



ALTINO JÚNIOR MENDES OLIVEIRA

**GROWTH OF STRAWBERRY AND SWEET POTATOES
UNDER BIOESTIMULANTS APPLICATION**

**LAVRAS - MG
2020**

ALTINO JÚNIOR MENDES OLIVEIRA

**GROWTH OF STRAWBERRY AND SWEET POTATOES UNDER
BIOESTIMULANTS APPLICATION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

Profa. Dra. Joyce Dória Rodrigues
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Altino Júnior Mendes.

Growth of strawberry and sweet potatoes under bioestimulants
application / Altino Júnior Mendes Oliveira. - 2020.

120 p.

Orientador(a): Moacir Pasqual.

Coorientador(a): Joyce Dória Rodrigues.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Fragaria x ananassa Duch. 2. Ipomoea batatas (L). 3.
Inoculação. I. Pasqual, Moacir. II. Rodrigues, Joyce Dória. III.
Título.

ALTINO JÚNIOR MENDES OLIVEIRA

**GROWTH OF STRAWBERRY AND SWEET POTATOES UNDER
BIOESTIMULANTS APPLICATION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 13 de março de 2020.

Dr. Cleiton Lourenço de Oliveira UFLA

Dra. Angélica Cristina de Souza UFLA

Dr. Paulo Márcio Norberto EPAMIG

Dra. Joyce Dória Rodrigues UFLA

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

Profa. Dra. Joyce Dória Rodrigues
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

*A Deus, pelo dom da vida.
À minha família, que apoia e torce pela minha vitória.
Aos meus amigos, pela força.
Dedico e ofereço.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora, por estarem sempre comigo e se mostrarem presentes em todas as horas.

Aos meus pais, Altino Ferreira e Maria do Carmo, que me confortaram, me apoiaram, acreditaram em mim, por todas suas orações, por todo amor incondicional e por todo cuidado comigo.

Ao meu irmão Dalton e a minha irmã Aline, pela grande amizade, prestatividade em todos os momentos, mesmo a distância.

À minha noiva Meiriele, por ter me ajudado a superar os momentos difíceis, por acreditar em mim, pela confiança, pela paciência, pelo amor e compreensão.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Agricultura (DAG) e, em especial, ao Laboratório de Anatomia e Fisiologia do Cafeeiro e ao setor de Olericultura, por meio de seus professores e funcionários, oportunidade e condições oferecidas durante o curso.

Ao Prof. Moacir Pasqual, pela orientação, pelo exemplo, confiança, apoio, oportunidade de desenvolvimento desse trabalho e por toda contribuição ao meu conhecimento.

À Prof^a. Joyce Dória, pela coorientação, confiança, todo conhecimento, paciência e sábias palavras durante esse período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, ao Vantuil e Clarete, pelos ensinamentos, dedicação e prestatividade.

Agradeço, imensamente, a todos os meus colegas e amigos (estagiários, mestrandos e doutorandos) do laboratório de cultura de tecido vegetais que sempre se dispuseram a ajudar, independente da atividade. De forma especial, à Vytória e ao Ivan.

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos ao Adalvan e Filipe (batata), por seus exemplos de humildade, dedicação, inteligência e garra. Essas pessoas me ajudaram sempre e me ensinaram muito. Obrigado, pelas inúmeras correções de trabalhos, pela ajuda no desenvolvimento dos projetos, pelo tempo que gastaram em função das minhas dúvidas. Serei sempre grato.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado com sucesso. **MUITO OBRIGADO!**

RESUMO

Na agricultura, a demanda por alternativas para aumentar a produção agrícola, de forma sustentável, tornou-se de grande interesse, pelo fato da dependência de fertilizantes químicos usados na produção de alimentos. Para isso, outros métodos como os bioestimulantes que são substâncias ou microrganismos aplicados às plantas apresentam a capacidade de afetar, positivamente, os processos vitais, aumentando a eficiência nutricional, melhorando as características de qualidade da cultura, independentemente do seu teor de nutrientes como o morangueiro e a batata-doce. Os bioestimulantes são uma alternativa promissora com potencial de aplicação na produção agrícola, em especial as bactérias promotoras de crescimento, o ácido húmico e a terra diatomácea, por apresentarem capacidade de estimular o crescimento das plantas. Dessa forma, objetivou-se avaliar o potencial de bioestimulantes no crescimento de morangueiro e de batata-doce como promotor de crescimento. Com essa finalidade, foram realizados ensaios *in vitro* e em casa de vegetação nas culturas de morangueiro e batata-doce. Os bioestimulantes (bactérias promotoras de crescimento como *Azospirillum brasilense*, *Pantoea ananatis* e *Paenibacillus favisporus* e ácido húmico) foram avaliados quanto a sua capacidade de promoção de crescimento vegetal em morangueiro. Dados fitotécnicos, nutricionais, fisiológicos (IRGA / infrared gas analyser) e de mudanças anatômicas nas plantas foram coletados. No segundo ensaio, a frequência de aplicação de *Azospirillum brasilense* no morangueiro quanto ao efeito da capacidade de crescimento das plantas foi avaliada. No terceiro e quarto ensaios foram avaliados o efeito da terra diatomácea no cultivo *in vitro* e na aclimatização de batata-doce sobre o crescimento, a fisiologia e a anatomia de plantas. Os bioestimulantes foram capazes de estimular maiores efeitos sobre o crescimento, acúmulo de nutrientes, anatomia, fisiologia, mostrando que é possível combinar os inoculantes bacterianos com ácido húmico, obtendo melhores respostas que a aplicação isolada de ambas. Conclui-se que os bioestimulantes avaliados apresentam potencial para a aplicação como promotores de crescimento nas culturas do morangueiro e batata-doce e, seus efeitos abrangem crescimento, mudanças na anatomia foliar, fisiológicos e acúmulo de nutrientes pelas plantas.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa* Duch. *Ipomoea batatas* (L.). Inoculação. BPCP. Terra diatomácea.

ABSTRACT

In agriculture, the demand for alternatives to increase agricultural production in a sustainable way has become of great interest, due to the fact of dependence on chemical fertilizers used in food production. For this, other methods such as biostimulants that are substances or microorganisms applied to plants have the ability to positively affect vital processes, increasing nutritional efficiency, improving the quality characteristics of the crop regardless of its nutrient content such as strawberry and potato sweet. Biostimulants are a promising alternative with potential for application in agricultural production, especially growth-promoting bacteria, humic acid and diatomaceous earth because they have the ability to stimulate plant growth. Thus, the objective was to evaluate the potential of biostimulants in the growth of strawberry and sweet potato as a growth promoter. For this purpose, in vitro and greenhouse tests were performed on strawberry and sweet potato crops. Biostimulants (growth-promoting bacteria such as *Azospirillum brasilense*, *Pantoea ananatis* and *Paenibacillus favisporus* and humic acid) were evaluated for their ability to promote plant growth in strawberry. Phytotechnical, nutritional, physiological data (IRGA / infrared gas analyzer) and anatomical changes in plants were collected. In the second test, the frequency of application of *Azospirillum brasilense* on strawberry in relation to the effect of the plants' growth capacity was evaluated. In the third and fourth trial, the effect of diatomaceous earth on in vitro cultivation and sweet potato acclimatization on plant growth, physiology and anatomy were evaluated. The biostimulants were able to stimulate greater effects on growth, accumulation of nutrients, anatomy, physiology, showing that it is possible to combine bacterial inoculants with humic acid, obtaining better responses than the isolated application of both. It is concluded that the evaluated biostimulants have potential for application as growth promoters in strawberry and sweet potato crops, and their effects include growth, changes in leaf anatomy, physiological and nutrient accumulation by plants.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch. *Ipomoea batatas* (L.) inoculation, PGPB Diatomaceous earth.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO..... 12
2	REFERENCIAL TEÓRICO 14
2.1	Aspectos gerais do morangueiro..... 14
2.2	Aspectos gerais da batata-doce..... 15
2.3	Bioestimulantes 17
2.3.1	Bactérias promotoras de crescimento 19
2.3.2	Ácido húmico..... 21
2.3.3	Terra diatomácea..... 23
	REFERÊNCIAS..... 25
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS * 35
	ARTIGO 1 - Bioestimulantes no crescimento de mudas de morangueiro: ácido húmico e bactérias promotoras de crescimento 36
1	INTRODUÇÃO..... 37
2	MATERIAL E MÉTODOS 38
2.1	Material vegetal e descrição do ambiente de cultivo 38
2.2	Obtenção e cultivo dos inoculantes 39
2.3	Análises de crescimento..... 40
2.4	Análises nutricionais..... 40
2.5	Trocas gasosas e clorofila 41
2.6	Análises anatômicas..... 41
2.7	Análise de dados..... 42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 42
4	CONCLUSÕES..... 57
	REFERÊNCIAS..... 58
	ARTIGO 2 - Frequência de aplicação de <i>azospirillum brasiliense</i> no crescimento do morangueiro 63
1	INTRODUÇÃO..... 64
2	MATERIAL E MÉTODOS 65
2.1	Material vegetal e descrição do ambiente de cultivo 65

2.2	Microrganismo e produção de inóculo	66
2.3	Análises de fitotécnicas.....	67
2.4	Análises nutricionais.....	67
2.5	Trocas gasosas e clorofila	68
2.6	Análises anatômicas.....	68
2.7	Análise de dados.....	69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ARTIGO 3 - Diatomaceous earth promotes <i>in vitro</i> development of sweet potato	86
1	INTRODUCTION	86
2	MATERIAL AND METHODS	87
2.1	Preparation of plant material	87
2.2	<i>In vitro</i> assay	88
2.3	Phytotechnical analysis	88
2.4	Pigment analysis.....	88
2.5	Anatomical analysis	89
2.6	Statistical analysis.....	89
3	RESULTS AND DISCUSSION	89
4	CONCLUSIONS	96
	REFERENCES	98
	ARTIGO 4 - Acclimatization of sweet potatoes under <i>in vitro</i> application of diatomaceous earth.....	100
1	INTRODUCTION	100
2	MATERIALS AND METHODS.....	102
2.1	Plant materials and growth environment.....	102
2.2	<i>In vitro</i> assay	102
2.3	Acclimatization	103
2.4	Gas exchange and chlorophyll determination.....	103
2.5	Phytotechnical analysis	103
2.6	Anatomical analysis	104

2.7	Silicon concentration	104
2.8	Statistical analysis	105
3	RESULTS AND DISCUSSION	105
4	CONCLUSIONS	117
	REFERENCES	118

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A procura por produtos provenientes de cultivos orgânicos está em grande crescimento, mas a produção ainda é pequena com baixo rendimento em relação à agricultura convencional, como o morango e batata-doce. Essas duas culturas são produzidas em diferentes regiões e consumidas em quase todo o mundo, em razão do seu emprego na culinária e valores nutricionais bem definidos.

O morango é um pseudofruto cultivado e comercializado que cresceu seu consumo, nos últimos anos em diversas partes do mundo, devido às propriedades organolépticas, sabor único, com diversos benefícios para a saúde e composto com diferentes nutrientes que minimizam riscos de doenças crônicas. Já a batata-doce é uma cultura antiga, com vasta disseminação, e é produzida especialmente em sistemas agrícolas com reduzida entrada de insumos, sendo cultivada, principalmente, por pequenos produtores e acatada como fonte de segurança alimentar de várias populações rurais, sobretudo em regiões mais pobres.

Entretanto, para alcançar elevadas produções é necessário o uso intensivo de fertilizantes químicos no cultivo em campos produtivos. Esses métodos ocasionam em elevados custos de produção, problemas ambientais e efeitos negativos na saúde pública em médio e longo prazo. Diante disso, a agricultura moderna tem empregado uma série de inovações tecnológicas que proporcionam novos estímulos fisiológicos às plantas, auxiliando a se tornarem mais tolerantes aos estresses bióticos e abióticos.

Nesse contexto, são necessárias mudanças nas estratégias de produção dessas culturas, empregar novos métodos para aumentar a produtividade, como o uso de bioestimulantes, que promove o crescimento, desenvolvimento e aumento na produtividade das culturas, podendo apresentar grande potencial na produção do morango e da batata-doce. Os bioestimulantes são capazes de favorecer mudanças nos processos estruturais, promovendo o equilíbrio hormonal e estimulando o desenvolvimento, com o intuito de aumentar a produtividade das culturas. Assim, a utilização de bioestimulantes tem crescido, principalmente por ser alternativa ao uso eficiente de fertilizantes e por ser ecologicamente correto.

Entre os bioestimulantes, é encontrada uma abundância de produtos como: extratos de algas, produtos contendo aminoácidos, ácidos húmicos e fúlvicos, quitosana, compostos inorgânicos, fungos e bactérias promotoras de crescimento e produtos contendo reguladores de crescimento vegetal.

Entretanto, em decorrência da complexidade dos efeitos dos bioestimulantes nas plantas para induzir respostas fisiológicas e modificação em seu crescimento e desenvolvimento, dessas plantas, é necessário que a interação dos bioestimulantes seja bem-sucedida para a espécie vegetal estudada. Sendo assim, uma forma de ter acesso às respostas dos bioestimulantes, nas plantas, é por meio de pesquisas de seleção, frequência de aplicação e dosagem adequada com respostas na capacidade de crescimento sobre as espécies vegetais em que se objetiva aplicar.

Portanto, neste trabalho, objetivou-se avaliar o potencial de bioestimulantes à base de bactérias promotoras de crescimento vegetal como *Azospirillum brasilense*, *Pantoea ananatis* e *Paenibacillus favisporus*, ácido húmico e terra diatomácea no crescimento de morangueiro e de batata-doce, bem como verificar seus principais efeitos sobre essas culturas agrônômicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais do morangueiro

O morangueiro (*Fragaria x ananassa*, Duch.), pertencente à família Rosaceae, propaga-se via sexuada e assexuada (GONÇALVES et al., 2016). A reprodução assexuada ocorre, por meio de estolões utilizados, comercialmente, para a produção de mudas, por meio de estolões emitidos pela planta e enraizados no solo ou em substratos, podendo ser comercializados como muda de raiz nua ou com torrão (FRANZON et al., 2010). A reprodução sexuada se dá por sementes e é utilizada nos programas de melhoramento genético para adquirir maior variabilidade genética nos materiais (GALVÃO et al., 2014).

A planta de morangueiro é herbácea, rasteira e perene. Em geral, é cultivada como planta anual para a produção de frutos (FERLA et al., 2007). O sistema radicular é composto por raízes adventícias e fasciculadas. As adventícias também são conhecidas como raízes primárias, são perenes e têm função de reserva. As raízes fasciculadas ou secundárias se desenvolvem a partir das adventícias e são as responsáveis pela absorção de água e nutrientes, dispostas em camadas, quando são substituídas por outras que surgem acima das velhas (PIRES et al., 2000).

O fruto do morangueiro é um pseudofruto originário do receptáculo floral que se torna carnoso e suculento (FERLA et al., 2007). Os aquênios são os frutos verdadeiros, sendo estruturas escuras que contêm as sementes e se prendem ao morango que é o fruto falso (BORTOLOZZO et al., 2007). As folhas do morangueiro podem conter 3 a 5 folíolos, unidas a um pecíolo principal (QUEIROZ VOLTAN et al., 1996). As flores dessa espécie formam-se de meristemas terminais da coroa, sendo agrupadas em inflorescências (GONÇALVES et al., 2016). O florescimento do morangueiro é dependente de fatores internos, pela temperatura e pelo fotoperíodo, porém, está sensibilidade varia de acordo com a cultivar (BRADFORD et al., 2010).

O morangueiro, atualmente, produzido em diversos lugares é oriundo do cruzamento entre duas espécies selvagens, a *Fragaria virginiana*, originária da América do Norte, e a *Fragaria chiloensis*, originária do Chile e Ilhas do Havaí (EDGER et al., 2019). Esse cruzamento foi realizado, na Europa e resultou em plantas com frutos de maior tamanho e melhor qualidade (GONÇALVES et al., 2016). O cultivo do morangueiro pelos europeus era tanto para produção de frutos quanto ornamentação, tornando-se uma planta comum em jardins e hortas (HUMMER; HANCOCK, 2009).

O morango é uma das frutas mais importantes no mercado internacional, com cultivo realizado em diferentes partes do mundo, devido às propriedades organolépticas e sabor único (BHAT et al., 2015; TACO, 2011), mostrando grande aumento do seu consumo nos últimos anos (ANDRADE et al., 2019). O produto dessa cultura apresenta diversos benefícios para a saúde, composto por diferentes nutrientes que ajudam a reduzir riscos de doenças crônicas (FORBES-HERNANDEZ et al., 2016). Além disso, o morango tem alto teor de vitamina C, também fornece várias outras vitaminas em menor extensão, como tiamina, riboflavina, niacina e vitamina B6 e contém vitaminas lipossolúveis, incluindo carotenoides, vitamina A, vitamina E, vitamina K e apresenta uma atividade antioxidante, notavelmente, alta (MILLER et al., 2019). O fruto é uma boa fonte de manganês, magnésio, cobre, ferro e fósforo (NOUR et al., 2017). Esse fruto tem alto retorno econômico, pois é uma boa fonte de nutriente e possui grande aceitação dos consumidores e diversidade de comercialização e processamento (FACHINELLO et al., 2011).

Com forte apelo econômico e social, a produção do morango exhibe constante crescimento. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, no ano de 2007, a produção mundial anual de morangos foi estimada em mais de 5,8 milhões de toneladas com 341 mil hectares. Já, no ano de 2017, a produção quase dobrou, com o total de 9,2 milhões de toneladas e área plantada de 395 mil hectares. Atualmente, os países com maior produção do pseudofruto são China, Estados Unidos, México, Egito, Turquia, Espanha, República da Coreia, Polônia, Rússia e Marrocos (FAOSTAT, 2019). No Brasil, em 2017, segundo dados do IBGE (2017), apontaram o Sudeste (110.333 ton), Sul (28.662 ton), Centro-Oeste (4.650 ton) e o Nordeste (2.867 ton), como as regiões que tem as maiores quantidades produzidas de morango no Brasil.

2.2 Aspectos gerais da batata-doce

A batata-doce (*Ipomoea batatas* L. (Lam)) é uma espécie pertencente à família Convolvulaceae, originária da América do Sul e com ampla adaptação às variadas condições climáticas do Brasil (LOEBENSTEIN, 2009). É uma planta tropical herbácea possui caule do tipo rama que se desenvolve paralelamente ao solo, podendo atingir até três metros de comprimento. Possui folhas do tipo cordiforme, lanceolada e recortada com pecíolos bastante desenvolvidos. As flores são hermafroditas de coloração lilás ou arroxeadas. Entretanto, são

autoincompatíveis, o que beneficia a fecundação cruzada. Trata-se de uma planta perene, contudo cultivada como anual (FILGUEIRA, 2008).

Essa cultura é uma hortaliça que se destaca pela facilidade de cultivo, baixo custo de produção e com empregabilidade na alimentação humana e animal. Além disso, é uma importante alternativa para diversos processos industriais, matéria-prima para tecidos, papel e cosméticos (CARDOSO et al., 2005).

As raízes da batata-doce são utilizadas na culinária doméstica em inúmeras formas e ainda são úteis como matéria-prima para processos industriais (ROESLER et al., 2008). Além do consumo das raízes da batata-doce, alguns países, como do continente Africano consomem as folhas jovens que são ricas em proteínas e vitaminas (KAGIMBO et al., 2018). A batata-doce apresenta grande potencial na alimentação animal, pois seus resíduos culturais, como ramas e raízes tuberosas não comerciáveis podem ser aproveitados (FIGUEIREDO et al., 2012) e têm alto valor de proteína e energia, com 11% na matéria seca de ramas (GONÇALVES NETO et al., 2011).

A batata-doce apresenta grande variabilidade genética (WERA et al., 2014), permitindo seleção para inúmeras finalidades, como aquisição de materiais resistentes a pragas e doenças (AZEVEDO et al., 2002; NGAILO et al., 2016), com maior densidade de raízes e maior teor de matéria seca (CARDOSO et al., 2007). Apresenta-se com grande importância na produção industrial de farinha e amido (GONÇALVES NETO et al., 2011).

