻¹ de AH aumentou em 33% o CRP;
- A adição de doses contendo 20 mg L⁻¹ de AH aumento em 40% o DRP;
- A aplicação EHSA não alterou o NF, SPAD, CRP, DC, DRP, MFA, MFR, MSA e MSR das mudas de guanandi;
- A adição de doses com 40 mg L⁻¹ aumentou em 52% o NRL, 35% o IAF, e 36% o CPA.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, N.O.; OLIVARES, F.L.; NOVOTNY, E.H.; DOBBSS, L.B.; BALMORI, D.M.; JUNIOR, L.G.S.; CHAGAS, J.G.; FAÇANHA, A.R.; CANELLAS, L.P. **Bioactivity of humic acids isolated from vermicompost at different maturation stages.** *Plant soil*, v. 362, p.161-174, 2012.
- AGUIAR, N.O.; MEDICI, L.O.; OLIVARES, F.L.; DOBBSS, L.B.; TORRES-NETTO, A.; SILVA, S.F.; NOVOTNY, E.H.; CANELLAS, L.P. **Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria.** *Annals of Applied Biology*, v. 168, p.203-213, 2016.
- ARANCON, N.Q.; EDWARDS, C.A.; LEE, S.; BYRNE, R. **Effects humic acids from vermicompost on plant growth.** *European Journal of Soil Biology*. Braunschweig, v.42, p. 65-69, 2006.
- ARTUR, A.G.; CRUZ, M.C. P. da; FERREIRA, M.E.; BARRETO, V.C.M.; YAGI, R. **Esterco bovino e calagem para formação de mudas de guanandi.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.843-850, 2007.
- ÁVILA, M. R. ; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ALBRECHT, L. P.; TONIN, T. A.; STÜLP, M. **Bioregulator application, agronomic efficiency, and quality of soybean seeds.** *Scientia Agricola*, v. 65, p. 604-612, 2008.

- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. **Desempenho do abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 33, p. 979-990, 2009.
- BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. **Initial performance of corn in response to treatment of seeds with humic acids isolated from bokashi.** Revista Ceres, v. 63, p. 62-67, 2016.
- BALMORI, D. M.; SPACCINI, R.; AGUIAR, N. O. A.; NOVOTNY, E. H.; OLIVARES, F.L.; CANELLAS, L. P. **Molecular Characteristics of Humic Acids Isolated from Vermicomposts and Their Relationship to Bioactivity.** Journal Agricultural Food Chemistry, v.62, p.11412–11419, 2014.
- BÉRCZI, A., MØLLER, I.M. **Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles.** Plant Cell and Environment, p.1287–1302, 2000.
- BERTOL, I.; ALBUQUERQUE, J.A.; LEITE, D.; AMARAL, A.J.; JUNIOR, W.A. **Manejo e conservação do solo e da água.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.28, p.155- 163, 2004.
- BREITCHBACH, U.B.; NIEHUES, M.; LOPES, N.P.; FARIA, J.E.Q.; **Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century.** Journal of Ethnopharmacology, p.180–189, 2013.
- BROWN, G.G.; EDWARDS, C.A.; BRUSSAARD, L. **How earthworms affect plant growth: Burrowing into the mechanisms.** Earthworm Ecology, p. 13-49, 2004.

- CACCO, G.; ATTINA, E.; GELSOMINO, A.; SIDARI, M. **Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings.** Journal of Plant Nutrition and Soil Science, v.163, p.313–320, 2000.
- CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D.B.; MEDICI, L.O.; PEREZ, L.E.P.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.R. **Bioatividade de substâncias húmicas – ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas.** In: CANELLAS, L.P.; SANTOS, G.A. Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campo dos Goytacazes. p.329, 2005.
- CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, O.A.L.; FAÇANHA, A. R. **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, p.1951-1957, 2002.
- CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D. B.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. R.. **Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às H⁺-ATPases.** In: FERNANDES, M.S.(org.). Nutrição mineral de plantas. Viçosa: SBCS, Cap.7, p.175-200, 2006.
- CANNAVO P.; SANSOULET J.; HARMAND J.M.; SILES P.; DREYER E.; VAAST P. **Agroforestry associating coffee and Inga densiflora results in complementarity for water uptake and decreases deep drainage in Costa Rica.** Agriculture Ecosystems and Environment, v.140, p.1-13, 2011.

CARNEIRO, M. A. C.; SOUZA, E. D.; REIS, E. F.; PEREIRA, H. S.; AZEVEDO W.