Em comparação com culturas como arroz, milho, banana e sorgo, em regiões tropicais, a batata-doce é mais eficiente em termos de quantidade produzida por unidade de área e por unidade de tempo (LEONEL et al., 2005). A batata-doce possui maior teor de carboidratos e lipídios do que o inhame e mais proteína que a mandioca. Em estruturas vegetais amiláceas, possui maior teor de matéria seca, carboidratos, lipídios, cálcio e fibras que a batata (*Solanum tuberosum*), e é considerada como boa fonte de energia, sais minerais e vitaminas (OLIVEIRA et al., 2008). É uma hortaliça rústica, de ampla adaptação, com alta tolerância à seca e de fácil produção (CAVALCANTE et al., 2006).

No contexto mundial, a batata-doce é cultivada em diversos países, com 70,5% na Ásia, 24,6% na África, 4% nas Américas, 0,8% na Oceania e 0,1% na Europa. Na produção mundial, a China se destaca como maior produtor de batata-doce com 71 milhões de toneladas, e entre os países da América do Sul o Brasil (776285 ton) encontra-se como um dos principais

produtores, sendo cultivada, praticamente, em todas as localidades e, principalmente, como cultura de segurança alimentar em pequenas propriedades rurais (FAOSTAT, 2019).

No Brasil, é uma cultura produzida, em sua maioria, em sistemas agrícolas com menor entrada de insumos, cultivada especialmente por pequenos produtores (FIGUEIREDO et al., 2012; MONTES et al., 2006; SOUZA, 2000). Essa cultura apresenta alto retorno econômico, sendo matéria-prima em processos industriais como a produção de farinha, amido, alimentação animal e com potencial na produção de etanol (DIAZ et al., 2014).

Como toda cultura agrícola, a batata-doce apresenta fatores bióticos e abióticos que influenciam seu crescimento e desenvolvimento, contribuindo para baixas produtividades ou perdas na qualidade (CASTRO et al., 2019; FAN et al., 2015; SILVA et al., 2019). Dentre os fatores que ocasionam perdas, o processo de multiplicação vegetativa, por meio de raízes e ramos se destaca, por ocorrer disseminações de pragas e doenças, durante os cultivos sucessivos, resultando em quedas na produção (CASTRO et al., 2008). As principais pragas, insetos de solo e nematoides danificam severamente as raízes, ocasionando perdas de qualidade (HUE; LOW, 2015; PINHEIRO et al., 2011).

Acatada como fonte de segurança alimentar de várias populações rurais, sobretudo em regiões mais pobres, a batata-doce representa uma alternativa de renda, principalmente pelo baixo custo de produção e por exibir um ciclo de 90 a 120 dias, proporcionando regular fluxo de capital na produção (MELO et al., 2009).

2.3 Bioestimulantes

Os bioestimulantes vegetais ou bioestimulantes agrícolas são definidos como qualquer substância ou microrganismo fornecido às plantas em pequenas quantidades que possuam capacidade de aumentar a eficiência da absorção nutricional, mas também elevar a tolerância ao estresse abiótico e bióticos, melhorando a qualidade dos produtos (BROWN et al., 2015; SOFO et al., 2014). A primeira definição de bioestimulantes vegetais surgiu como materiais que promovem o crescimento das plantas, quando aplicados em pequenas quantidades, exceto fertilizantes (KAUFFMAN et al., 2007).

Em decorrência do fato de os bioestimulantes aumentarem o vigor e a produtividade das plantas, a utilização tem sido empregada em todas as etapas de produção agrícola (YAKHIN et al., 2017). Os mais empregados e promissores são: extratos de algas, hidrolisados de proteínas,

ácidos húmicos e fúlvicos, silício, quitosana, compostos inorgânicos (Al, Co, Na, Se e Si), fungos e bactérias promotores de crescimento (DU JARDIN, 2015; RUZZI; AROCA et al., 2015).

Esses compostos, quando aplicados à planta, podem provocar modificações no crescimento, na anatomia, aumento nas atividades fotossintéticas, melhoria no desenvolvimento do sistema radicular e maior absorção de nutrientes. Além disso, os bioestimulantes também podem ajudar a quebrar a dormência, aumentar o tamanho dos frutos, o vigor, a uniformidade das plantas e regular a floração (CALVO et al., 2014; HALPERN et al., 2015). Todos esses efeitos se somam ao crescimento, acarretando no maior desempenho da cultura e alcançando elevadas produções (LANA et al., 2009).

As substâncias presentes nos bioestimulantes ajudam na maior absorção de água e nutrientes, proporcionando menor impacto em períodos de deficiência hídrica, durante o ciclo da cultura (RODRIGUES et al., 2015). A ação dos bioestimulantes contribui também em aumentar a tolerância contra salinidade, altas temperaturas, frio e maior resistência das plantas contra insetos pragas, doenças e nematoides. Porém, a eficácia dessas substâncias em combater as condições de estresses ocasionados às plantas, dependem de diferentes fatores como tempo de aplicação e modo de ação (SILVA et al., 2014; SOFO et al., 2014). Segundo Bulgari et al. (2019), a utilização de bioestimulantes pode ser realizada em diferentes períodos, antes de fatores que causem estresse no cultivo, durante o estresse ou mesmo depois. Esses mesmos autores afirmam que a aplicação dos bioestimulantes, durante o desenvolvimento, depende da espécie e do período mais crítico para a produção. Com isso, é necessário identificar o momento certo para sua aplicação, sendo tão importante quanto à determinação da concentração a ser utilizada.

Os bioestimulantes apresentam fatores que influenciam nas características da atividade do solo, tanto microbiologicamente quanto enzimaticamente, causando alterações no sistema radicular e alterando a solubilidade e transportabilidade dos nutrientes nas plantas (LUCINI et al., 2015; PASCALE et al., 2017). Essas alterações ocasionadas pela influência dos bioestimulantes, estimula o crescimento das plantas, aumentando seu metabolismo, germinação, fotossíntese e absorção de nutrientes do solo e, assim, melhorando a produtividade das plantas (YAKHIN et al., 2017).

Em relação ao uso de bioestimulantes na agricultura, o maior mercado foi em 2012, na Europa, com 6,2 milhões hectares tratados com bioestimulantes, sendo os principais produtores

França, Itália e Espanha (YAKHIN et al., 2017). Dessa forma, diversas pesquisas já foram documentadas, mostrando os efeitos positivos com o uso de bioestimulantes, em cultivos de olerícolas, a exemplo de pimenta (AMINIFARD et al., 2012), tomate (DHOUIB et al., 2019), alface (SANDEPOGU et al., 2019), espinafre (PEREIRA et al., 2019), *Solanum tuberosum* L. (PIVOVAROV et al., 2019), repolho (GODLEWSKA et al., 2019), entre outras.

Soppelsa et al. (2019), estudando o efeito de diferentes bioestimulantes (hidrolisado de alfafa, vitaminas, quitosana e silício) no morangueiro, verificaram que os mesmos foram capazes de promover o acúmulo de biomassa em raízes e frutos. Esses autores consideraram que os bioestimulantes são uma ferramenta agrônômica válida, capaz de opor-se às consequências negativas do cultivo sob condições nutricionais insuficientes. Mattner et al. (2018), avaliando o crescimento de raízes de morango com o uso de extrato comercial, verificaram aumento significativo no volume e comprimento das raízes das plantas de morango visando à produção comercial de frutos.

Neumann et al. (2017), trabalhando com extrato de alga (*Ascophyllum nodosum*) para a produção de mudas de batata-doce em bandejas, verificaram que esse bioestimulante otimizou a formação de mudas de batata-doce, contribuindo para o aumento de vigor e consequente precocidade das mesmas. Já, Rós et al. (2015), avaliando diferentes concentrações do bioestimulante na batata-doce, observaram interferência no número de raízes e folhas nas plantas, mas concentrações pequenas dos bioestimulantes não favoreceram a produtividade das raízes tuberosas.

Na avaliação dos bioestimulantes, existe grande diversidade nas respostas das plantas quando ao seu efeito, e apresentam misturas complexas derivadas de matérias-primas de origem altamente diferentes. Dessa forma, mostra-se que são necessárias pesquisas, em razão das diferentes respostas das plantas aos bioestimulantes, tornando não só um desafio, mas também uma grande oportunidade.

2.3.1 Bactérias promotoras de crescimento

O surgimento dos inoculantes bacterianos, no desenvolvimento das plantas, ocorreu a mais de cem anos (SANTOS et al., 2019a). Contudo, o uso de inoculantes na agricultura cresceu bastante nas últimas décadas, em sua maioria, em razão das comunidades de pesquisa e

desenvolvimento agrícola trabalharem em busca de soluções visando ao aumento da produção (CALVO et al., 2014; HAYAT et al., 2010).

As principais funções das bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) são de fornecer nutrientes para as plantas, por meio da fixação biológica de nitrogênio e solubilização de nutrientes, produção de hormônios vegetais, aumento da tolerância a estresses abióticos e melhoria da estrutura dos solos (BULGARI et al., 2019).

As BPCPs apresentam capacidade de crescer rapidamente e aproveitar grande variedade de substâncias como fonte de nutrientes, dentre essas alguns ficam dispersas no solo, outras interagem com as raízes das plantas (GLICK, 2014). De acordo com Pershina et al. (2015), em 1 g de solo é possível encontrar em solos de florestas mais de 2×10^9 células bacterianas e em solos de agricultura orgânica mais de $1,5 \times 10^9$. Em relação à interação plantas microrganismo, alguns estudos apontam que 20.000 espécies são completamente dependentes dos microrganismos para o crescimento e sobrevivência (VAN DER HEIJDEN et al., 2008).

A interação entre bactérias do solo e raízes das plantas ocorre na parte do solo localizada próxima às raízes, chamada de rizosfera. A rizosfera é a parte do solo onde as raízes das plantas e biota do solo se interagem, sendo a zona proeminente responsável por diversas interações microbianas (LYNCH; LYNCH et al., 1990). Essa interação entre plantas e bactérias ajuda as plantas a manterem a produtividade sob condições estressantes (ETESAMI et al., 2017).

Esses organismos apresentam grande capacidade para incrementar o crescimento e aumentar o rendimento de diferentes espécies vegetais (SINGH et al., 2018). O crescimento das plantas, por meio das bactérias promotoras de crescimento ocorre por mecanismos diretos e indiretos (GLICK, 1995). Os mecanismos diretos incluem produção de auxina, giberelina, citocininas, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e sequestro de ferro por sideróforos bacterianos. O mecanismo indireto refere-se em suprimir os microrganismos fitopatogênicos e incluem antibióticos, enzimas de degradação da parede celular, competição, cianeto de hidrogênio, resistência sistêmica induzida e extinção de sideróforos (BENIZRI et al., 2001; BHATTACHARYYA et al., 2012).

As BPCPs são um grupo com potencial em melhorar a nutrição das culturas agrícolas, aliviando os impactos do estresse ambiental, por ser um meio ecológico, biológico e de baixo custo em relação aos outros mecanismos utilizados atualmente na agricultura (MAYAK et al., 2004; ROLLI et al., 2015; TIMMUSK et al., 2015). Além disso, as BPCPs servem como biocontrole e biofertilizantes que auxiliam a manutenção da fertilidade do solo, como meio

alternativo aos fertilizantes químicos e ajudam na remoção de metais pesados e outros contaminantes do solo, transformando-os em formas que possam ser absorvidos e utilizados (SINGH et al., 2018; ULLAH et al., 2015).

No que tange à aplicação das bactérias promotoras de crescimento no segmento agrícola uma gama de culturas agrícolas apresentou respostas positivas se beneficiando da aplicação dos inoculantes bacterianos. As principais culturas inoculadas são soja (LEGGETT et al., 2017), feijão (HUNGRIA et al., 2003), grão de bico (LARANJO et al., 2014), milho (HUNGRIA et al., 2010), cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2019b), tomate (LIMA et al., 2018), alface (MANGMANG et al., 2014), morango (MORAIS et al., 2019), entre outras culturas.

Dentre as principais respostas observadas nas plantas, após a inoculação das bactérias, estão modificações anatômicas das folhas e raízes, maior crescimento da parte aérea e das raízes, maior acúmulo de biomassa, aumento da taxa de germinação, crescimento de colmos e caules, aumento nos teores de clorofila das folhas, aumento do peso de frutos e melhoria na qualidade, aumento do rendimento, maior sobrevivência de plantas na fase de aclimatização, além de aumentar a tolerância às condições ambientais de estresse e controle da incidência de fitopatógenos (JANG et al., 2018; LARRABURU et al., 2016; LARRABURU; LLORENTE, 2015; MORAIS et al., 2019; NAVEED et al., 2014; TORTORA et al., 2012).

As BPCPs desempenham papel fundamental no crescimento, desenvolvimento e na proteção das plantas, atuando de forma direta e indireta, por meio de vários mecanismos. Esses inoculantes bacterianos estão, cada vez mais, ganhando atenção, devido ao seu grande potencial na agricultura (CALVO et al., 2014). Dessa forma, a utilização de BPCPs pode tornar-se uma das estratégias de maior importância para a agricultura mundial, por representar uma ferramenta eficaz e sustentável, mantendo a produtividade das culturas agrônômicas e reduzindo o impacto ambiental dos sistemas produtivos.

2.3.2 Ácido húmico

O ácido húmico é um produto comercial que contém elementos que promovem a melhoria da fertilidade do solo e aumenta a quantidade de substâncias nutricionais essenciais para as plantas (ÇIMRIN et al., 2010). O ácido húmico é uma macromolécula que compreende substâncias húmicas, sendo constituintes naturais da matéria orgânica do solo, resultantes dos

processos de decomposição das plantas, animais e resíduos microbianos (BULGARI et al., 2019).

Há diferentes benefícios do ácido húmico sobre as plantas, como a melhora do desenvolvimento radicular, eficácia na reprodução de microrganismos do solo, aumento da retenção de água dos solos, melhoria da estrutura dos solos com maior aeração e fornecimento de nutrientes (FAHRAMAND et al., 2014; OLIVARES et al., 2017; PICCOLO et al., 1997). Dentre os efeitos do ácido húmico, o mais relatado é sobre estimular o desenvolvimento radicular, como resultado do desencadeamento da enzima $H^+ ATPase$, auxiliando na expansão radicular (CANELLAS et al., 2014). Essa substância, além de atuar de forma direta na morfologia e na fisiologia das raízes, atua também de forma indireta, modificando a química e dinâmica microbiana do solo (PUGLISI et al., 2013). Esses efeitos ocasionados pelos ácidos húmicos podem criar melhores condições para o desenvolvimento das plantas e explicar o aumento do crescimento delas.

O ácido húmico influencia, diretamente, na nutrição das plantas, resultando no aumento de macro e micronutrientes (BALDOTTO et al., 2009; JANNIN et al., 2012) e melhoria da tolerância a estresses ambientais, como estresse salino e hídrico (ALI et al., 2019; GARCÍA et al., 2012). No trabalho realizado com pimentão o ácido húmico e fósforo resultou em plantas com elevados teores de N, P, K, Ca, Fe, Mg, S, Mn e Cu em raízes e brotos (ÇIMRIN et al., 2010). A aplicação de ácido húmico em abacaxizeiro também incrementou os conteúdos de N, P, K, Ca e Mg, quando comparado com o tratamento controle (BALDOTTO et al., 2009).

A utilização de ácido húmico em ambientes salinos ajuda no desenvolvimento das plantas. Aydin et al. (2012), trabalhando com feijoeiro sob solo com alta salinidade, verificaram melhoria significativa das variáveis afetadas sobre alta salinidade o que ocasionou no aumento de nitrato, nitrogênio e fósforo das plantas. Nas condições de estresse hídrico, García et al. (2012), avaliando os efeitos do ácido húmico sobre o crescimento e a fisiologia de mudas de arroz, observaram aumento da massa seca das raízes em comparação ao controle sob condições de deficiência de água.

Em relação à resposta das plantas com a aplicação do ácido húmico é satisfatório a sua utilização por promover maior crescimento e desenvolvimento das plantas (BALDOTTO et al., 2014). Dessa forma, seus benefícios sobre a produção vegetal estimulam o aumento crescente de seu uso nas culturas agrícolas, que se baseiam em dados para a realização da sua aplicação,

devido ao fato de que é necessário determinar concentrações ótimas de ácidos húmicos para as diferentes culturas agrícolas e para cada sistema de manejo de cada região.

2.3.3 Terra diatomácea

A terra de diatomácea ou diatomita é uma rocha sedimentar composta pelos restos de esqueletos fossilizados de diatomáceas, proveniente de algas fossilizadas, contendo dióxido de sílica como seu principal componente (AMEL et al., 2019; LORINI et al., 2001). Em muitos produtos comerciais, a quantidade de terra de diatomácea apresenta a quantidade que varia de 80% a mais de 90% de sílica (SiO_2) (KORUNIC et al., 2006; SHAFIGHI et al., 2014; SHAMS et al., 2011).

De acordo com Pilon-Smits et al. (2009), o silício é considerado elemento benéfico, não sendo essencial para o desenvolvimento das plantas, mas pode promover o crescimento e ser eficaz em determinadas situações. O silício apresenta como característica a deposição de sílica amorfa, ao longo da planta, fortalecendo as paredes celulares das plantas e tornando as mais rígidas, desencadeando um mecanismo de defesa natural (CURRIE et al., 2007).

Esse produto é seguro para manuseio (LORINI et al., 2001), baixa toxicidade para mamíferos, sendo registrado como aditivo alimentar e que não promove a contaminação do meio ambiente (JAYAS et al., 1994). Além disso, a terra diatomácea também é usada no controle de insetos, sendo uma substância com grande potencial no controle dos principais insetos de armazenamento com eficiência e em curto espaço de tempo (MARSARO JÚNIOR et al., 2007).

Além disso, possui grande capacidade de retenção de água, devido a sua elevada porosidade, bem como a possibilidade de ser empregada para enriquecer biofertilizantes e ser utilizada na agricultura (MENDES, 2016). Na agricultura, a terra diatomácea é uma opção potencialmente sustentável para amenizar o estresse biótico e abiótico em diversas plantas, além de promover melhor desempenho das culturas (ETESAMI et al., 2018).

Na literatura, existem relatos da utilização de silício no cultivo *in vitro* e no processo de aclimatização, favorecendo morfologia foliar, fisiologia, crescimento e desenvolvimento das plantas (ASMAR et al., 2011; RODRIGUES et al., 2017; SILVA et al., 2012). Como a terra diatomácea é uma fonte com alta concentração de silício, estimula a exploração das potencialidades desse composto sobre os fatores de crescimento das culturas agrícolas.

Nesse contexto, a terra diatomácea traz benefícios para as culturas, estimulando o aumento da rigidez das células e tem efeitos indiretos como o aumento da eficiência da fotossíntese, e aumento da resistência das células, fato que mostra a potencialidade do emprego desse composto em outras formas de utilização a exemplo do cultivo *in vitro* e processos de aclimatização de mudas.

REFERÊNCIAS

- ALI, A.Y.A. et al. Ameliorative Effects of Jasmonic Acid and Humic Acid on Antioxidant Enzymes and Salt Tolerance of Forage Sorghum under Salinity Conditions. **Agronomy Journal**, v. 111, n. 6, p. 3099-3108, 2019.
- AMEL, T.; SAFIA, C.; BOUALEM, H. **Geochemical of Fossil Diatoms and Its Utilization as Adsorbent in Water Treatment**. Cham. Springer International Publishing, 2019, p.101-103..
- AMINIFARD, M. et al. Fulvic acid affects pepper antioxidant activity and fruit quality. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 68, p. 13179-13185, 2012.
- ANDRADE, F.M. et al. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v. 223-225, p. 120-128, 2019.
- ASMAR, S.A. et al. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira 'Maçã' micropropagadas. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1127-1131, 2011.
- 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.
- AZEVEDO, S.M. et al. Reação de clones de batata-doce aos insetos de solo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 3, p. 545-549, 2002.
- BALDOTTO, L.E.B. et al. 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. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, v. 61, p. 856-881, 2014.
- BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol science and technology**, v. 11, n. 5, p. 557-574, 2001.
- BHAT, R. et al. Consumers perceptions and preference for strawberries - a case study from Germany. **International journal of fruit science**, v. 15, n. 4, p. 405-424, 2015.
- BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.
- BORTOLOZZO, A.R. et al. 2007, Produção de morangos no sistema semihidropônico. 2ª ed. **Embrapa Uva e Vinho-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007. p. 24.

- BRADFORD, E.; HANCOCK, J.F.; WARNER, R.M. Interactions of temperature and photoperiod determine expression of repeat flowering in strawberry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 135, n. 2, p. 102-107, 2010.
- BROWN, P.; SAA, S. Biostimulants in agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 671, p. 1-3, 2015.
- BULGARI, R.; FRANZONI, G.; FERRANTE, A. Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. **Agronomy**, v. 9, n. 6, p. 306, 2019.
- CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J.W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and soil**, v. 383, n. 1-2, p. 3-41, 2014.
- CARDOSO, A.D. et al. Características físicas e sensoriais de clones de batata-doce. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1760-1765, 2007.
- CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, p. 3, 2014.
- CARDOSO, A.D. et al. Avaliação de clones de batata-doce em Vitória da Conquista. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 911-914, 2005.
- CASTRO, B.M.C. et al. Preference of red mite *Tetranychus ludeni* Zacher (Acari: Tetranychidae) to sweet potato genotypes. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 2, p. 208-212, 2019.
- CASTRO, L.A.S.; ROCHA, N.E.M.; ABRANTES, V.L. Avaliação biológica de viroses em plantas matrizes e mudas de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **Embrapa Clima Temperado- (Circular Técnica)**, 2008. p. 1-12.
- CAVALCANTE, J.T. et al. Análise de trilha em caracteres de rendimento de clones de batatadoce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 2, p. 261-266, 2006.
- ÇIMRIN, K.M. et al. Phosphorus and humic acid application alleviate salinity stress of pepper seedling. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 36, p. 5845-5851, 2010.
- CURRIE, H.A.; PERRY, C.C. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. **Annals of botany**, v. 100, n. 7, p. 1383-1389, 2007.
- DHOUIB, H. et al. Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against Verticillium wilt disease. **Biological Control**, v. 139, p. 104092, 2019.
- DIAZ, J.T.; CHINN, M.S.; TRUONG, V.-D. Simultaneous saccharification and fermentation of industrial sweet potatoes for ethanol production and anthocyanins extraction. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 53-60, 2014.

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

EDGER, P.P. et al. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. **Nature genetics**, v. 51, n. 3, p. 541-547, 2019.

ETESAMI, H.; BEATTIE, G.A. (Ed.) Plant-microbe interactions in adaptation of agricultural crops to abiotic stress conditions. In: **Probiotics and Plant Health**: Springer, 2017, p.163-200.

ETESAMI, H.; JEONG, B.R. Silicon (Si): Review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 881-896, 2018.

FACHINELLO, J.C. et al. Situation and perspectives of temperate fruit crops in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 109-120, 2011.

FAHRAMAND, M. et al. Influence of humic acid on increase yield of plants and soil properties. **International Journal of Farming and Allied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 339-341, 2014.

FAN, W. et al. Resistance to *Ditylenchus destructor* infection in sweet potato by the expression of small interfering RNAs targeting unc-15, a movement-related gene. **Phytopathology**, v. 105, n. 11, p. 1458-1465, 2015.

FAOSTAT. 2019. FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC10> >. Acesso em: 06 ago. 2019.

FERLA, N.J.; MARCHETTI, M.M.; GONÇALVES, D. Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (*Fragaria* sp., Rosaceae) e plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 1-8, 2007.

FIGUEIREDO, J.A. et al. Avaliação de silagens de ramas de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 708-712, 2012.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 421p.

FORBES-HERNANDEZ, T.Y. et al. The healthy effects of strawberry polyphenols: which strategy behind antioxidant capacity? **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 1, p. 46-59, 2016.

FRANZON, R.C.; CARPENEDO, S.; SILVA, J.C.S. **Produção de mudas**: principais técnicas utilizadas na propagação de fruteiras. Brasília: EMBRAPA Cerrados, 2010. p. 837.

GALVÃO, A.G. et al. Overcoming strawberry achene dormancy for improved seedling production in breeding programs. **Idesia**, v. 32, n. 4, p. 57-62, 2014.

GARCÍA, A.C. et al. 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, 2012.

GLICK, B.R. 1995, The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian journal of microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.

GLICK, B.R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30-39, 2014.

GODLEWSKA, K. et al. The Effect of Plant-Derived Biostimulants on White Head Cabbage Seedlings Grown under Controlled Conditions. **Sustainability**, v. 11,n. 19, p. 5317, 2019.

GONÇALVES, M. A. et al. Crescimento e desenvolvimento. In: ANTUNES, L. E. C.; REISSER JUNIOR, C.; SCHWENGBER, J. E. (Ed.). **Morangueiro**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado - Circular técnica: Brasília, DF: Embrapa, 2016.5 89 p.

GONÇALVES NETO, A.C. et al. Aptidões de genótipos de batata-doce para consumo humano, produção de etanol e alimentação animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 11, p. 1513-1520, 2011.

HALPERN, M.; BAR-TAL, A.; OFEK, M. et al. The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. In: (Ed.). **Advances in agronomy**: Elsevier, v.130, p.141-174, 2015.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.

HUE, S.M.; LOW, M.-Y. An Insight into sweet potato weevils management: A Review. **Psyche: A journal of Entomology**, v. 2015, p. 11, 2015.

HUMMER, K.E.; HANCOCK, J. Strawberry genomics: botanical history, cultivation, traditional breeding, and new technologies. In: (Ed.). **Genetics and genomics of Rosaceae**: Springer, p. 413-435, 2009.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 2, p. 88-93, 2003.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413-425, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2017**. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6619#resultado> >. Acesso em: 29 dez. 2019.

JANG, J. et al. Physiological changes and growth promotion induced in poplar seedlings by the plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus subtilis* JS. **Photosynthetica**, v. 56, n. 4, p. 1188-1203, 2018.

JANNIN, L. et al. Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. **Plant and Soil**, v. 359, n. 1, p. 297-319, 2012.

JAYAS, D.S.; WHITE, N.D.; MUIR, W.E. (Ed.) **Stored-grain ecosystems**. CRC Press, v. 39, p.751, 1994.

KAGIMBO, F.; SHIMELIS, H.; SIBIYA, J. Sweet Potato Weevil Damage, Production Constraints, and Variety Preferences in Western Tanzania: Farmers' Perception. **Journal of Crop Improvement**, v. 32, n. 1, p. 107-123, 2018.

KAUFFMAN, 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, n. 1, p. 261-267, 2007.

KORUNIC, Z.; FIELDS, P. **Susceptibility of three species of *Sitophilus* to diatomaceous earth**. Proceedings of the 9th International Conference on Stored-Product Protection. ABRAPOS, Rodovia, p. 681-686, 2006.

LANA, R.M.Q. et al. Aplicação de reguladores de crescimento na cultura do feijoeiro. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2009.

LARANJO, M.; ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 2-17, 2014.

LARRABURU, E.E.; BUSUSCOVICH, A.C.; LLORENTE, B.E. *Azospirillum brasilense* improves in vitro and ex vitro rooting-acclimatization of jojoba. **Scientia Horticulturae**, v. 209, p. 139-147, 2016.

LARRABURU, E.E.; LLORENTE, B.E. Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in in vitro rooting of pink lapacho. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 1, p. 175-184, 2015.

LEGGETT, M. et al. Soybean response to inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* in the United States and Argentina. **Agronomy journal**, v. 109, n. 3, p. 1031-1038, 2017.

LEONEL, M.; DE OLIVEIRA, M.A.; DUARTE FILHO, J. Espécies tuberosas tropicais como matérias-primas amiláceas. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 1, p. 49-68, 2005.

LIMA, N.D.S.A.; VOGEL, G.F.; FEY, R. Rates of application of *Azospirillum brasilense* in tomato crop. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 81-87, 2018.

LOEBENSTEIN, G. Origin, Distribution and Economic Importance. In: LOEBENSTEIN, G. e THOTTAPPILLY, G. (Ed.). **The Sweetpotato**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 9-12, 2009.

- LORINI, I. et al. Terra de diatomáceas como alternativa no controle de pragas de milho armazenado em propriedade familiar. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 2, p. 32-36, 2001.
- LUCINI, L. et al. The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 182, p. 124-133, 2015.
- LYNCH, J.; WHIPPS, J. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and soil**, v. 129, n.1, p. 1-10, 1990.
- MANGMANG, J.S.; DEAKER, R.; ROGERS, G. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination characteristics of tomato and lettuce. **Journal of tropical crop science**, v. 1, n. 2, p. 35-40, 2014.
- MARSARO JÚNIOR, A.L. et al. Eficiência da terra de diatomácea no controle de *Sitophilus zeamais* em milho armazenado. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 5, n.1, p. 27-32, 2007.
- MATTNER, S.W.; MILINKOVIC, M.; ARIOLI, T. Increased growth response of strawberry roots to a commercial extract from *Durvillaea potatorum* and *Ascophyllum nodosum*. **Journal of applied phycology**, v. 30, n. 5, p. 2943-2951, 2018.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 565-572, 2004.
- MELO, A.S. et al. Custo e rentabilidade na produção de batata-doce nos perímetros irrigados de Itabaiana, Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Tropical** (Agricultural Research in the Tropics), 2009. p. 119-123.
- MENDES, R.B. **Produção e qualidade de sementes e raízes de cenoura em solo adubado com biofertilizante enriquecido com resíduo de terra diatomácea**. 2016. 73 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2016.
- MILLER, K.; FEUCHT, W.; SCHMID, M. Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: A brief overview. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1510, 2019.
- MONTES, S.M.N.M. et al. Custos e rentabilidade da batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) na região oeste do Estado de São Paulo: estudo de caso. **Informações Econômicas**, v. 36, n. 4, p. 15-23, 2006.
- MORAIS, M.C. et al. Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 12, p. 5341-5349, 2019.

NAVEED, M. et al. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 30-39, 2014.

NEUMANN, É.R. et al. Produção de mudas de batata doce em ambiente protegido com aplicação de extrato de *Ascophyllum nodosum*. **Horticultura Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 490-498, 2017.

NGAILO, S. et al. Screening of Tanzanian sweet potato germplasm for yield and related traits and resistance to sweet potato virus disease. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B Soil & Plant Science**, v. 66, n. 1, p. 52-66, 2016.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; COSMULESCU, S. Antioxidant compounds, nutritional quality and colour of two strawberry genotypes from *Fragaria* × *Ananassa*. **Erwerbs-Obstbau**, v. 59, n. 2, p. 123-131, 2017.

OLIVARES, F.L. et al. Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 30, 2017.

OLIVEIRA, M.K.T. et al. Multiplicação *in vitro* de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam). **Revista Caatinga**, v. 21, n. 4, p. 129-134, 2008.

PASCALE, S.; ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Plant biostimulants: innovative tool for enhancing plant nutrition in organic farming. **European Journal of Horticultural Science**, v. 82, n. 6, p. 277-285, 2017.

PEREIRA, C. et al. The effects of biostimulants, biofertilizers and water-stress on nutritional value and chemical composition of two spinach genotypes (*Spinacia oleracea* L.). **Molecules**, v. 24, n. 24, p. 4494, 2019.

PERSHINA, E. et al. Comparative analysis of prokaryotic communities associated with organic and conventional farming systems. **Plos One**, v. 10, n. 12, 2015.

PICCOLO, A.; PIETRAMELLARA, G.; MBAGWU, J.S.C. Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. **Geoderma**, v. 75, n. 3, p. 267-277, 1997.

PILON-SMITS, E.A. et al. Physiological functions of beneficial elements. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 3, p. 267-274, 2009.

PINHEIRO, J.B. et al. Nematoides na cultura da batata-doce. **Embrapa Hortaliças (Circular Técnica)**, 2011. p. 1-9.

PIRES, R.C.D.M. et al. Profundidade efetiva do sistema radicular do morangueiro sob diferentes coberturas do solo e níveis de água. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 793-799, 2000.

PIVOVAROV, V.; GINS, E.; BAIKOV, A. The effect of leaf treatment (*Solanum tuberosum* L. cv Zhukovsky) with an early leaf extract (*Amaranthus tricolor* L. cv Early splendor) on the photosynthetic indicators of potato plants and the feeding of the colorado beetle larvae. IOP Conference Series. **Earth and Environmental Science**, v. 395, p. 1-4, 2019.

PUGLISI, E. et al. Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 82-94, 2013.

QUEIROZ VOLTAN, R.B. et al. Caracterização botânica de cultivares de morangueiro. **Bragantia**, v. 55, n. 1, p. 29-44, 1996.

RODRIGUES, F.A. et al. Application of silicon sources in yam (*Dioscorea* spp.) micropropagation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 11, p. 1469-1473, 2017.

RODRIGUES, L.A. et al. Avaliação fisiológica de sementes de arroz submetidas a doses de bioestimulante. **Nucleus**, v. 12, n. 1, p. 207-214, 2015.

ROESLER, P.V.S.D.O. et al. Produção e qualidade de raiz tuberosa de cultivares de batata-doce no oeste do Paraná. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 117-122, 2008.

ROLLI, E. et al. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 2, p. 316-331, 2015.

ROS, A.B.; NARITA, N.; ARAÚJO, H.S.D. Efeito de bioestimulante no crescimento inicial e na produtividade de plantas de batata-doce. **Revista Ceres**, v. 62, p. 469-474, 2015.

RUZZI, M.; AROCA, R. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 124-134, 2015.

SANDEPOGU, M. et al. Combination of ascophyllum nodosum extract and humic acid improve early growth and reduces post-harvest loss of lettuce and Spinach. **Agriculture (Switzerland)**, v. 9, n. 11, p. 1-16, 2019.

SANTOS, M.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 205, 2019a.

SANTOS, S.G. et al. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 12-23, 2019b.

SHAFIGHI, Y.; ZIAEE, M.; GHOSTA, Y. Diatomaceous earth used against insect pests, applied alone or in combination with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 54, n. 1, p. 62-66, 2014.

SHAMS, G.; SAFARALIZADEH, M.H.; IMANI, S. Insecticidal effect of diatomaceous earth against *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae) and *Sitophilus granarus* (L.)(Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 24, p. 3574-3578, 2011.

SILVA, A.B.D. et al. Morfofisiologia e anatomia foliar de mudas micropropagadas e aclimatizadas de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne em diferentes substratos. **Revista Ceres**, v. 59, n. 5, p. 580-586, 2012.

SILVA, D.N. et al. Yield and soil insect resistance in sweet potato clones. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 6, p. 1773-1779, 2019.

SILVA, M.J.R. et al. Formação de mudas de melancia em função de diferentes concentrações e formas de aplicação de bioestimulante. **Scientia Plena**, v. 10, n. 10, p. 1-9, 2014.

SINGH, V.K. et al. Interaction of plant growth promoting bacteria with tomato under abiotic stress: A review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 267, p. 129-140, 2018.

SOFO, A. et al. (Ed.). Control of biotic and abiotic stresses in cultivated plants by the use of biostimulant microorganisms. In: **Improvement of crops in the Era of Climatic Changes**: Springer, 2014. p.107-117.

SOPPELSA, S. et al. Foliar applications of biostimulants promote growth, yield and fruit quality of strawberry plants grown under nutrient limitation. **Agronomy**, v. 9, n. 9, p. 1-22, 2019.

SOUZA, A.B.D. Avaliação de cultivares de batata-doce quanto a atributos agronômicos desejáveis. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 4, p. 841-845, 2000.

TACO, N. **Tabela brasileira de composição de alimentos**: Campinas, 2011. 161 p.

TIMMUSK, S. et al. Sfp-type PPTase inactivation promotes bacterial biofilm formation and ability to enhance wheat drought tolerance. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 387, 2015.

TORTORA, M.L.; DÍAZ-RICCI, J.C.; PEDRAZA, R.O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 279-290, 2012.

ULLAH, A. et al. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 117, p. 28-40, 2015.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; VAN STRAALLEN, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 11, n. 3, p. 296-310, 2008.

WERA, B. et al. Genotypic variability estimates of agronomic traits for selection in a sweet potato (*Ipomoea batatas*) polycross population in Papua New Guinea. **Journal of Plant breeding and Genetics**, v. 2, n. 3, p. 131-136, 2014.

YAKHIN, O.I. et al. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 2049, p. 1-32, 2017.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS *

ARTIGO 1 - Bioestimulantes no crescimento de mudas de morangueiro: ácido húmico e bactérias promotoras de crescimento

RESUMO

A demanda por produtos orgânicos cresce a cada ano. No entanto, os rendimentos na agricultura orgânica apresentam produções inferiores que a agricultura convencional. Dessa forma, o uso de bactérias promotoras de crescimento, em campos de produção, torna-se uma ferramenta fundamental. Com isso, objetivou-se avaliar os efeitos da inoculação de três bactérias promotoras de crescimento com e sem associação ao ácido húmico sobre atributos fitotécnicos, nutricionais, fisiológicos e anatômicos na cultura do morangueiro. Mudas de morangueiro provenientes do cultivo *in vitro* foram aclimatizadas e transplantadas para vasos e mantidas em casa de vegetação. No ensaio foram utilizados nove tratamentos, constituídos de: 1) controle – solução nutritiva reduzida sem inoculação; 2) controle: solução nutritiva completa sem inoculação; 3) Azos: *Azospirillum brasilense*; 4) Azos + AH: *Azospirillum brasilense* + ácido húmico; 5) Pant: *Pantoea ananatis*; 6) Pant + AH: *Pantoea ananatis* + ácido húmico; 7) Paen: *Paenibacillus favisporus*; 8) Paen: *Paenibacillus favisporus* + ácido húmico; 9) Ácido húmico. Aos 100 dias da instalação do experimento, foram avaliadas características fitotécnicas, nutricionais, fisiológicas e anatomia foliar. A inoculação das bactérias promoveu mudanças em todas as características avaliadas. Os inoculantes bacterianos *Pantoea ananatis* e *Paenibacillus favisporus* induziram resultados promissores, melhorando o desempenho inicial do morangueiro, evidenciando interação com as plantas de morangueiro como promotores de crescimento.

Palavras-chave: BPCP. Inoculação. Anatomia. Fotossíntese.

Biostimulants in the growth of strawberry: humic acid and growth-promoting bacteria

ABSTRACT

The demand for organic products grows every year. However, the yields in organic agriculture show lower yields than conventional agriculture. Thus, the use of growth-promoting bacteria in production fields becomes a fundamental tool. Thus, the objective was to evaluate the effects of inoculation of three growth-promoting bacteria with and without association with humic acid on phytotechnical, nutritional, physiological and anatomical attributes in strawberry cultivation. Strawberry seedlings from *in vitro* cultivation were acclimatized and transplanted into pots and kept in a greenhouse. In the trial, nine treatments were used, consisting of: 1) control - reduced nutrient solution without inoculation; 2) control: complete nutrient solution without inoculation; 3) Azos: *Azospirillum brasilense*; 4) Azos + AH: *Azospirillum brasilense* + humic acid; 5) Pant: *Pantoea ananatis*; 6) Pant + AH: *Pantoea ananatis* + humic acid; 7) Paen: *Paenibacillus favisporus*; 8) Paen: *Paenibacillus favisporus* + humic acid; 9) Humic acid. At 100 days after installation of the experiment, phytotechnical, nutritional, physiological and leaf anatomy characteristics were evaluated. The inoculation of the bacteria promoted changes in all evaluated characteristics. The bacterial inoculants *Pantoea ananatis* and *Paenibacillus*

favisporus induced promising results, improving the initial performance of the strawberry, showing interaction with the strawberry plants as growth promoters.

Keywords: PGPB. Inoculation. Anatomy. Photosynthesis.