R. Atributos físicos, químicos e biológicos de solo de Cerrado sob diferentes sistemas de uso e manejo. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.33, p.147-157, 2009.

CASIMIRO, I.; MARCHANT, A.; BHALERAO, R.P.; BEECKMAN, T.; DHOOGHE,

S.; SWARUP, R.; GRAHAM, N.; INZE, D.; SANDBERG, G.; CASERO, P.J.; BENNETT, M. **Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation.** Plant Cell, v.13 p. 843-852, 2001.

CORCIOLI, G.; BORGES, J.D.; JESUS, R.P. **Sintomas de deficiência nutricional de**

macronutrientes em mudas de Khaya ivorensis cultivadas em solução nutritiva. Pesquisa Florestal Brasileira, v.34, p.159-164, 2014.

SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E. **Cerrado: Correção do solo e adubação.** In: SOUSA,

D.M.G.; LOBATO, E. Embrapa, 2ª.Ed. p.129, Brasília, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Seleção de guanandi**

em plantios comerciais. EMPRAPA, Colombo, PR, Brasil, 2012.

FAÇANHA, A.R.; FAÇANHA, A.L.O.; OLIVARES, F.L.; GURIDI, F.; SANTOS, G.A.; VELLOSO, A.C.X.; RUMJANEK, V.M.; BRASIL F.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M.A.; CANELLAS, L.P. **Bioatividade de ácidos húmicos: efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática.** Pesquisa Agropecuária Brasileira., v.37, p.1301-1310, 2002.

GONÇALVES, J.L.M.; SANTARELLI, E.G.; MORAES NETO, S.P.; MANARA, M.P. **Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização.** In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. (Ed.). Nutrição e fertilização florestal, p.309-350, Ipef, 2000.

HERGOUALC'H K.; BLANCHART E.; SKIBA U.; HÉNAULTF C.; HARMAND J.M. **Changes in carbon stock and greenhouse gas balance in a coffee (Coffeearabica) monoculture versus an agroforestry system with Inga densiflora, in Costa Rica.** Agriculture Ecosystems and Environment, v.148, p. 102–110, 2012.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil.** California's Agricultural Experiment Station, p.347, 1950.

KHANNA P. **Nutrient cycling under mixed-species trees in Southeast Asia.** Agroforestry systems, v.38, p. 99–120, 1997.

LEAL, V. N. **Coronelismo, enxada e voto (O município e o regime representativo no Brasil).** 3ª Ed Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2.ed ,1998.

MARINHO, E.B.; OLIVEIRA, A.L.; ZANDONADI, D.B.; BENEDITO, L.E.C.; SOUZA, R.B.; FIGUEIREDO, C.C.; BUSATO, J.G. **Organic matter pools and nutrient cycling in different coffee production systems in the Brazilian Cerrado**. *Agroforestry Systems* v.88, p.767–778, 2014.

MARQUES, V. B.; PAIVA, H. N.; GOMES, J. M.; NEVES, J. C. L. **Efeitos de fontes e doses de nitrogênio no crescimento de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth)**. *Scientia Forestalis*, p.77-85, 2006.

McCULLY, M. E.; **Roots in soil: unearthing the complexities of roots and their rhizospheres**. *Plant Physiology. Mol. Biol.*, v.50, p. 695-718, 1999.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Disponível em <www.mma.gov.br/biomacerrado>. Acesso em: 17 mar. 2016.

MORENO G.; OBRADOR J.J. **Effects of trees and understorey management of soil fertility and nutritional status of holm oaks in Spanish deheases**. *Nutrient Cycling in Agroecosistemas*, v.78, p.253-264, 2007.

MORENO, G.; OBRADOR, J.J. **Effects of trees and understorey management of soil fertility and nutritional status of holm oaks in Spanish deheases**. *Nutrient Cycling in Agroecosistemas* v.78, p.253-264, 2007.

NARDI S.; CARLETTI P.; PIZZEGHELLO D.; MUSCOLO. A **Biological Activities of humic substances**. In: SENESI N, XING B, HUANG PM (eds.) Biophysico-chemical process involving natural nonliving organic matter in environmental systems. Wiley, New Jersey, p. 305–340, 2009.

NARDI, S.; CONCHERI, G.; DELL'AGNOLA, G. **Biological activity of humus**. In PICCOLO, A. Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Ed. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, p.361–40, 1996.

NETO, M. S.; PICCOLO, M. C.; JUNIOR C. C.; CERRI, C. C.; BERNOUX, M. **Emissão de gases do efeito estufa em diferentes usos da terra no bioma Cerrado**. Revista brasileira de ciência do solo, v.35 p.63-76, 2011.

NIKBAKHT, A.; KAFI, M.; BABALAR, M.; XIA, Y.P.; LUO, A.; ETEMADI, N. **Effect of humic acid on plant growth, nutrient uptake, and postharvest life of gerbera**. Journal of Plant Nutrition.,v. 31, p.2155-2167, 2008.

PICCOLO, G. A.; ANDRIULO, A. E.; MARY, B. **Changes in soil organic matter under different land management in misiones province (Argentina)**. Science Agriculture. (Piracicaba, Braz.), v.65, n.3, p.290-297, 2008.

PINHEIRO, L.G.; SILVA, C.A.; NETO, E.F. **Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em resposta à aplicação de concentrações de C-ácido húmico**. Revista Brasileira de Ciências do Solo, v. 34, p.1217-1229, 2010.

PINTON, R.; CESCO, S.; DE NOBILI, M.; SANTI, S.; VARANINI, Z. **Water- and pyrophosphate-extractable humic substances fractions as source of iron for Fe-deficient cucumber plants.** *Biology Fertility Soils*, v. 26, p.23–27, 1998.

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

RAMOS, A.C.; DOBBSS, L.B.; SANTOS, L.A.; FERNANDES, M.F.; OLIVARES, F.L.; AGUIAR, N.O.; CANELLAS, L.P. **Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling dependent on Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development.** *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 2, p.1-12, 2015.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. **The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well.** *Plant Physiology*, Rockville, v. 99, p. 1271-1274, 1992.

ROCHA, J.C.; ROSA, A.H. **Substâncias húmicas aquáticas: interação com espécies metálicas.** São Paulo, Editora Unesp, 120 p. 2003.

SANCHEZ, P.A. **Science in agroforestry.** *Agroforestry Systems*, v.30, p.5-55, 1995.

- SANTA-CECÍLIA, F.V., VILELA, F.C., ROCHA, C.Q., DIASA, D.F., CAVALCANTE, G.P., FREITAS, L.A.S., SANTOS, M.H., GIUSTI-PAIVA, G. **Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v.133, p. 467–473, 2011.
- SANTOS, A.; BOTERO, W. G.; BELLIM, I.C.; OLIVEIRA, L.C.; ROCHA, J. C.; MENDONÇA, A. G. R.; GODINHO, A.F. **Interaction between Humic Substances and Metallic Ions: a Selectivity Study of Humic Substances and their Possible Therapeutic Application.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.18, n.4, p.824-830, 2007.
- SCHIAVON M.; PIZZEGHELLO D.; MUSCOLO A.; VACCARO S.; FRANCIOSO O.; NARDI S. **High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.).** *Journal of Chemical Ecology*, v.36, p.662-669, 2010.
- SCHMIDT M.W.; TORN M.S.; ABIVEN S.; DITTMAR T.; GUGGENBERGER G.; JANSSENS I.A.; KLEBER M.; KOGELKNABNER, I.; LEHMANN J.; MANNING D.A.C.; NANNIPIERI P.; RASSE D.P.; WEINER S.; TRUMBORE S.E. **Persistence of soil organic matter as an ecosystem property.** *Nature*, v. 478, p.49-56, 2011.
- SCHMIDT, W., SANTI, S., PINTON, R., VARANINI, Z. **Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in *Arabidopsis*.** *Plant and Soil*, v. 300, p.259-267, 2007.

SILVA, RJ; SANTOS, ACM; FERREIRA JÚNIOR, JM; SILVA, FA; TAVARES, RC;

SILVA, RR. Efeito da aplicação de substâncias húmicas nas características morfológicas de mudas de *Eucalyptus urograndis*. Amazon Soil – I Encontro de Ciência do Solo da Amazônia Oriental, p. 102-109. 2014.

STEFFEN, G.P.K.; ANTONIOLLI, Z.I.; STEFFEN, G.P.K.; SCHIEDECK, G.

Utilização de vermicomposto como substrato na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Corymbia citriodora*. Pesquisa Florestal. Brasileira, Colombo, v. 31, p. 75-82, abr./jun. 2011.

SWIADER, J.M.; MOORE, A. SPAD. **Chlorophyll response to nitrogen fertilization**

and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins. Journal of Plant Nutrition, v. 25, p.1089- 1100, 2002.