1 INTRODUÇÃO

Para alcançar elevadas produções de morango, é necessária grande quantidade de fertilizantes em diferentes estágios fenológicos, o que acarreta aumento dos custos totais de produção (DOGRA et al., 2019; LOVAISA et al., 2015). Conseqüentemente, a demanda de tecnologias e métodos para a produção de forma sustentável torna-se necessária, principalmente o atrelamento de fertilizantes químicos usados na produção de morango (ANDRADE et al., 2019).

Na busca de métodos alternativos que proporcionem melhores produções e maiores rentabilidade nas culturas agrícolas, novas estratégias estão surgindo e sendo adotadas pelos produtores, como o uso de bioestimulantes. Os bioestimulantes são substâncias ou microrganismos que aplicados em pequenas quantidades promovem o crescimento das plantas, exceto fertilizantes (DU JARDIN, 2015). Com isso, o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e substâncias húmicas (AH), apresentam potencial no crescimento do morangueiro (SERRET-LÓPEZ et al., 2016).

As bactérias promotoras de crescimento são microrganismos que possibilitam a melhoria do crescimento e rendimento das plantas, permitindo a sua utilização no lugar de produtos químicos sintéticos (ESITKEN et al., 2010). Além disso, estimulam o desenvolvimento das plantas de forma direta e indiretamente, colonizando-se na rizosfera das plantas (PREMACHANDRA et al., 2016).

Esses microrganismos podem agir na planta por diferentes mecanismos. De forma direta, com reguladores de crescimentos, auxinas, citocininas e giberelinas, solubilização de fósforo e fixação de nitrogênio atmosférico (FERREIRA et al., 2019; GLICK, 1995), ou de forma indireta, que são mecanismos que inibem os microrganismos fitopatogênicos que dificultam o crescimento das plantas (BENIZRI et al., 2001; BHATTACHARYYA et al., 2012).

As BPCPs são um grupo com potencial em melhorar a nutrição das culturas agrícolas (ERDOGAN et al., 2018) e apoiar o desenvolvimento das plantas em condições naturais, seja por estresse salino (CHANRATANA et al., 2019) ou hídrico (CHANDRA et al., 2019). Além disso, aumentam o rendimento e a qualidade de frutos de diversas culturas importantes, como videira (ERDOGAN et al., 2018), macieira (KARLIDAG et al., 2007), tomateiro (BONA et al., 2018) morangueiro (MORAIS et al., 2019), dentre outras culturas, exercendo papel fundamental no desenvolvimento sustentável.

Atualmente, alguns gêneros, como *Azospirillum* (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017; MEHNAZ et al., 2006; SALAMONE et al., 1996) são descritos como fixadores de nitrogênio, e outros como *Paenibacillus* sendo solubilizadores de fosfato (MARRA et al., 2012). Já, o gênero *Pantoea* é relatado como fixador de nitrogênio (LOIRET et al., 2004) e solubilizador de fosfato (ORTEGA et al., 2008; SINGH et al., 2014).

Dessa forma, para melhorar o rendimento das culturas, a associação de BPCP e ácidos húmicos (AH) mostra-se como mecanismo sustentável e que maximiza o crescimento e desenvolvimento das plantas, obtendo maiores produções nas culturas agrícolas (MELO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018). Os AH são empregados na agricultura, pois promovem a melhoria das propriedades físicas e físico-químicas, favorecem a capacidade de retenção de água e da atividade biológica do solo, exercendo papel direto sobre o crescimento das plantas, especialmente sobre o desenvolvimento radicular (RODRIGUES et al., 2014).

O uso de BPCP, aliado ao ácido húmico, no cultivo de morangueiro, torna-se uma estratégia de grande importância para a agricultura. Com isso, objetivou-se avaliar os efeitos de bioestimulantes sobre atributos fitotécnicos, nutricionais, fisiológicos e anatômicos na cultura do morangueiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e descrição do ambiente de cultivo

O experimento foi realizado em ambiente protegido e instalado sobre sistema de bancada em estufa localizada no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras – MG, no período de junho a setembro de 2018. O município está situado a 21°14'06" S e 45°00'00" W e altitude média de 918 m.

Mudas de morangueiro cultivar Pircinque foram cedidas pela Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), cultivadas *in vitro* em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8. As plantas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de cerca de 40 μmol m⁻² s⁻¹. As plantas com quatro semanas de cultivo foram utilizadas como fornecedoras de explantes para os ensaios.

As mudas provenientes de cultivo *in vitro* foram aclimatizadas em substrato Tropstrato® por 20 dias. As mudas aclimatizadas foram transplantadas para vasos com volume de cinco litros, contendo latossolo vermelho, sendo adicionados 20 gramas de lithothamnium por vaso. A caracterização química do solo apresentou pH = 5,4; P = 0,47 mg dm⁻³; K = 2,55 mg dm⁻³; Ca = 0,27 cmolc dm⁻³; Mg = 0,10 cmolc dm⁻³; Al = 0,04 cmolc dm⁻³; t = 0,42 cmolc dm⁻³; T = 1,92 cmolc dm⁻³; Saturação de alumínio = 9,52%; Saturação por base = 19,61%; Matéria orgânica = 0,73 dag kg⁻¹; Cu = 1,41 mg dm⁻³; Fe = 29,89 mg dm⁻³; Mn = 2,06 mg dm⁻³; e Zn = 0,47 mg dm⁻³. As plantas foram mantidas em casa de vegetação cobertas com filme de polietileno transparente (150 microns) e sombrite 70% e irrigadas diariamente.

2.2 Obtenção e cultivo dos inoculantes

As bactérias utilizadas no ensaio foram obtidas na Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA/UFLA) do Laboratório de Microbiologia das Fermentações do Departamento de Biologia da UFLA. Para o ensaio, foram utilizadas *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), *Pantoea ananatis* (MQT16M1) e *Paenibacillus favisporus* (MHT8M6) já descritas na literatura como bactérias promotoras de crescimento vegetal. As bactérias selecionadas foram cultivadas em meio ágar-nutriente (3 g L⁻¹ de extrato de carne, 5 g L⁻¹ de peptona e 15 g L⁻¹ de ágar).

Para a aplicação do inóculo bacteriano no solo, foi realizado previamente o preparado em meio caldo nutriente a 30°C sob agitação orbital constante de 120 rpm, durante 48 horas e posterior ajuste da concentração celular para 1 x 10⁸ células mL⁻¹ (densidade óptica de 0,5 e comprimento de onda de 600 nm mensurada em espectrofotômetro). A quantidade de caldo nutriente com o inóculo foi de 10 mL por planta.

No ensaio, foram utilizados nove tratamentos, constituídos de: 1) controle – solução nutritiva reduzida sem inoculação; 2) controle: solução nutritiva completa sem inoculação; 3) Azos: *Azospirillum brasilense*; 4) Azos + AH: *Azospirillum brasilense* + ácido húmico; 5) Pant:

Pantoea ananatis; 6) Pant + AH: *Pantoea ananatis* + ácido húmico; 7) Paen: *Paenibacillus favisporus*; 8) Paen: *Paenibacillus favisporus* + ácido húmico; 9) Ácido húmico. *Azospirillum brasilense*, *Pantoea ananatis* e *Paenibacillus favisporus* foram avaliados quanto à sua capacidade de promoção de crescimento vegetal no morangueiro, conduzidos em casa de vegetação. As bactérias foram aplicadas a cada 15 dias com e sem ácido húmico. A quantidade de ácido húmico foi de 10 ml L⁻¹, após a diluição aplicados 100 ml por vaso. O ácido húmico foi proveniente da empresa SoloHumic®. Além disso, a cada 15 dias, foi aplicada a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (completa para o controle positivo e com níveis de 10% de nitrogênio e fósforo) na quantidade de 50 ml por vaso. A solução completa de Hoagland e Arnon (1950) utilizada para o tratamento sem inoculação + adubação completa apresentava 1 mL L⁻¹ de KH₂PO₄ (1 mol L⁻¹), 5 mL L⁻¹ KNO₃ (1 mol L⁻¹), 5 mL L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ (1 mol L⁻¹), 2 mL L⁻¹ de MgSO₄ (1 mol L⁻¹), 1 mL de solução de micronutrientes (2,86 g L⁻¹ de H₃BO₃, 1,81 g L⁻¹ de MnCl₂, 0,22 g L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O, 0,08 g L⁻¹ de NaMoO₄.4H₂O) e 1 mL de Fe-EDTA (24,1 g L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 25,1 g L⁻¹ de EDTA). A composição da solução com baixa adição de nitrogênio e fósforo (10% da necessidade total) consistiu na substituição de KH₂PO₄, KNO₃ e Ca(NO₃)₂ por 5,9 mL de KCl (1 mol L⁻¹), 5 mL de CaCl₂ (1 mol L⁻¹), 0,1 mL L⁻¹ de KH₂PO₄ (1 mol L⁻¹) e 1 mL L⁻¹ de NH₄NO₃ (1,5 mol L⁻¹) (GONZÁLEZ, 2015).

Aos 100 dias da instalação do experimento, foram efetuadas nas mudas de morangueiro análises de crescimento, nutricionais, trocas gasosas, teor de clorofila e análises anatômicas.

2.3 Análises de crescimento

Após 100 dias do início do experimento, foram analisados números de folhas, comprimento de parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm), massa fresca e seca (g) da parte aérea e raiz. A massa seca do material vegetal foi analisada após secagem em estufa de secagem com circulação e renovação de Ar - SL-102/Solab a 60°C por 72 horas até peso constante.

2.4 Análises nutricionais

As plantas foram secas em estufa de secagem com circulação e renovação de Ar - SL-102/Solab a temperatura de aproximadamente 60 °C a 65 °C até atingir peso constante. Posteriormente, realizou-se análise nutricional foliar, segundo metodologia descrita por

Malavolta et al. (1997). Foram analisados os teores de nitrogênio (N) e fósforo (P). Para a análise foliar, as amostras foram compostas de folhas de três repetições (quatro plantas por parcela) por tratamento.

2.5 Trocas gasosas e clorofila

Para a avaliação de trocas gasosas, foram mensuradas com analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA / Infra-Red Gas Analyzer) modelo LiCor-6400XT. Para a avaliação foram selecionadas folhas completamente expandidas em oito plantas por tratamento, a partir das 08h00min. A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foi fixada na câmara do aparelho para $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em seguida, determinaram-se a taxa fotossintética (A) em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, taxa transpiratória (E) em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, condutância estomática (gs) em $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e carbono interno (Ci).

Para o estudo dos teores de clorofila, foi utilizada o ClorofiLOG (Modelo Cfl 1030), sendo realizadas as medições em duas posições da planta. Essas medidas foram realizadas em duas folhas completamente expandidas de cada indivíduo. Foram avaliados os teores de clorofila *a*, *b* e total.

2.6 Análises anatômicas

Para a análise anatômica, utilizou-se a região mediana da segunda folha completamente expandida. As amostras foram obtidas de quatro indivíduos diferentes para cada tratamento. Posteriormente, as amostras foram transferidas para frascos com álcool 70% e desidratadas em série alcoólica (70, 80, 90 e 100%), sendo deixadas por 15 minutos em vácuo e duas horas em cada concentração alcoólica. Em seguida, as amostras foram mantidas por 24 horas em solução de resina para pré-infiltração, composta de etanol 100% e resina líquida base (1:1). Logo após, foram emblocadas com o kit HistoResin (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha).

As seções transversais foram obtidas em micrótomo semiautomático rotativo com espessura de $8 \mu\text{m}$, coradas com azul de toluidina e lavadas com água destilada para retirada do excesso de corante. Posteriormente, as lâminas foram montadas com Verniz vitral como meio de montagem.

As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico (Motic BA 210) com câmera acoplada (Moticam 5) para captura das imagens. Para cada repetição foram realizadas dez fotografias, utilizando-se seis lâminas com as seções transversais. As imagens obtidas foram analisadas em software específico para análise de imagens Motic Images Plus 3.0.

Para a determinação da espessura dos tecidos foliares foram avaliadas: espessura da epiderme adaxial (EEAD), espessura da epiderme abaxial (EAB); espessura do parênquima paliçádico (EPP), espessura do parênquima lacunoso (EPL), espessura do mesofilo (EM) e espessura do limbo foliar (ELF).

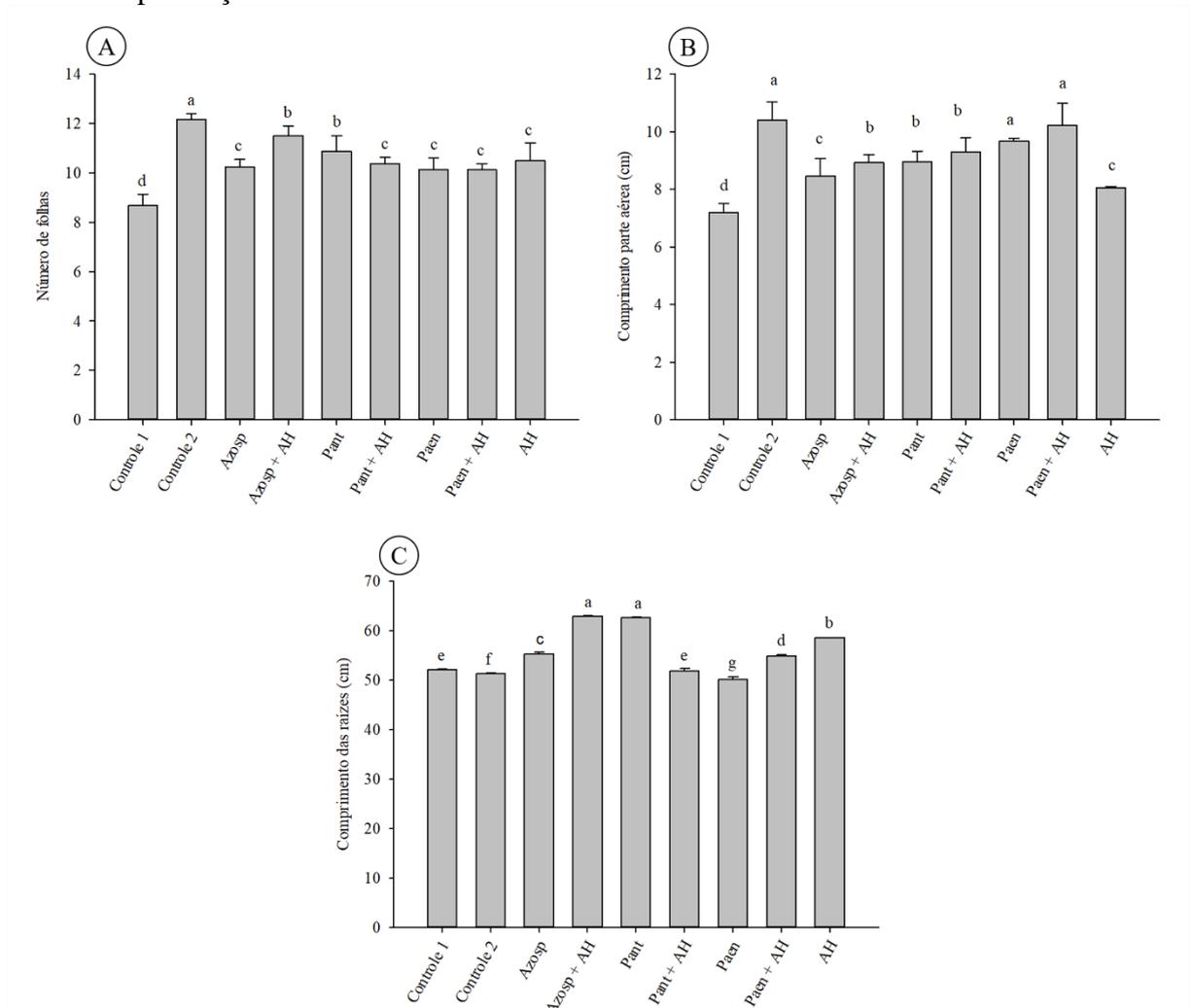
2.7 Análise de dados

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com nove tratamentos, quatro repetições (três plantas por parcela). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o software R (v. 3.2.2). Todos os gráficos foram produzidos com o software SigmaPlot 13.0 (Systat Software, Inc).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cultivar de morangueiro Pircinque mostrou-se responsiva à inoculação das bactérias promotoras de crescimento (BPCP), com efeitos significativos em todas as variáveis analisadas ($p < 0,05$). Em relação ao número de folhas, comprimento de parte aérea e comprimento das raízes, os resultados mostraram que foram afetados, significativamente, pela inoculação bacteriana (FIGURA 1). No entanto, para o número de folhas, o tratamento com adubação completa sem inoculação foi superior aos demais tratamentos.

Figura 1 - Número de folhas (A), comprimento de parte aérea (B) e comprimento das raízes (C) de morangueiro cv. Pircinque cultivado em casa de vegetação por 100 dias na presença e ausência de bioestimulantes.



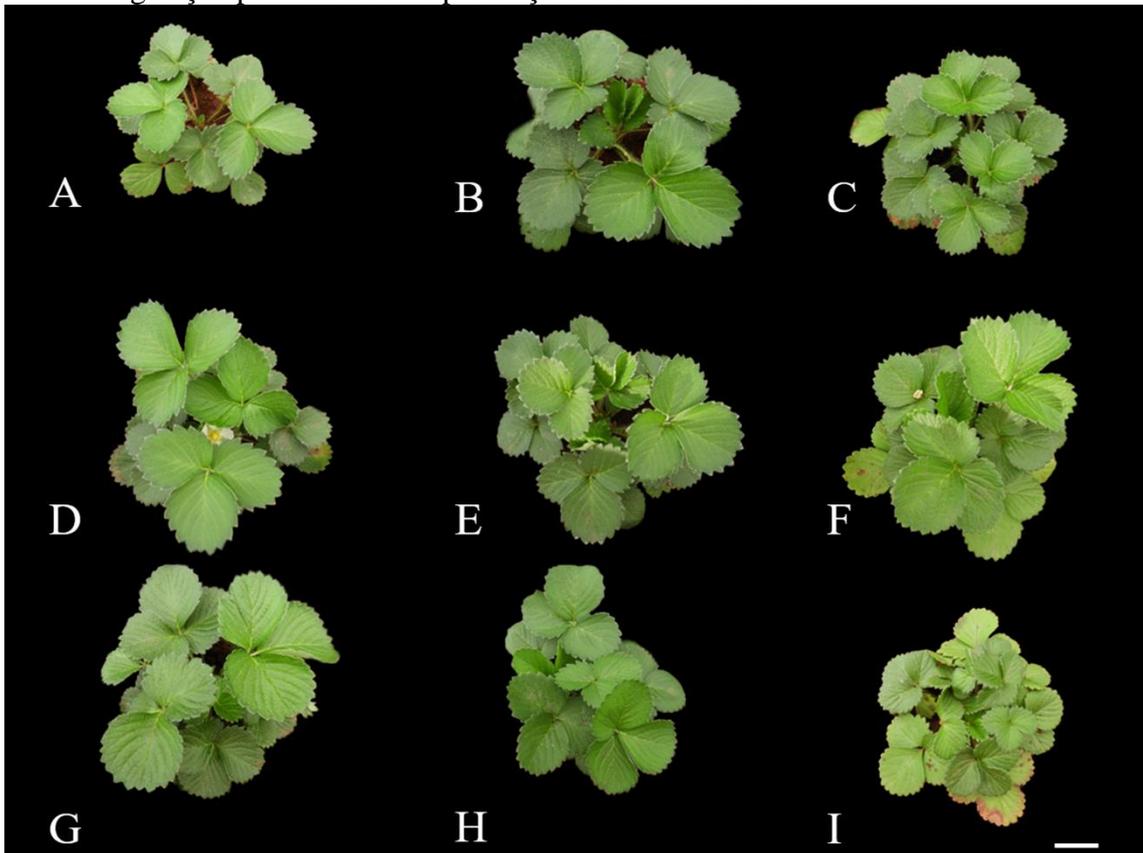
Médias representadas pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

Para comprimento da parte aérea, a bactéria *Paenibacillus favisporus* com e sem associação com o ácido húmico (AH) mostrou-se superior. Contudo, não diferiu significativamente ao controle com adubação completa e sem inoculação (FIGURA 1B). Os outros tratamentos apresentaram efeitos intermediários ou baixos no número de folhas e comprimento da parte aérea do morangueiro. Porém, diferiram-se, significativamente, do tratamento com adubação reduzida o que pode ser verificado na Figura 2. Morais et al. (2019), trabalhando com morangueiro, observaram resultados diferentes em relação ao número de folhas e comprimento de parte aérea, onde nenhuma das variáveis diferiu significativamente pela inoculação bacteriana quando comparou com o controle que possuía solução nutritiva

reduzida e sem inoculação. Já, dados apresentados por Tomic et al. (2015) indicaram maior número de folhas por plantas em relação ao tratamento controle, o que não foi observado nesse trabalho, onde o controle completo foi superior aos demais tratamentos.

Figura 2 - Crescimento de parte aérea de morangueiro cv. Pircinque cultivado em casa de vegetação por 100 dias na presença e ausência de bioestimulantes.

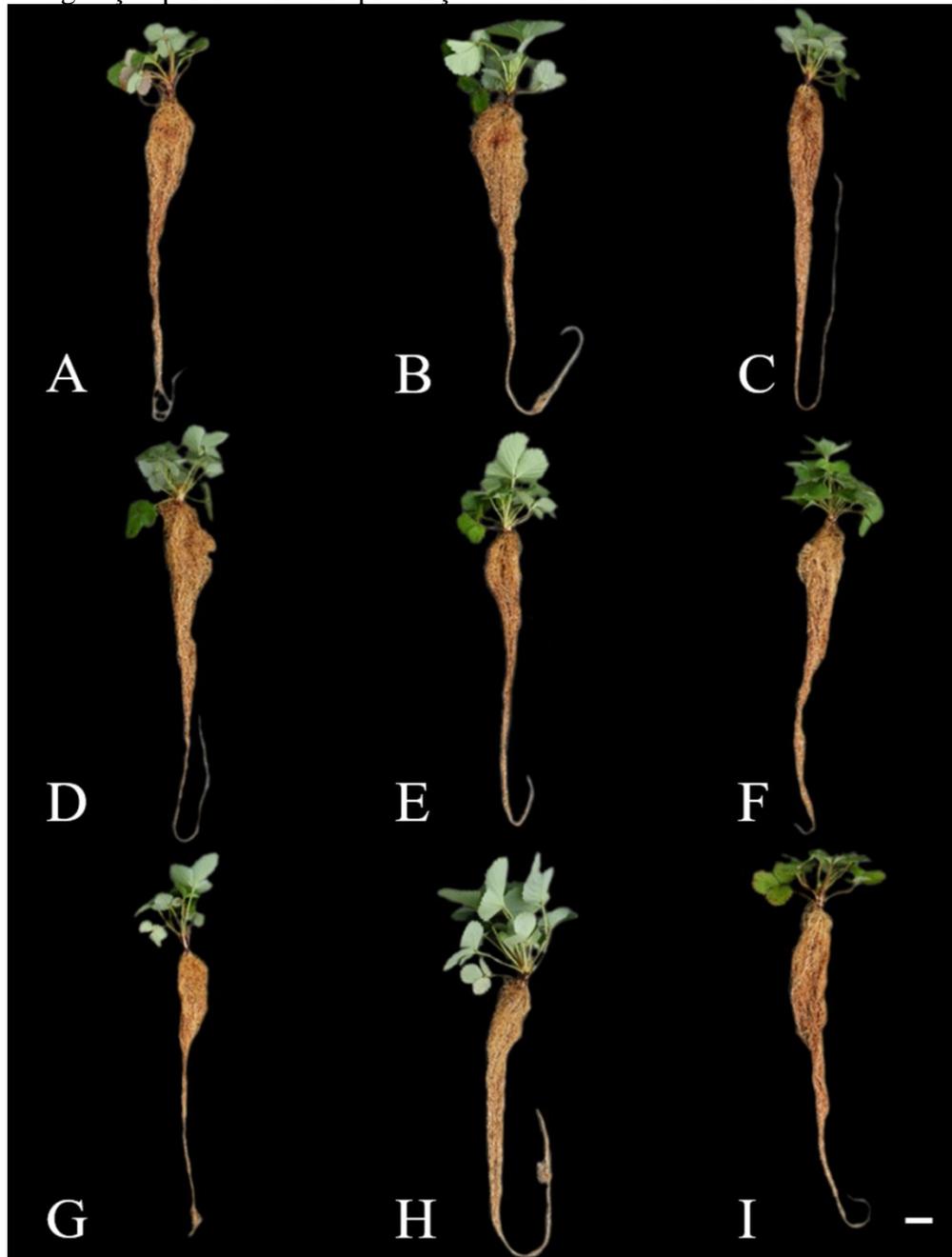


Legenda: Área foliar do morangueiro. A: solução nutritiva reduzida e sem inoculação; B: solução nutritiva completa sem inoculação; C: *Azospirillum brasilense*; D: *Azospirillum brasilense* + ácido húmico; E: *Pantoea ananatis*; F: *Pantoea ananatis* + ácido húmico; G: *Paenibacillus favisporus*; H: *Paenibacillus favisporus* + ácido húmico; I: ácido húmico. Escala 2 cm.

Fonte: Do autor (2020).

No comprimento das raízes, as bactérias *Azospirillum brasilense* com AH e *Pantoea ananatis* apresentaram valores maiores que os outros tratamentos (Figura 1C). As plantas com esses tratamentos tiveram aumento de 22,09% e 14,07, respectivamente. Os tratamentos com os inoculantes *Azospirillum brasilense*, *Paenibacillus favisporus* com AH e AH sem inoculação, apresentaram valores superiores aos controles com solução nutritiva completa e reduzida. Esses resultados podem ser visualizados na Figura 3.

Figura 3 - Crescimento do sistema radicular de morangueiro cv. Pircinque cultivado em casa de vegetação por 100 dias na presença e ausência de bioestimulantes.



Legenda: Sistema radicular. A: solução nutritiva reduzida e sem inoculação; B: solução nutritiva completa sem inoculação; C: *Azospirillum brasilense*; D: *Azospirillum brasilense* + ácido húmico; E: *Pantoea ananatis*; F: *Pantoea ananatis* + ácido húmico; G: *Paenibacillus favisporus*; H: *Paenibacillus favisporus* + ácido húmico; I: ácido húmico. Barra 4 cm.

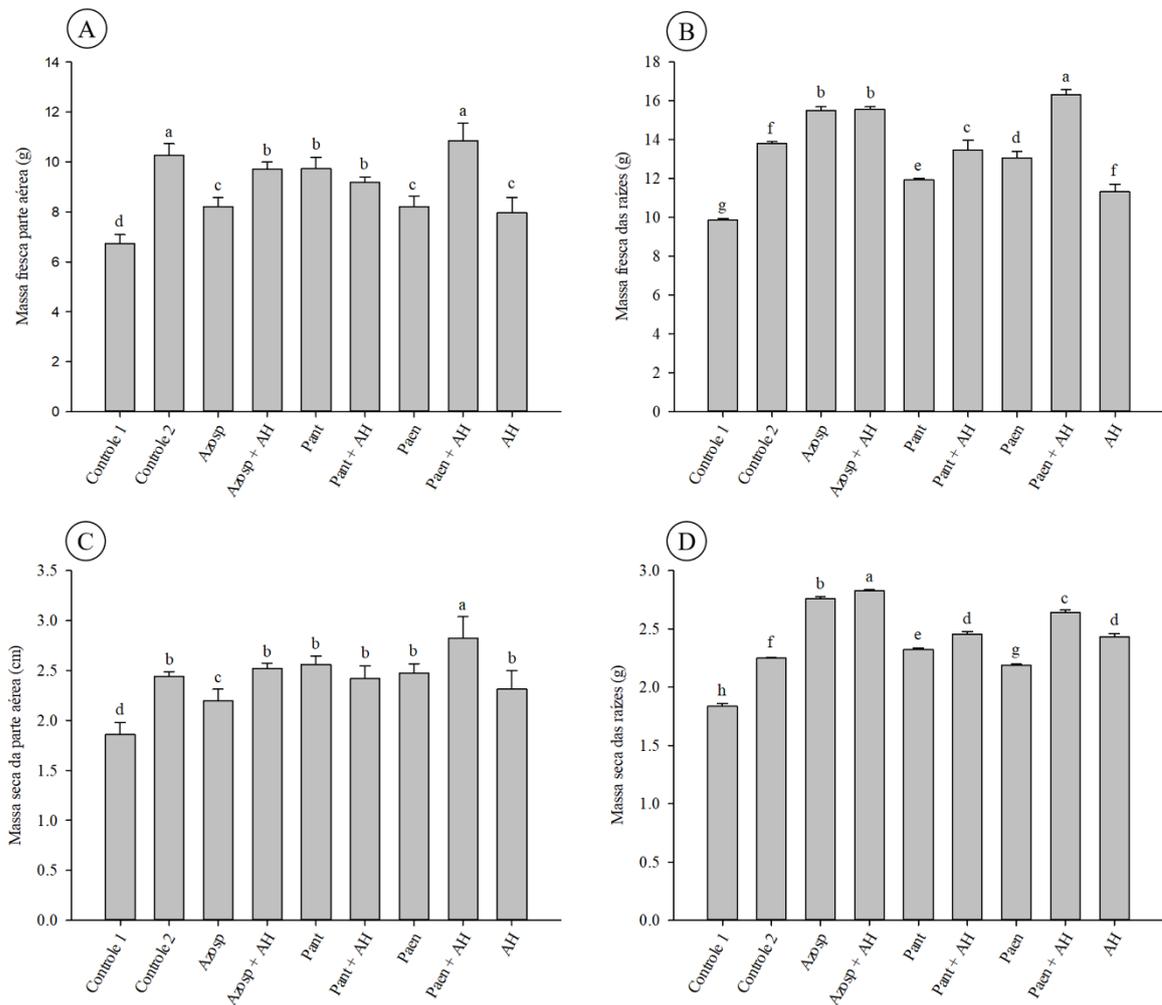
Fonte: Do autor (2020).

No geral, houve efeito significativo da inoculação das bactérias promotoras de crescimento na cultivar de morangueiro Pircinque, ocasionando mudanças no crescimento, tanto do sistema foliar quanto radicular. Nas Figuras 8 e 9, mostram-se o desenvolvimento da

parte aérea das plantas de morangueiro sob diferentes inoculantes bacterianos após, 100 dias de cultivo, em casa de vegetação.

Para a massa fresca da parte aérea, a bactéria *Paenibacillus favisporus* com AH apresentou a maior produção, porém, não diferiu significativamente do tratamento com solução nutritiva completa (FIGURA 4A). Na massa fresca das raízes a bactéria *Paenibacillus favisporus* com AH tiveram valores superiores (FIGURA 4B).

Figura 4 - Massa fresca parte aérea (A), massa fresca das raízes (B), massa seca parte aérea (C) e massa seca das raízes (D) de morangueiro cv. Pirquinque cultivado em casa de vegetação por 100 dias na presença e ausência de bioestimulantes.



Médias representadas pela mesma letra não diferiram, significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

A massa seca da parte aérea foi influenciada significativamente, pelos tratamentos. A maior produção de massa seca foi observada no tratamento com *Paenibacillus favisporus* com AH (Figura 4C). Esse tratamento permitiu aumento de 15,57% na produção da massa seca em

relação ao tratamento com solução nutritiva completa. Os demais tratamentos proporcionaram valores intermediários no aumento da massa seca da parte aérea em plantas, porém, todos os tratamentos diferenciaram-se significativamente do controle com solução nutritiva reduzida e sem inoculação.

O efeito do AH nos inoculantes bacterianos utilizados tiveram efeitos positivos, decorrentes das substâncias reguladoras que induzem o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, por meio da auxina (TREVISAN et al., 2010). O AH estimula a atividade da ATPase na membrana celular, o que auxilia na expansão radicular, aumentando os locais de colonização das BPCPs nas raízes (CANELLAS et al., 2014).

As BPCPs atuam como promotoras de crescimento vegetal de forma direta, por meio de fitormônios (como AIA), solubilização de fosfato, fixação biológica de nitrogênio, também, de forma indireta, diminuindo ou prevenindo os efeitos de organismos patogênicos (GOUDA et al., 2018; LAZAROVITS; NOWAK, 1997). Os inoculantes bacterianos, associados a um hospedeiro, estimulam o surgimento de maior número de raízes, maior densidade e comprimento dos pelos radiculares, melhorando a absorção de nutrientes e água (ERTURK et al., 2012), o que fica evidente nos tratamentos que continham os inoculantes no trabalho.

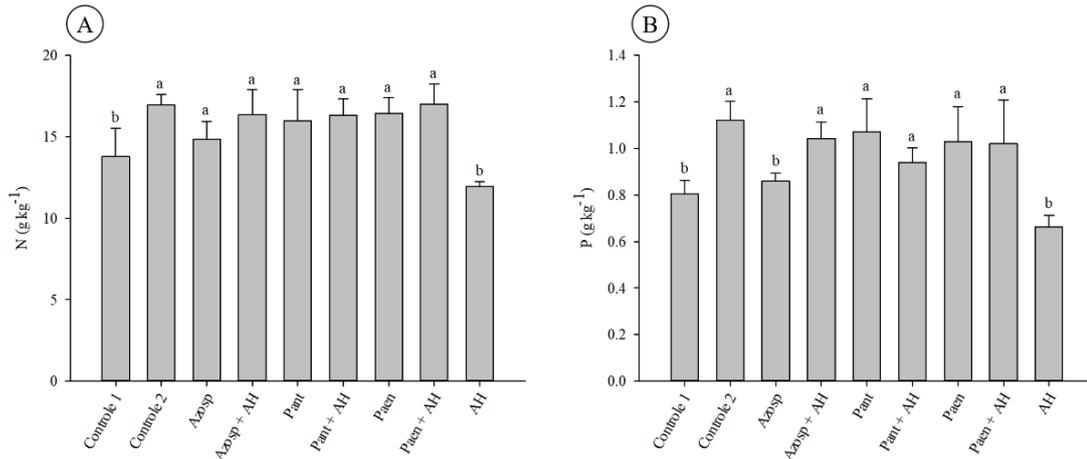
Na massa seca das raízes, o tratamento com *Azospirillum brasilense* com AH (FIGURA 4D), permitiu aumento de 25,89% em comparação com o tratamento com solução nutritiva completa. Em relação ao controle, que tinha 10% de nitrogênio e fósforo, essa bactéria apresentou ganho de 54,09%. Resultado semelhante foi observado por Conceição et al. (2008), verificando que o uso conjunto AH e BPCP estimulou o crescimento vegetal de milho, com ganhos na massa fresca e seca em relação ao controle. Pedraza et al. (2010), trabalhando com morangueiro, observaram que diferentes linhagens de *Azospirillum brasilense* produziram efeitos positivos no crescimento da cultura, expressas nas variáveis comprimento da raiz e massa seca da parte aérea e raiz.

De acordo com Mirza et al. (2001), o aumento do desenvolvimento do sistema radicular ocorre, em razão do acréscimo do reguladores, tornando possível a maior absorção de água e nutrientes, causando aumento de biomassa. As BPCPs são um fator de grande impacto, pois transformam substâncias orgânicas e inorgânicas em nutrientes e os disponibilizam diretamente para as plantas (ERTURK et al., 2012).

O teor de nitrogênio (FIGURA 5A) e fósforo foliar (FIGURA 5B) do morangueiro foi influenciado, significativamente, pelos tratamentos. Para o teor de nitrogênio, maiores valores

foram obtidos a partir da aplicação da solução nutritiva completa, os quais diferiram significativamente do controle com solução nutritiva reduzida e do tratamento com ácido húmico sem inoculação.

Figura 5 - Concentração de nitrogênio (A) e fósforo (B) na parte aérea do morangueiro cv. Pircinque cultivado em casa de vegetação por 100 dias na presença e ausência de bioestimulantes.



Médias representadas pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

Plantas do tratamento com a solução nutritiva completa apresentaram valor de 16,96 g de nitrogênio por kg de planta, ao passo que os tratamentos com *Azospirillum brasilense*, *Pantoea ananatis* e *Paenibacillus favisporus* com e sem associação com AH apresentaram valores, variando entre 14,86 e 17 g de nitrogênio por kg de planta (FIGURA 5A). A aplicação das BPCPs apresentou ganhos entre 7,68% e 23,19% em comparação ao tratamento com solução nutritiva reduzida. Contudo, apesar das BPCP terem sido estatisticamente iguais ao controle completo, nesses tratamentos houve fixação de N em uma forma assimilável pela planta, ou seja, dispensou adubação de N.

As altas concentrações de N nas plantas que foram inoculadas com as BPCP proporcionaram respostas positivas. Esses tratamentos evidenciaram maiores acúmulo de biomassa fresca e seca em relação ao controle reduzido sem inoculação, sendo explicado pelo maior aumento do sistema radicular e, conseqüentemente, maior captação de água e nutrientes. Sá et al. (2019) observaram resultados semelhantes com inoculação de BPCP em capim-zuri, com maior teor de N e maiores valores nas características morfológicas e produtivas.

O maior valor do teor foliar de fósforo (1,12 g) foi obtido na aplicação da solução nutritiva completa (Figura 5B). No entanto, esse tratamento diferenciou-se significativamente do controle com solução nutritiva reduzida, *Azospirillum brasilense* e o que continha somente ácido húmico, apresentando aumento de 40% em relação ao controle com solução nutritiva reduzida.

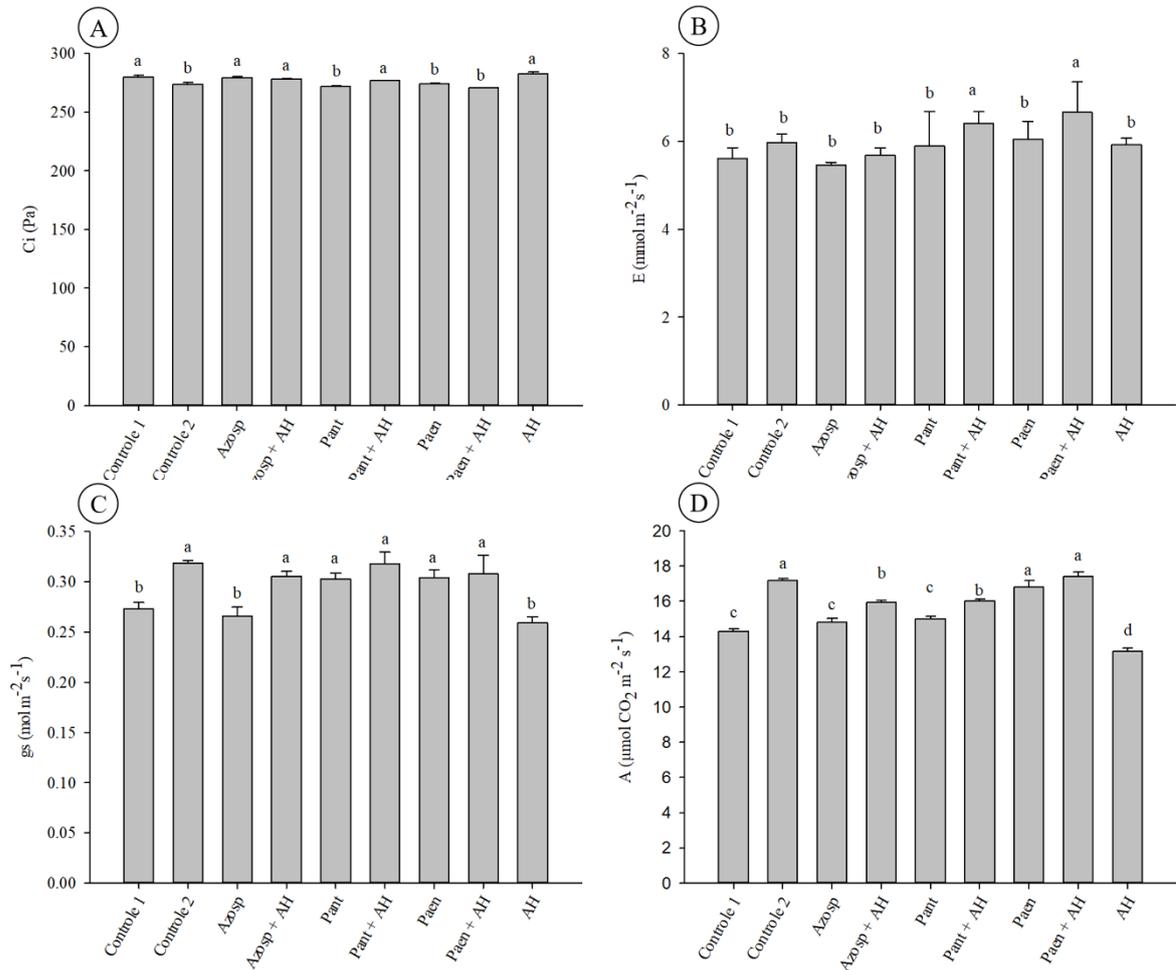
A inoculação do *Pantoea ananatis* permitiu aumento de 33,75% no teor fósforo em relação ao tratamento com solução nutritiva reduzida, apresentando maior acúmulo de fósforo em relação às bactérias promotoras de crescimento. As plantas desse tratamento apresentaram teores de 1,07 g de P por kg de planta e plantas do tratamento com solução nutritiva reduzida apresentaram teores de 0,80 g de P por kg de planta. Entretanto, quase todos os inoculantes bacterianos promoveram maior absorção de fósforo, não tendo sido observadas diferenças significativas entre dados de teor de fósforo em plantas dos tratamentos com inoculação dos inoculantes *Pantoea ananatis* e *Paenibacillus favisporus* com e sem associação com AH e *Azospirillum brasilense* com AH.