TREVISAN S.; PIZZEGHELLO D.; RUPERTI B.; FRANCIOSO O.; SASSI A.;

PALME K.; QUAGGIOTTI S.; NARDI S. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. Plant Biology, v.12, p.604-614, 2010.

VACCARO S.; MUSCOLO A.; PIZZEGHELLO D.; SPACCINI R.; PICCOLO A.;

NARDI S. Effect of a compost and its water-soluble fractions on key enzymes of nitrogen metabolism in maize seedlings. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, p.11267-11276, 2009.

VARANINI, Z.; PINTON, R.; DE BIASE, M.G.; ASTOLFI, S.; MAGGIONI, A.

Low molecular weight humic substances stimulate H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant Soil*, v.153 p. 61–69, 1993.

XU, Z.H.; CHEN, C.R.; HE, J.Z.; LIU, J.X. **Trends and challenges in soil research**

2009: linking global climate change to local long-term forest productivity. *Journal of Soils and Sediments*, v. 9,p. 83-88, 2009.

YOEMANS, J.C.; BREMNER, J.M. **A rapid and precise method for routine**

determination of organic carbon in soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal*, v.19, p. 1467-1476, 1988.

ZANDONADI, D.B.; SANTOS, M.P.; CAIXETA, L.S.; MARINHO, E.B.; PERES,

L.E. Pereira.; FAÇANHA, A.R. **Plant proton pumps as markers of biostimulant action.** *Scientia Agricola*, v. 73, p. 24-28, 2016.

ZANDONADI D.B; SANTOS M.P.; BUSATO J.; PERES L.; FAÇANHA A.R. **Plant**

physiology as affected by humified organic matter. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v. 25, p.12-25, 2013.

ZANDONADI, D.B.; BUSATO, J.G. **Vermicompost humic substances: technology**

for converting pollution into plant growth regulators. *IJESER*, v.3, n.2, p 73-84, 2012.

Anexo I

Quadro 1 - Análise de variância para o número de folhas em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	9,187	1,8375	1,2943	0,28461
Resíduos	42	59,625	1,4196	-	-
Total	47	68,812	-	-	-

Quadro 2 - Análise de variância para a estimativa do teor de clorofila em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	78,38	15,676	0,34551	0,88223
Resíduos	42	1905,52	45,370	-	-
Total	47	1983,90	-	-	-

Quadro 3 - Análise de variância para o comprimento da parte aérea em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	39,16	7,8316	1,0009	0,42906
Resíduos	42	328,63	7,8245	-	-
Total	47	367,79	-	-	-

Quadro 4 - Análise de variância para o número de raízes laterais em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	1.454,2	290,83	0,97435	0,44456
Resíduos	42	12.536,5	298,48	-	-
Total	47	13.990,7	-	-	-

Quadro 5 - Análise de variância para o comprimento da raiz principal em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	4.549,3	909,85	2,3719	0,055363
Resíduos	42	16.111,1	383,60	-	-
Total	47	20.660,4	-	-	-

Quadro 6 - Teste de Tukey para as médias do comprimento da raiz principal em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

Grupos	Tratamentos	Médias
a	AH 40	90,84
ab	AH 20	68,84
ab	AH 0	67,24
ab	AH 10	66,26
ab	AH 2,5	64,67
b	AH 5	60,88

(Letras iguais significam que as médias dos tratamentos não diferem estatisticamente ao nível de 10% de probabilidade estatística)

Quadro 7 - Análise de variância para o diâmetro do caule em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	0,001971	0,00039424	0,39749	0,84776
Resíduos	42	0,041657	0,00099182		
Total	47	0,043628			

Quadro 8 - Análise de variância para o diâmetro da raiz principal em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	8,0674	1,61349	6,3715	0,00017371
Resíduos	42	10,6358	0,25323		
Total	47	18,7033			

Quadro 9 - Teste de Tukey para as médias do diâmetro da raiz principal em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

Grupos	Tratamentos	Médias
a	AH 20	3,27
a	AH 10	3,08
a	AH 40	3,01
a	AH 5	2,84
ab	AH 2,5	2,67
b	AH 0	2,00

(Letras iguais significam que as médias dos tratamentos não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade estatística)

Quadro 10 - Análise de Variância para o índice de área foliar em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	604,5	120,905	1,3237	0,27277
Resíduos	42	3.836,3	91,342		
Total	47	4.440,9			

Quadro 11 - Análise de variância para a massa fresca da parte aérea em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	2,6607	0,53214	1,2958	0,28401
Resíduos	42	17,2478	0,41066		
Total	47	19,9084			

Quadro 12 - Análise de variância para a massa fresca de raiz MFR em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	8,039	1,60780	1,7466	0,14508
Resíduos	42	38,662	0,92053		
Total	47	46,701			

Quadro 13 - Análise de variância para a massa seca da parte aérea em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	0,21004	0,042008	1,7176	0,15162
Resíduos	42	1,02721	0,024457		
Total	47	1,23725			

Quadro 14 - Análise de Variância para a massa seca de raiz MSR em função da aplicação de soluções contendo ácidos húmicos.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	0,40098	0,080196	1,3536	0,26114
Resíduos	42	2,48841	0,059248		
Total	47	2,88939			

Quadro 15 - Análise de variância para o número de folhas em função da aplicação de soluções contendo extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	5,188	1,0375	0,6	0,70011
Resíduos	42	72,625	1,7292		
Total	47	77,812			

Quadro 16 - Análise de variância para a estimativa do teor de clorofila em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	150,87	30,174	0,69912	0,62714
Resíduos	42	1.812,69	43,159		
Total	47	1.963,55			

Quadro 17 - Análise de variância para o comprimento da parte aérea em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	241,64	48,329	7,2213	0,000058939
Resíduos	42	281,09	6,693		
Total	47	522,73			

Quadro 18 - Teste de Tukey para as médias do comprimento da parte aérea em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

Grupos	Tratamentos	Médias
a	AH 40	90,84
ab	AH 20	68,84
ab	AH 0	67,24
ab	AH 10	66,26
ab	AH 2,5	64,67
b	AH 5	60,88

(Letras iguais significam que as médias dos tratamentos não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade estatística).

Quadro 19 - Análise de variância para o número de raízes laterais em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	3.849,6	769,92	10,264	0,0000017796
Resíduos	42	3.150,4	75,01		
Total	47	7.000,0			

Quadro 20 - Teste de Tukey para as médias do número de raízes laterais em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

Grupos	Tratamentos	Médias
a	AH 40	42,88
ab	AH 20	32,63
ab	AH 10	31,13
ab	AH 5	31,13
bc	AH 0	20,00
c	AH 2,5	15,38

(Letras iguais significam que as médias dos tratamentos não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade estatística).

Quadro 21 - Análise de variância para o comprimento da raiz principal em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	1.678,9	335,79	0,54846	0,73853
Resíduos	42	25.714,2	612,24		
Total	47	27.393,1			

Quadro 22 - Análise de variância para o diâmetro do caule DC em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	0,001568	0,00031365	0,25225	0,93633
Resíduos	42	0,052223	0,00124340		
Total	47	0,053791			

Quadro 24 - Análise de variância do diâmetro da raiz principal DRP em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	4,4055	0,88109	2,0429	0,09209
Resíduos	42	18,1144	0,43129		
Total	47	22,5198			

Quadro 25 - Análise de variância para o índice de área foliar IAF em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	1.165,5	233,102	5,9455	0,00030439
Resíduos	42	1.646,7	39,207		
Total	47	2.812,2			

Quadro 26 - Teste de Tukey para as médias do índice de área foliar IAF em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

Grupos	Tratamentos	Médias
a	EASH 40	35.43
ab	EASH 20	28.693
b	EASH 5	24.99
b	EASH 10	23.84
b	EASH 0	23.64
b	EASH 2,5	19.81

(Letras iguais significam que as médias dos tratamentos não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade estatística).

Quadro 27 - Análise de variância para a massa fresca IAF em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	1,2894	0,25789	0,67622	0,6438
Resíduos	42	16,0175	0,38137		
Total	47	17.3070			

Quadro 28 - Análise de variância para a massa fresca de raiz MFR em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	4,809	0,96181	1,6929	0,15741
Resíduos	42	23,862	0,56815		
Total	47	28,671			

Quadro 29 - Análise de variância para a massa seca da parte aérea MSA em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	0,08748	0,017496	0,7614	0,58274
Resíduos	42	0,96512	0,022979		
Total	47	1,05260			

Quadro 30 - Análise de variância para a massa seca da raiz MSR em função da aplicação de soluções extrato húmico solúvel em água.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	5	0,5150	0,102999	2,7633	0,150226
Resíduos	42	1,5655	0,037274		
Total	47	2,0805			