Esitken et al. (2010), também relataram aumento na massa seca e no teor de nitrogênio e fósforo foliares da cultura do morango, quando inoculou *Bacillus* e *Pseudomonas* nas plantas. Nesse mesmo trabalho, foi verificado aumento de 53% no teor de fósforo foliar. Ao inocular bactéria do gênero *Pantoea* em amendoim, Taurian et al. (2010) observaram aumento na biomassa das plantas, mostrando-se como um inoculante promissor.

Estudando a mesma cultura, Andrade et al. (2019) observaram que a inoculação de *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Enterobacter* em combinação com 50% da necessidade de nitrogênio resultaram nas melhores respostas de comprimento e massa seca de raízes, obtendo aumento de 96% da massa seca da plantas de morangueiro quando comparado com o controle que continha 50% da necessidade em nitrogênio da cultura.

Os inoculantes bacterianos utilizados ocasionaram mudanças fisiológicas nas plantas (FIGURA 6). A taxa de carbono interno (Ci) apresentou valores mais altos nos tratamentos com *Azospirillum brasilense* sem e com associação com AH, *Pantoea ananatis* associado com AH, na solução nutritiva reduzida sem inoculação e no meio que tinha somente AH (FIGURA 6A). Todos os outros tratamentos não diferiram significativamente entre si. Maior concentração de Ci está relacionada à maior capacidade de carboxilação pelas plantas, o que pode influenciar no aumento da taxa fotossintética.

Figura 6 - (A) Carbono interno (Ci); (B) transpiração (E); (C) condutância estomática (gs) e (D) fotossíntese (A) de morango cv. Pircinque cultivado em casa de vegetação por 100 dias na presença e ausência de bioestimulantes.



Médias representadas pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

Os maiores valores para taxa de transpiração foram observados em tratamentos com inoculação de *Pantoea ananatis* com AH e *Paenibacillus favisporus* com AH. Esses tratamentos induziram aumento de 14,26% e 18,53% na taxa de transpiração, respectivamente. Já, os outros tratamentos não diferiram, significativamente, entre si (FIGURA 6B).

Maiores valores de condutância estomática (gs) foram encontrados nos tratamentos com a solução nutritiva completa, *Azospirillum brasilense* com AH, *Pantoea ananatis* com AH e *Paenibacillus favisporus* sem e com AH (FIGURA 6C). O aumento da taxa de transpiração e condutância estomática também foi induzido pela inoculação de bactérias promotoras de crescimento em trabalho de Morais et al. (2019), estudando a cultura do morango. Os

autores relataram que houve tendência de aumento da altura das plantas com os tratamentos de inoculação.

A queda na taxa de transpiração em plantas que receberam solução nutritiva reduzida e nos inoculantes bacterianos menos eficientes para a promoção de crescimento está interligado aos menores valores encontrados na condutância estomática, pois reflete no fechamento dos estômatos para diminuir a transpiração para evitar perda de água (ALBUQUERQUE et al., 2013). Neste trabalho, tratamentos que induziram o crescimento de plantas também permitiram maiores valores de taxa de crescimento e, conseqüentemente, valores mais elevados da condutância estomática (FIGURA 6B).

A taxa de fotossintética (A) foi influenciada significativamente pelos tratamentos. Maiores valores para essa variável foram observados em tratamentos com os inoculantes bacterianos *Paenibacillus favisporus* sem e com ácido húmico e no controle com a solução nutritiva completa. Já, os tratamentos com *Azospirillum brasilense*, *Pantoea ananatis* com AH apresentaram valores intermediários para esse parâmetro (FIGURA 6D).

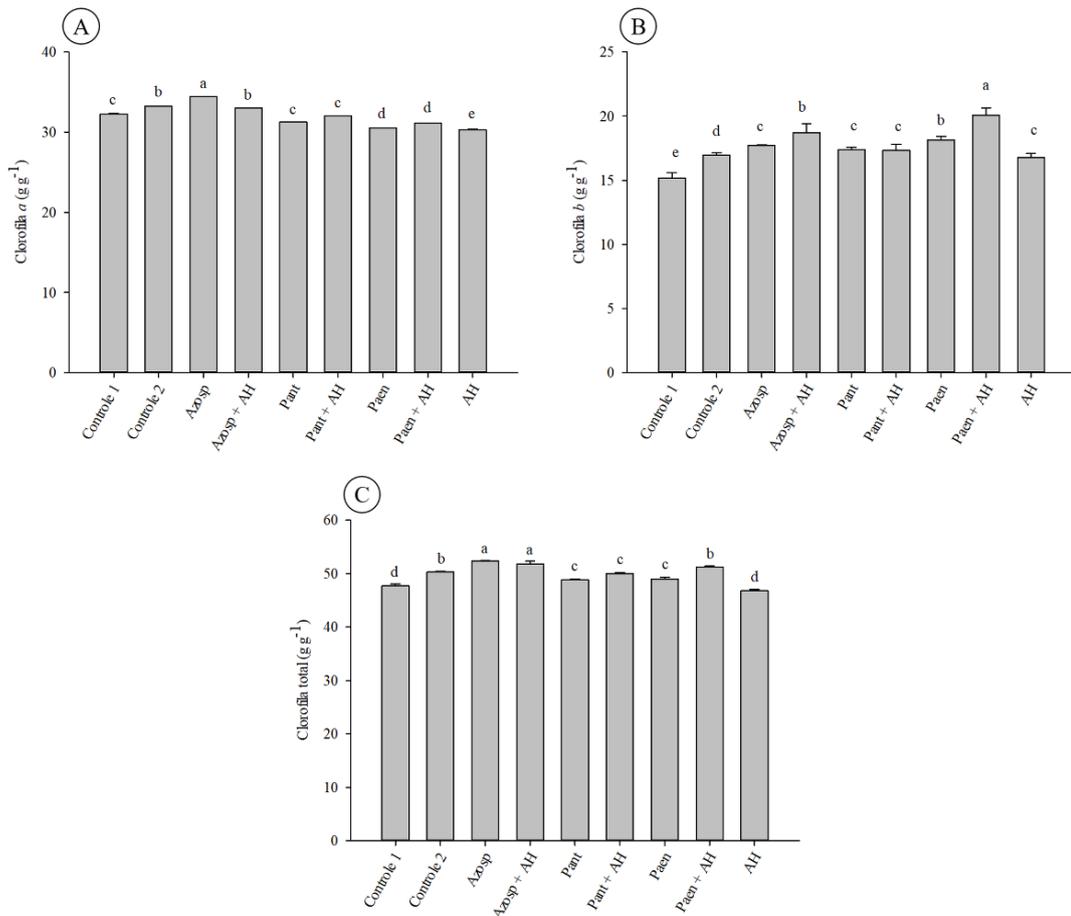
O aumento na gs das plantas em resposta às BPCPs influencia, diretamente, nos parâmetros C_i , A e E. A abertura estomática está relacionada ao aumento na capacidade de trocas gasosas, no influxo de CO_2 para o interior da planta, aumentando os níveis de C_i , e no efluxo de H_2O para o ambiente externo, contribuindo para maiores taxas transpiratórias. Esses resultados mostraram aumento na biomassa da parte aérea e das raízes, principalmente quando inoculado com *Paenibacillus favisporus* com AH em comparação ao controle com solução nutritiva reduzida e sem inoculação, em decorrência da maior atividade fotossintética exibida por essas plantas (FIGURA 6D).

Morais et al. (2019) relataram que a inoculação com BPCP, em comparação com as plantas não inoculadas, apresentaram maior atividade fotossintética nas plantas de morangueiro, conseqüentemente, maior crescimento, sendo um fator importante em ambientes de recursos limitados. Samaniego-Gómez et al. (2016), trabalhando com pimenta, observaram incremento na capacidade fotossintética com BPCP, aumentando os valores dos teores de clorofila. Entretanto, os autores relataram valores inferiores de transpiração e condutância estomática em relação ao controle, diferente do que foi observado no presente trabalho.

Os teores de clorofila (FIGURA 7) também foram influenciados, significativamente, pelos tratamentos. Para a clorofila *a* (FIGURA 7A), maiores valores foram obtidos no tratamento com o inoculante *Azospirillum brasilense* sem ácido húmico, sendo,

significativamente, diferente dos outros tratamentos. Para a clorofila *b* (Figura 7B), o tratamento com *Paenibacillus favisporus* com ácido húmico foi diferente, significativamente, em relação aos outros tratamentos, tendo um ganho de 32,06% em comparação com o tratamento controle de solução nutritiva reduzida.

Figura 7 - Clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e clorofila total (C) de morangueiro cv. Pirquinque cultivado em casa de vegetação por 100 dias na presença e ausência de bioestimulantes.



Médias representadas pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

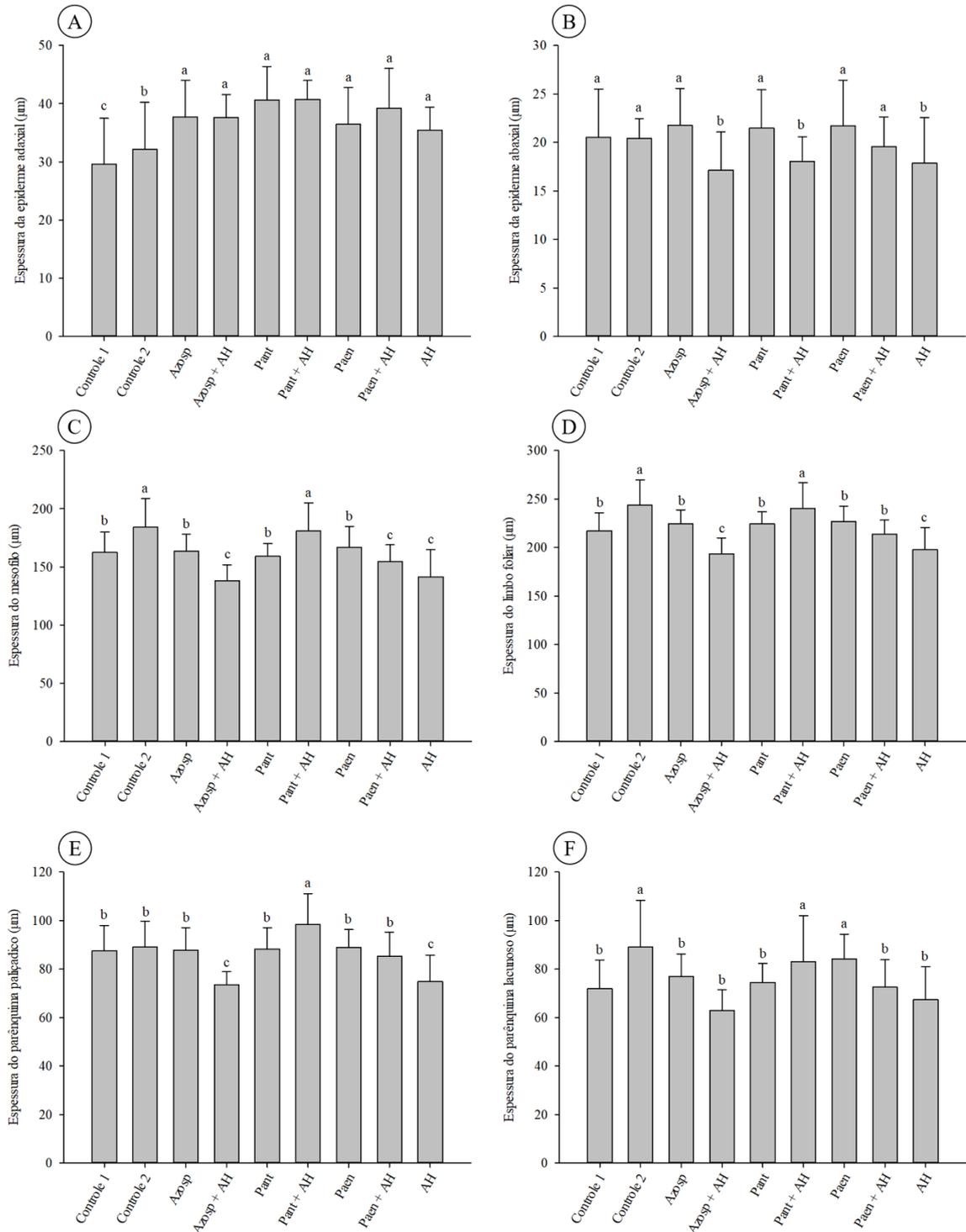
Referente à clorofila total (FIGURA 7C), maiores valores foram obtidos nos tratamentos com *Azospirillum brasilense* com e sem AH com ganho de 9,91% e 8,84%, respectivamente. Os outros isolados apresentaram valores intermediários para essa variável e todos foram significativamente diferentes do tratamento controle com solução nutritiva reduzida e o tratamento com AH sem inoculação.

Com relação ao maior teor de clorofila, o nitrogênio disponível poderia ter sido utilizado para a síntese de clorofila, o que poderia exemplificar as diferenças entre os teores de clorofila das plantas inoculadas e controle com adubação reduzida. Resultados semelhantes foram observados por Naveed et al. (2014) e Cohen et al. (2015). Além disso, em relação ao *Azospirillum*, diversos trabalhos confirmam sua capacidade em aumentar significativamente os teores de clorofila e outros pigmentos fotossintetizantes (CURÁ et al., 2017; FASCIGLIONE et al., 2015; QUADROS et al., 2014; ZAREA et al., 2012).

Nas características anatômicas, os inoculantes bacterianos aumentaram, significativamente, a espessura das epidermes adaxial e abaxial do morangueiro (FIGURA 8A e 8B). O inoculante *Pantoea ananatis* com e sem associação com AH induziu aumento mais expressivo na epiderme adaxial, porém, com diferença significativa somente dos controles com adubação completa e reduzida. Para a epiderme abaxial, os inoculantes *Azospirillum brasilense*, *Pantoea ananatis*, *Paenibacillus favisporus* sem e com associação com AH e os controles completo e reduzido tiveram os melhores resultados.

As plantas de morangueiro inoculadas com as BPCPs, apresentaram maiores espessuras da epiderme em relação aos controles. Logo, como a epiderme tem papel protetor, essas plantas poderão demonstrar maior resistência ao estresse biótico e abiótico (LARRABURU et al., 2016).

Figura 8 - Espessura da epiderme adaxial (A), espessura da epiderme abaxial (B), espessura do mesofilo (C), espessura do limbo foliar (D), espessura do parênquima paliçádico (E) e espessura do parênquima lacunoso (F) de morangueiro cv. Pircinque cultivado em casa de vegetação por 100 dias na presença e ausência de bioestimulantes.



Médias representadas pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

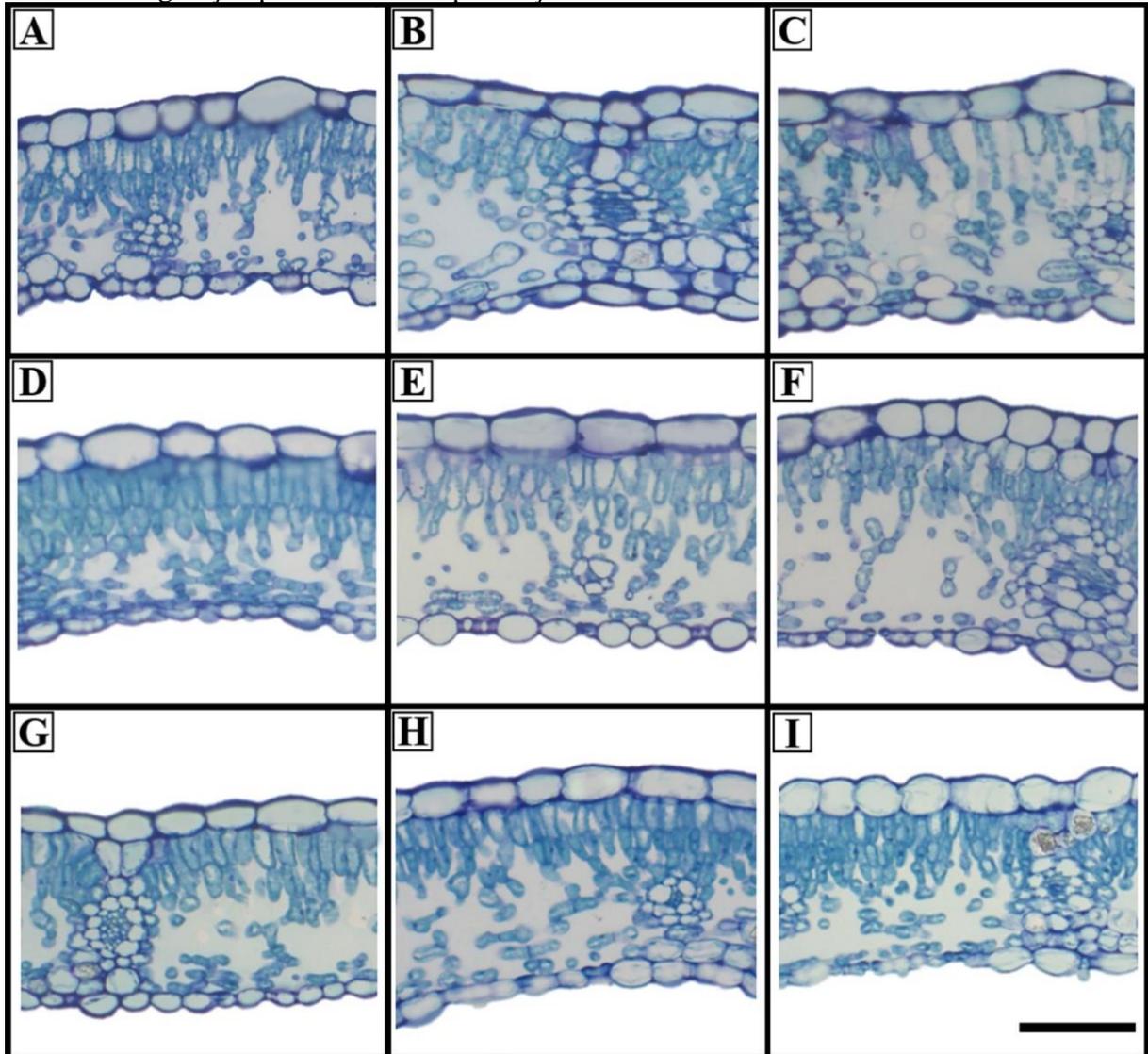
A inoculação de *Pantoea ananatis* com AH, assim como a aplicação da solução nutritiva completa, aumentou, significativamente, a espessura do mesofilo e do limbo foliar do morangueiro. Esses tratamentos induziram aumento de 10,61% e 12,25% para o mesofilo e 11,11% e 13,21% no limbo foliar, respectivamente. Outros isolados induziram valores intermediários para essas variáveis, não sendo significativamente diferentes dos valores observados no tratamento com adubação reduzida e sem inoculação. O tratamento com *Azospirillum brasilense* com AH levou à diminuição nas espessuras do mesofilo e do limbo foliar, sendo menores que os observados no tratamento com adubação reduzida e sem inoculação (FIGURA 8C e 8D).

Os tratamentos apresentaram efeito significativo sobre a espessura dos parênquimas paliçádico e lacunoso. Maiores valores para a primeira variável foram observados com o inoculante bacteriano *Pantoea ananatis* mais AH (98,44 μm), para a segunda variável, com a inoculação *Pantoea ananatis* com AH, *Paenibacillus favisporus* e controle com solução nutritiva completa (82,91 μm , 84,15 μm e 89 μm , respectivamente) (FIGURA 8E e 8F).

No que tange à variável espessura do parênquima paliçádico, o *Azospirillum brasilense* com AH e tratamento com AH sem inoculação apresentaram diminuição na espessura em comparação com o observado no tratamento com solução nutritiva reduzida e sem inoculação. Para a espessura do parênquima lacunoso, todos os demais tratamentos não induziram efeito diferente ao observado com o tratamento com adubação reduzida. No geral, houve efeito da aplicação dos bioestimulantes no crescimento da cultivar de morangueiro Pircinque, ocasionando mudanças na anatomia foliar após 100 dias de cultivo em casa de vegetação (FIGURA 9).

No crescimento das plantas, fitormônios controlam os parâmetros e modelam os aspectos das plantas (FERREIRA et al., 2019), desempenhando papel essencial na promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas em geral. Nesse cenário, diferenças observadas na anatomia foliar do trabalho, provavelmente, estão relacionadas às alterações hormonais induzidas pelas bactérias (LARRABURU et al., 2010). Reis Junior et al. (2004), trabalhando com diferentes inoculantes bacterianos, constataram que os mesmos foram capazes de produzir fitormônio AIA.

Figura 9 - Cortes transversais de folhas de morangueiro cv. Pircinque cultivado em casa de vegetação por 100 dias na presença e ausência de bioestimulantes.



Legenda: Corte transversal. A: solução nutritiva reduzida e sem inoculação; B: solução nutritiva completa sem inoculação; C: *Azospirillum brasilense*; D: *Azospirillum brasilense* + ácido húmico; E: *Pantoea ananatis*; F: *Pantoea ananatis* + ácido húmico; G: *Paenibacillus favisporus*; H: *Paenibacillus favisporus* + ácido húmico; I: ácido húmico. Escala 100µm.

Fonte: Do autor (2020).

O aumento da espessura do parênquima paliçádico tem sido correlacionado com a divisão celular das bactérias dentro das plantas que varia do inoculante bacteriano (LARRABURU et al., 2010). A maior espessura do parênquima após inoculação de PGPB pode estar relacionada à indução da fotossíntese nessas plantas e por esse tecido ser um tecido de reserva (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os resultados mostraram que é possível combinar os inoculantes bacterianos com AH, obtendo melhores respostas que na aplicação isolada de ambas. As BPCPs, uma vez associados

ao hospedeiro, estimulam o sistema radicular, aumentando o tamanho e número de raízes laterais, ampliando a aérea de superfície de contato das raízes (MELO et al., 2018). Dessa forma, o uso de bioestimulantes é um mecanismo decisivo e complementar em comparação com os insumos geralmente usados no morangueiro.

4 CONCLUSÕES

Bioestimulantes à base de BPCP e AH quando associados no cultivo do morangueiro, apresentaram efeitos significativos sobre o crescimento vegetal, anatomia foliar, nutricionais e fisiológica da cultura. Os inoculantes bacterianos *Pantoea ananatis* e *Paenibacillus favisporus* induziram resultados promissores para a maioria das variáveis analisadas neste trabalho, aumentando o desempenho inicial do morangueiro.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M.P.F. et al. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno-africano submetidas a deficit hídrico e reidratação. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 48, n. 1, p. 9-16, 2013.
- ANDRADE, F.M. et al. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v. 223-225, p. 120-128, 2019.
- BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol science and technology**, v. 11, n. 5, p. 557-574, 2001.
- BHATTACHARYYA, P.N.; JHA., D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.
- BONA, E. et al. Combined bacterial and mycorrhizal inocula improve tomato quality at reduced fertilization. **Scientia Horticulturae**, v. 234, p. 160-165, 2018.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. e0174576, 2017.
- 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. 3, 2014.
- CHANDRA, D. et al. Field performance of bacterial inoculants to alleviate water stress effects in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Soil**, v. 441, n. 1-2, p. 261-281, 2019.
- CHANRATANA, M. et al. Physiological response of tomato plant to chitosan-immobilized aggregated *Methylobacterium oryzae* CBMB20 inoculation under salinity stress. **3 Biotech**, v. 9, n. 11, p. 397, 2019.
- COHEN, A.C. et al. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Physiologia plantarum**, v. 153, n. 1, p. 79-90, 2015.
- CONCEIÇÃO, P.M.D. et al. Corn seed coating with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 545-548, 2008.
- CURÁ, J. et al. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017.
- DOGRA, N. et al. Nutrient enhancement of chickpea grown with plant growth promoting bacteria in local soil of Bathinda, Northwestern India. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, n. 5, p. 1251-1259, 2019.

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

ERDOGAN, U. et al. Effects of Root Plant Growth Promoting Rhizobacteria Inoculations on the Growth and Nutrient Content of Grapevine. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 49, n. 14, p. 1731-1738, 2018.

ERTURK, Y.; ERCISLI, S.; CAKMAKCI, R. Yield and growth response of strawberry to plant growth-promoting rhizobacteria inoculation. **Journal of plant nutrition**, v. 35, n. 6, p. 817-826, 2012.

ESITKEN, A. et al. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 1, p. 62-66, 2010.

FASCIGLIONE, G. et al. *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 154-162, 2015.

FERREIRA, C.M.; SOARES, H.M.; SOARES, E.V. Promising bacterial genera for agricultural practices: an insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **Science of The Total Environment**. v. 682, p. 779-799, 2019.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian journal of microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.

GONZÁLEZ, A.H. **Promoção do crescimento de leguminosas herbáceas utilizando rizóbios isolados de áreas de mineração de carvão**. 2015. 105 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

GOUDA, S. et al. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131-140, 2018.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **California agricultural experiment station**, 1950. 347p (Documentos).

KARLIDAG, H.; ESITKEN, A.; TURAN, M.; SAHIN, F. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. **Scientia Horticulturae**, v. 114, n. 1, p. 16-20, 2007.

LARRABURU, E.E.; APÓSTOLO, N.M.; LLORENTE, B.E. Anatomy and morphology of photinia (*Photinia* × *fraseri* Dress) *in vitro* plants inoculated with rhizobacteria. **Trees**, v. 24, n. 4, p. 635-642, 2010.

LARRABURU, E.E.; BUSUSCOVICH, A.C.; LLORENTE, B.E. *Azospirillum brasilense* improves *in vitro* and *ex vitro* rooting-acclimatization of jojoba. **Scientia Horticulturae**, v. 209, p. 139-147, 2016.

LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **HortScience**, v. 32, n. 2, p. 188-192, 1997.

LOIRET, F. et al. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of applied microbiology**, v. 97, n. 3, p. 504-511, 2004.

LOVAISA, N.C. et al. Response of strawberry plants inoculated with *Azospirillum* and *Burkholderia* at field conditions. **Revista Agronómica del Noroeste Argentino**. v. 35, n. 1, p. 33-36, 2015.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S.D. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Potassa e do Fósforo, 1997. 319 p.

MARRA, L.M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and soil**, v. 357, n. 1-2, p. 289-307, 2012.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.

MELO, R.O.D. Initial performance of maize in response to humic acids and plant growth-promoting bacteria. **Revista Ceres**, v. 65, p. 271-277, 2018.

MIRZA, M.S. et al. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and Soil**, v. 237, n. 1, p. 47-54, 2001.

MORAIS, M.C. et al. Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 12, p. 5341-5349, 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAVEED, M. et al. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 30-39, 2014.

OLIVEIRA, H.P. et al. Performance of pre-sprouted sugarcane seedlings in response to the application of humic acid and plant growth-promoting bacteria. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, p. 1365-1370, 2018.

ORTEGA, E.; ELVIA, J.C.; ORTEGA-RODÉS, P. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 10, n. 1, p. 111-121, 2008.

- PEDRAZA, R.O. et al. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 265-272, 2010.
- PREMACHANDRA, D.; HUDEK, L.; BRAU, L. Bacterial modes of action for enhancing of plant growth. **Journal of Biotechnology & biomaterials**, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2016.
- QUADROS, P.D.D. et al. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209-218, 2014.
- REIS JUNIOR, F.B. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 103-113, 2004.
- RODRIGUES, L.F.O.S. et al. Características agrônômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 31-37, 2014.
- RSTUDIO TEAM. (2016). RStudio: Integrated development for R [Computer software]. Boston, MA: RStudio, Inc. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>
- SÁ, G.C. et al. Nutrients Uptake in Shoots and Biomass Yields and Roots and Nutritive Value of Zuri Guinea Grass Inoculated with Plant Growth-promoting Bacteria. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 50, n. 22, p. 2927-2940, 2019.
- SALAMONE, I.G. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the 15 N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, n. 3, p. 249-256, 1996.
- SAMANIEGO-GÁMEZ, B.Y. et al. *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, p. 409-416, 2016.
- SERRET-LÓPEZ, M. et al. Tolerancia de plantas de fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) premicorrizadas con Rhizophagus intraradices e inoculadas con PGPR'sa *Phytophthora capsici*. **Agrociencia**, v. 50, n. 8, p. 1107-1121, 2016.
- SINGH, O. et al. Novel phosphate solubilizing bacteria '*Pantoea cyripedii* PS1' along with *Enterobacter aerogenes* PS16 and *Rhizobium ciceri* enhance the growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant growth regulation**, v. 73, n. 1, p. 79-89, 2014.
- SYSTAT SOFTWARE Inc. **Sigmaplot for Windows, version 13**. 2006. Disponível em: <http://www.systat.com/products/sigmaplot/>.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TAURIAN, T. et al. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, v. 329, n. 1-2, p. 421-431, 2010.

TOMIC, J.M.; MILIVOJEVIC, J.M.; PESAKOVIC, M.I. The response to bacterial inoculation is cultivar-related in strawberries. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 39, n. 2, p. 332-341, 2015.

TREVISAN, S. et al. 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, n. 4, p. 604-614, 2010.

ZAREA, M. et al. Effect of Piriformospora indica and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p. 139-146, 2012.

ARTIGO 2 - Frequência de aplicação de *Azospirillum brasilense* no crescimento do morangueiro

RESUMO

O uso de bactérias promotoras de crescimento tem se destacado, em razão do seu potencial na redução de uso de fertilizantes usados na produção e por estimular o crescimento das plantas, por meio da síntese de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e controle biológico de fitopatógenos. Assim, a utilização do inoculante *Azospirillum brasilense* pode-se tornar uma alternativa à aplicação de insumos agrícolas. Além de ser o mais estudado, esse inoculante tem a capacidade de promover o crescimento das plantas. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a frequência de aplicação de *Azospirillum brasilense* via solo no cultivo do morangueiro, aferindo características fitotécnicas, fisiológicas, nutricionais e anatômicas. Mudanças de morangueiro cv. Pircinque provenientes do cultivo *in vitro* foram aclimatizadas, transplantadas para vasos e mantidas em casa de vegetação. No ensaio, foram utilizados cinco tratamentos, constituídos de: T1) inoculação única; T2) inoculação de 15 em 15 dias; T3) inoculação de 30 em 30 dias; T4) controle com solução nutritiva completa sem inoculação e T5) controle com solução nutritiva reduzida sem inoculação. A aplicação dos controles foi realizada a cada 15 dias com solução nutritiva. Plantas de morangueiro com inoculações mais frequentes do inoculante bacteriano mostraram-se, nitidamente, superiores aos controles. Sendo assim, conclui-se que a inoculação de *Azospirillum brasilense* de 15 em 15 dias no morangueiro tem efeitos significativos sobre as características fitotécnicas, fisiológicas e na epiderme adaxial. No tratamento com uma única aplicação do inoculante induziu resultados promissores no comprimento das raízes e biomassa da massa seca das raízes.

Palavras-Chave: *Fragaria x ananassa* Duch. Bactérias promotoras de crescimento de plantas. Fotossíntese. Anatomia foliar.

Frequency of application of *Azospirillum brasilense* on strawberry growth

ABSTRACT

The use of growth promoting bacteria have received special attention because of its potential in fertilizer use reduction used in production and to stimulate plant growth by means of phytohormones synthesis, nitrogen fixation, phosphate solubilization and biological control phytopathogens. Thus, the use of the inoculant *Azospirillum brasilense* can become an alternative to the application of agricultural inputs. In addition to being the most studied, this inoculant has the ability to promote plant growth. In view of the above, the objective was to evaluate the frequency of application of *Azospirillum brasilense* via soil in strawberry cultivation, assessing phytotechnical, physiological, nutritional and anatomical characteristics. Strawberry seedlings cv. Pircinque from *in vitro* cultivation were acclimatized, transplanted into pots and kept in a greenhouse. In the trial, five treatments were used, consisting of: T1) single inoculation; T2) inoculation every 15 days; T3) inoculation every 30 days; T4) control

with complete nutrient solution without inoculation and T5) control with reduced nutrient solution without inoculation. The controls were applied every 15 days with nutrient solution. Strawberry plants with more frequent inoculations of the bacterial inoculant were clearly superior to the controls. Thus, it is concluded that the inoculation of *Azospirillum brasilense* every 15 days in strawberry has significant effects on the phytotechnical, physiological and adaxial epidermis characteristics. In the treatment with a single application of the inoculant it induced promising results in the length of the roots and biomass of the dry mass of the roots.

Keywords: *Fragaria ananassa* Duch. Plant growth promoting bacteria. Photosynthesis. Leaf anatomy.

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria × ananassa* Duch) é uma cultura perene (GUERRERO-MOLINA et al., 2012) com grande aceitação no mercado e cultivada em diferentes partes do mundo. No entanto, na maioria dos países produtores, o cultivo ocorre com uso intensivo de agroquímicos, que, embora contribuam para altas produções, ocasiona vários impactos ao meio ambiente (DELAPORTE-QUINTANA et al., 2017).

Em diversos países, as práticas agrícolas são controladas, especialmente, por produtos químicos sintéticos. O uso contínuo desses produtos acarreta grandes impactos ao solo, ao meio ambiente e à saúde humana (NAIK et al., 2019). Logo, a procura por uma abordagem mais sustentável e ambientalmente correta com altas produtividades e com retorno econômico para os produtores das culturas agrícolas, torna-se necessária (MORAES SÁ et al., 2017).

Nesse contexto, o uso de inoculantes bacterianos torna-se uma alternativa para suprir as necessidades nutricionais das culturas agrícolas, permitindo a diminuição do uso de produtos químicos, como fertilizantes (ANDRADE et al., 2019). As bactérias promotoras de crescimento têm sido cada vez mais usadas para promover o crescimento das plantas, por meio de mecanismos que melhoram a absorção de fósforo, fixação de nitrogênio e produção de fitormônios (NADEEM et al., 2014). As bactérias promotoras de crescimento vegetal também apresentam capacidade de realizar interações com plantas de forma harmônica, exercendo funções de induzir mecanismos de defesa nas plantas (FUKAMI et al., 2018).

Dentre as bactérias promotoras de crescimento, a mais estudada e usada é a *Azospirillum*, que tem capacidade enorme de beneficiar grandes variedades de espécies vegetais, resultando em maior rendimento final em comparação com tratamentos não

inoculados (LARRABURU et al., 2016; RUÍZ-SÁNCHEZ et al., 2011; TORTORA et al., 2012). Os benefícios da inoculação com *Azospirillum* são atribuídos, principalmente, por sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, mas também por sintetizar fitormônios, em particular o ácido indol-3-acético (FUKAMI et al., 2018; LARRABURU et al., 2016; SANTOS et al., 2019).

O *Azospirillum* é um microrganismo que existe, naturalmente, na maior parte dos solos (QUADROS et al., 2014). Apesar disso, apresenta baixa capacidade de sobrevivência por períodos prolongados, na maioria dos solos e alterações nas condições físico-químicas do solo e remoção das plantas afetam rapidamente seus níveis populacionais (BASHAN E DE-BASHAN, 1995).

Contudo, a inoculação dessa bactéria promotora de crescimento contribui de forma direta, fornecendo alterações morfológicas, fisiológicas e aumento da produtividade das culturas, com isso, melhorando o uso de recursos de produção, com amplos benefícios para o meio ambiente (CASSÁN et al., 2016). Com base nesse contexto, o uso das bactérias promotoras de crescimento como o inoculante *Azospirillum brasilense* está em constante crescimento nos últimos anos, em razão dos maiores custos de fertilizantes químicos e a ênfase na agricultura sustentável.

Dessa forma, objetivou-se avaliar a frequência de aplicação de *Azospirillum brasilense* via solo, no cultivo do morangueiro, aferindo características fitotécnicas, fisiológicas, nutricionais e anatômicas, a fim de se obter a frequência correta de aplicação do inoculante na cultura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e descrição do ambiente de cultivo

O experimento foi conduzido no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG. O município está situado a 21°14'06" S e 45°00'00" W e altitude média de 918 m. Foi conduzido sobre sistema de bancada em casa de vegetação, no período de junho a outubro de 2018.

Mudas de morangueiro da cultivar Pircinque foram cedidas pela Universidade Federal do Estado de Santa Catarina (UDESC). Foram cultivadas *in vitro*, em meio MS (Murashige et

al., 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8. As mudas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de cerca de 40 μmol m⁻² s⁻¹. Após quatro semanas de cultivo as mudas provenientes de cultivo *in vitro* foram aclimatizadas em substrato Tropstrato[®] por 20 dias. As mudas aclimatizadas foram transplantadas no dia 11 de julho de 2018 para vasos com volume de 5 L, contendo latossolo vermelho, sendo adicionado 20 g de lithothamnium por vaso.

O solo utilizado foi coletado dentro da UFLA. A caracterização química do solo apresentou pH = 5,4; P = 0,47 mg dm⁻³; K = 2,55 mg dm⁻³; Ca = 0,27 cmolc dm⁻³; Mg = 0,10 cmolc dm⁻³; Al = 0,04 cmolc dm⁻³; t = 0,42 cmolc dm⁻³; T = 1,92 cmolc dm⁻³; Saturação de alumínio = 9,52%; Saturação por base = 19,61%; Matéria orgânica = 0,73 dag kg⁻¹; Cu = 1,41 mg dm⁻³; Fe = 29,89 mg dm⁻³; Mn = 2,06 mg dm⁻³; e Zn = 0,47 mg dm⁻³. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, cobertas com filme de polietileno transparente (150 microns), sombrite 70% e irrigadas diariamente.

2.2 Microrganismo e produção de inóculo

A bactéria utilizada no ensaio foi cedida pela Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA/UFLA) do Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Biologia, da UFLA. No ensaio, foi utilizada a bactéria *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) já descrita na literatura como bactéria promotora de crescimento vegetal. A bactéria foi cultivada em meio ágar-nutriente, composto de 3 g L⁻¹ de extrato de carne, 5 g L⁻¹ de peptona e 15 g L⁻¹ de ágar. O inóculo bacteriano foi previamente preparado em meio caldo nutriente a 30°C, sob agitação orbital constante a 120 rpm, durante 48 horas. Em seguida, a concentração celular foi ajustada para 1 x 10⁸ células/mL (densidade óptica de 0,5 e comprimento de onda de 600 nm mensurada em espectrofotômetro). A quantidade de caldo nutriente com inóculo foi de 10 mL.

Azospirillum brasilense foi avaliado quanto a sua capacidade de promoção de crescimento vegetal em morangueiro, a partir de ensaios conduzidos em casa de vegetação. A primeira inoculação foi realizada no dia 26 de junho de 2018 e a última no dia 18 de setembro de 2018. O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições (duas plantas por parcela) e 5 tratamentos: T1) inoculação única; T2) inoculação de 15 em 15 dias; T3) inoculação de 30 em 30 dias; T4) controle com solução nutritiva completa sem inoculação e T5) controle

com solução nutritiva reduzida sem inoculação. A aplicação dos controles foi realizada a cada 15 dias com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) nos controles (completa e com níveis de nitrogênio e fósforo a 10%), na quantidade de 50 ml por vaso. A solução completa de Hoagland et al. (1950) utilizada no tratamento sem inoculação + adubação completa continha 1 mL L⁻¹ de KH₂PO₄ (1 mol L⁻¹), 5 mL L⁻¹ KNO₃ (1 mol L⁻¹), 5 mL L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ (1 mol L⁻¹), 2 mL L⁻¹ de MgSO₄ (1 mol L⁻¹), 1 mL de solução de micronutrientes (2,86 g L⁻¹ de H₃BO₃, 1,81 g L⁻¹ MnCl₂, 0,22 g L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O, 0,08 g L⁻¹ de NaMoO₄.4H₂O) e 1 mL de Fe-EDTA (24,1 g L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 25,1 g L⁻¹ de EDTA). A composição da solução com baixa adição de nitrogênio e fósforo (10% da necessidade total) consistiu na substituição de KH₂PO₄, KNO₃ e Ca(NO₃)₂ por 5,9 mL de KCl (1 mol L⁻¹), 5 mL de CaCl₂ (1 mol L⁻¹), 0,1 mL L⁻¹ de KH₂PO₄ (1 mol L⁻¹) e 1 mL L⁻¹ de NH₄NO₃ (1,5 mol L⁻¹) (GONZÁLEZ, 2015).

Aos 105 dias de instalação do experimento, foram realizadas nas mudas de morangueiro análises de crescimento, análises nutricionais, trocas gasosas, teor de clorofila e análises anatômicas.

2.3 Análises de fitotécnicas

Foram avaliadas as mudas de morangueiro quanto ao número de folhas, comprimento de parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm), massa fresca e seca de parte aérea e raiz (g). A massa seca do material vegetal foi analisada após secagem estufa de secagem com circulação e renovação de Ar - SL-102/Solab e temperatura de aproximadamente 60 °C até atingir peso constante.

2.4 Análises nutricionais

A análise nutricional foliar foi realizada segundo metodologia descrita por Malavolta et al. (1997). Foram analisados os teores de nitrogênio (N), sendo utilizadas amostras compostas de folhas de três repetições (2 plantas por parcela) por tratamento. As plantas foram secas em estufa de secagem com circulação e renovação de Ar - SL-102/Solab e temperatura de aproximadamente 60 °C a 65 °C até atingir peso constante.

2.5 Trocas gasosas e clorofila

Foram mensuradas com analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA /Infrared Gas Analyzer) modelo LiCor-6400XT. Selecionaram-se folhas completamente expandidas em oito plantas por tratamento, a partir das 08h00min. A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foi fixada na câmara do aparelho para $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em seguida, determinaram-se a taxa fotossintética (A) em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, taxa transpiratória (E) em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, condutância estomática (gs) em $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e carbono interno (Ci).

Para a avaliação dos teores de clorofila utilizou o ClorofiLOG (Modelo Cfl 1030), sendo realizadas as medições em duas posições da planta das primeiras folhas completamente expandidas de cada indivíduo. Foram avaliados os teores de clorofila *a*, *b* e total.

2.6 Análises anatômicas

As amostras foram obtidas de quatro indivíduos diferentes para cada tratamento. Utilizou-se a região mediana da segunda folha completamente expandida. Posteriormente, as amostras foram transferidas para frascos com álcool 70% e desidratadas em série alcoólica (80, 90 e 100%), sendo deixadas por 15 minutos em vácuo e duas horas em cada concentração alcoólica. Posteriormente, as amostras foram mantidas por 24 horas em solução de resina para pré-infiltração, composta de etanol 100% e resina líquida base (1:1). Em seguida, foram emblocadas com o kit HistoResin (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). As seções transversais foram obtidas em micrótomo semiautomático rotativo com espessura de $8 \mu\text{m}$, coradas com azul de toluidina e lavadas com água destilada para retirada do excesso de corante. Posteriormente, as lâminas foram montadas com Verniz vitral como meio de montagem.

As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico (Motic BA 210) com câmera acoplada (Moticam 5), sendo realizadas dez fotografias por repetição, utilizando seis lâminas com as seções transversais. As imagens obtidas foram analisadas em software específico para análise de imagens Motic Images Plus 3.0. Para a determinação da espessura dos tecidos foliares foram avaliadas: espessura da epiderme adaxial (EEAD), espessura da epiderme abaxial (EAB); espessura do parênquima paliçádico (EPP), espessura do parênquima lacunoso (EPL), espessura do mesofilo (EM) e espessura do limbo foliar (ELF).

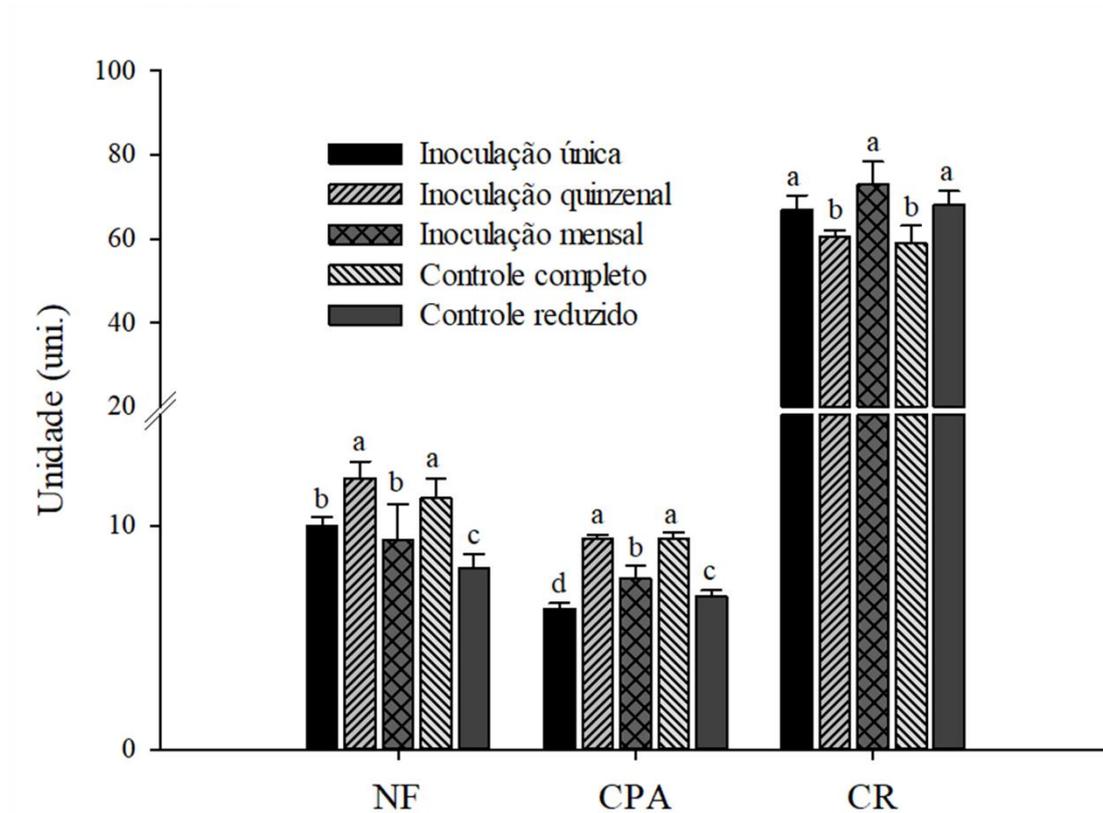
2.7 Análise de dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de cinco tratamentos com quatro repetições (duas plantas por parcela). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todos os gráficos foram produzidos com o software SigmaPlot 13.0 (Systat Software, Inc). As análises estatísticas foram realizadas com o software R (v. 3.2.2).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense* em diferentes períodos, no morangueiro, ocasionou efeitos significativos nas variáveis analisadas ($P < 0,05$). O número de folhas (FIGURA 1A) foi, significativamente, influenciado pelos tratamentos. Maiores valores para essa variável foram observados nos tratamentos com inoculação de 15 em 15 dias e o que continha a solução nutritiva completa. A inoculação, de 15 em 15 dias, induziu aumento de 49,26% no número de folhas. Tratamentos, com as outras frequências de aplicações do inoculante, apresentaram valores intermediários para esse parâmetro, com exceção do tratamento com solução nutritiva reduzida, que foi significativamente diferente e apresentou valor inferior.

Figura 1 - Número de folhas (NF), comprimento parte aérea (CPA) e comprimento das raízes (CR) do morangueiro cv. Pircinque submetidas a inoculação de *Azospirillum brasilense*, controle 1 (solução nutritiva completa e sem inoculação) e controle 2 (solução nutritiva reduzida e sem inoculação) cultivadas em casa de vegetação por 105 dias.

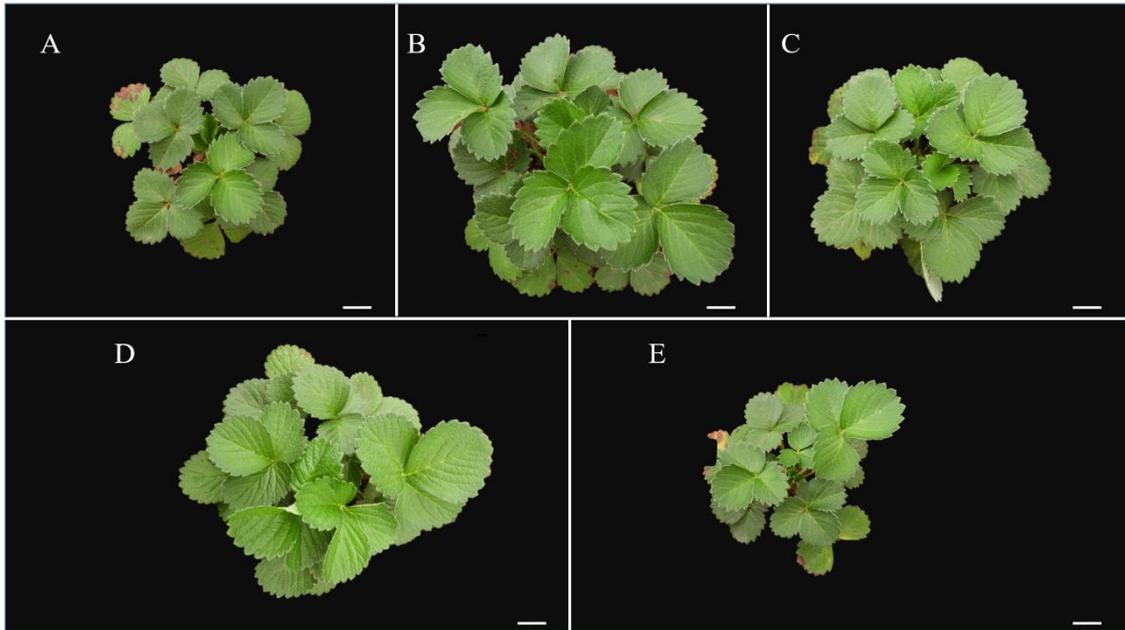


Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020)

Maiores valores de comprimento da parte aérea foram observados nos tratamentos com aplicação de *Azospirillum brasilense* a cada 15 dias e solução nutritiva completa. A aplicação do inoculante bacteriano, nesse tratamento, permitiu aumento de 38% no comprimento da parte aérea em relação ao controle com solução nutritiva reduzida, o que pode ser observado na Figura 2. O tratamento com inoculação, de 30 em 30 dias, apresentou valor intermediário, e superior, significativamente, em relação ao controle com solução nutritiva reduzida. Esses resultados podem estar relacionados com a baixa taxa de sobrevivência por períodos prolongados dos inoculantes bacterianos (BASHAN; DE-BASHAN et al., 1995).

Figura 2 - Crescimento da parte aérea do morangueiro inoculado e não inoculado com *Azospirillum brasilense*.



Legenda: Área foliar do morangueiro. A: 1 aplicação de *Azospirillum brasilense*; B: inoculação de 15 em 15 de *Azospirillum brasilense*; C: inoculação a cada 30 dias de *Azospirillum brasilense*; D: controle com solução nutritiva completa; E: controle com solução nutritiva reduzida. Barra = 2 cm.

Fonte: Do autor (2020).

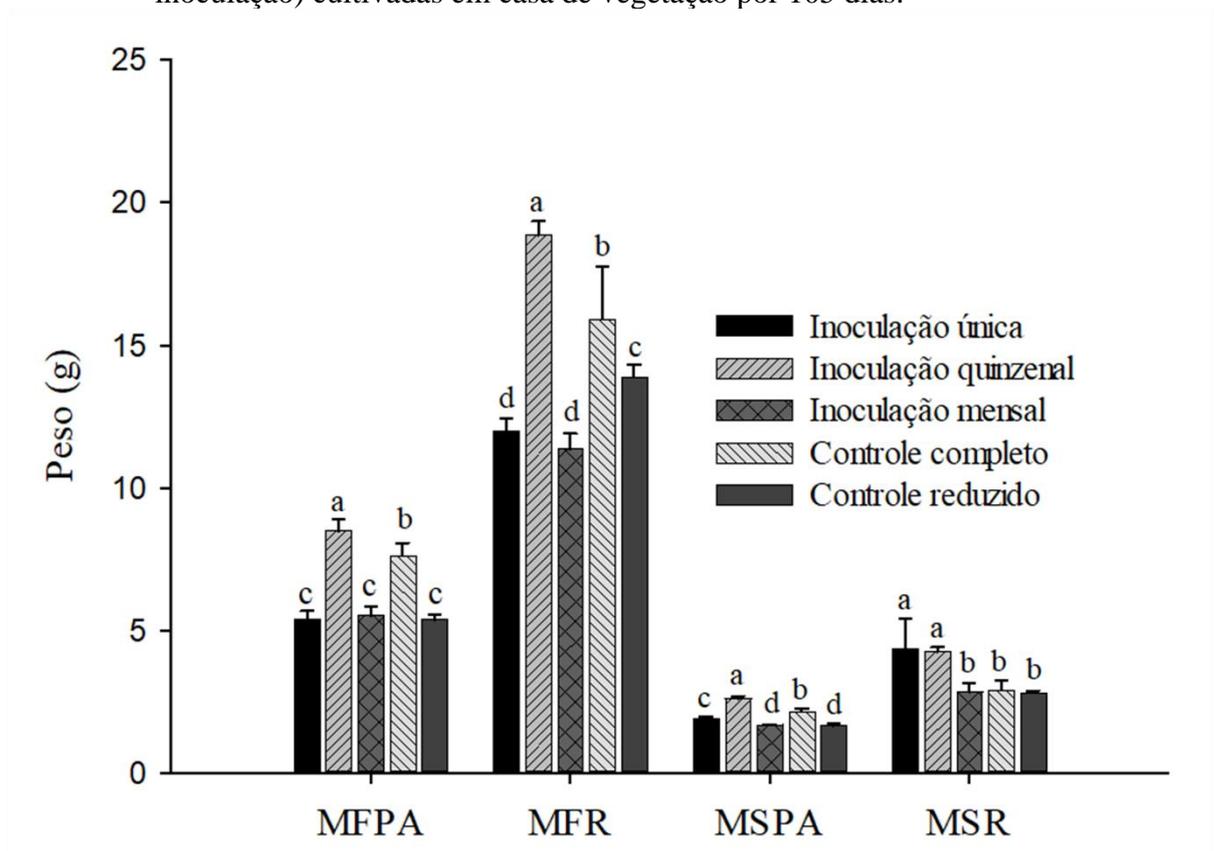
Estudos sobre diferentes bactérias promotoras de crescimento de plantas, avaliando o crescimento de morangueiro, relatam que o número de folhas e comprimento de parte aérea das plantas não apresentaram diferença significativa pela inoculação bacteriana, em comparação com o tratamento sem inoculação (MORAIS et al., 2019).

A inoculação, a cada 30 dias, possibilitou aumento no comprimento das raízes. Contudo, não diferiu, significativamente, do tratamento com apenas uma inoculação e o controle com solução nutritiva reduzida. Menores comprimentos das raízes foram observados no tratamento com inoculação de 15 em 15 dias. Dobbelaere et al. (1999), trabalhando com inoculação de *Azospirillum* em trigo, verificaram que as plantas com maiores níveis de inóculos mostraram inibição do crescimento radicular, apresentando menor comprimento das raízes.

Segundo Fukami et al. (2018), a inoculação com menor frequência de aplicação de *Azospirillum brasilense* nos tratamentos, que tem capacidade fixar nitrogênio atmosférico, resultou em um sistema radicular maior. Já, na inoculação com maior frequência, o sistema radicular foi menor. Isso ocorre, pelo fato de que em ambientes com limitação de nitrogênio, o sistema radicular tende a explorar o maior volume de solo como tentativa de suprir a deficiência desse nutriente (BONIFAS et al., 2005).

Em relação à massa fresca da parte aérea e das raízes (FIGURA 3), a maior produção de biomassa foi observada no tratamento cuja frequência de aplicação ocorreu no período de 15 em 15 dias, com valores 8,47 g de parte aérea e 18,86 g de raízes. Esses valores significam aumento da biomassa de 11,30% e 58% na massa fresca da parte aérea e das raízes de 18,61% no tratamento com solução nutritiva completa e 35,98% na solução reduzida. Contudo, os demais tratamentos testados não proporcionaram aumento da massa fresca da parte aérea e das raízes em morangueiro, apresentando valores inferiores ao tratamento controle com solução nutritiva completa.

Figura 3 - Massa fresca parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) do morangueiro cv. Pircinque submetidas a inoculação de *Azospirillum brasilense*, controle 1 (solução nutritiva completa e sem inoculação) e controle 2 (solução nutritiva reduzida e sem inoculação) cultivadas em casa de vegetação por 105 dias.



Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

A massa seca da parte aérea foi significativamente influenciada pelos tratamentos (FIGURA 3). O maior acúmulo de massa seca da parte aérea (2,60 g) foi observado com a

inoculação de 15 em 15 dias com *Azospirillum brasilense*. Esse valor significou aumento de 56,6% na biomassa. Na massa seca das raízes, foi verificada diferença significativa entre os tratamentos. Maiores valores para variável massa seca das raízes foram obtidos nos tratamentos com fornecimento de *Azospirillum brasilense* somente com uma inoculação (49,48%) e com inoculação a cada 15 dias (46,36%). Maior acúmulo de biomassa nas raízes foi obtido nos tratamentos com maior frequência de aplicação de *Azospirillum brasilense*. Esses resultados podem ser comprovados na Figura 4.

Figura 4 - Crescimento do sistema radicular do morangueiro inoculado e não-inoculado com *Azospirillum brasilense*.



Legenda: Sistema radicular. A: 1 aplicação de *Azospirillum brasilense*; B: inoculação de 15 em 15 de *Azospirillum brasilense*; C: inoculação a cada 30 dias de *Azospirillum brasilense*; D: controle com solução nutritiva completa; E: controle com solução nutritiva reduzida. Barra = 4 cm.

Fonte: Do autor (2020).

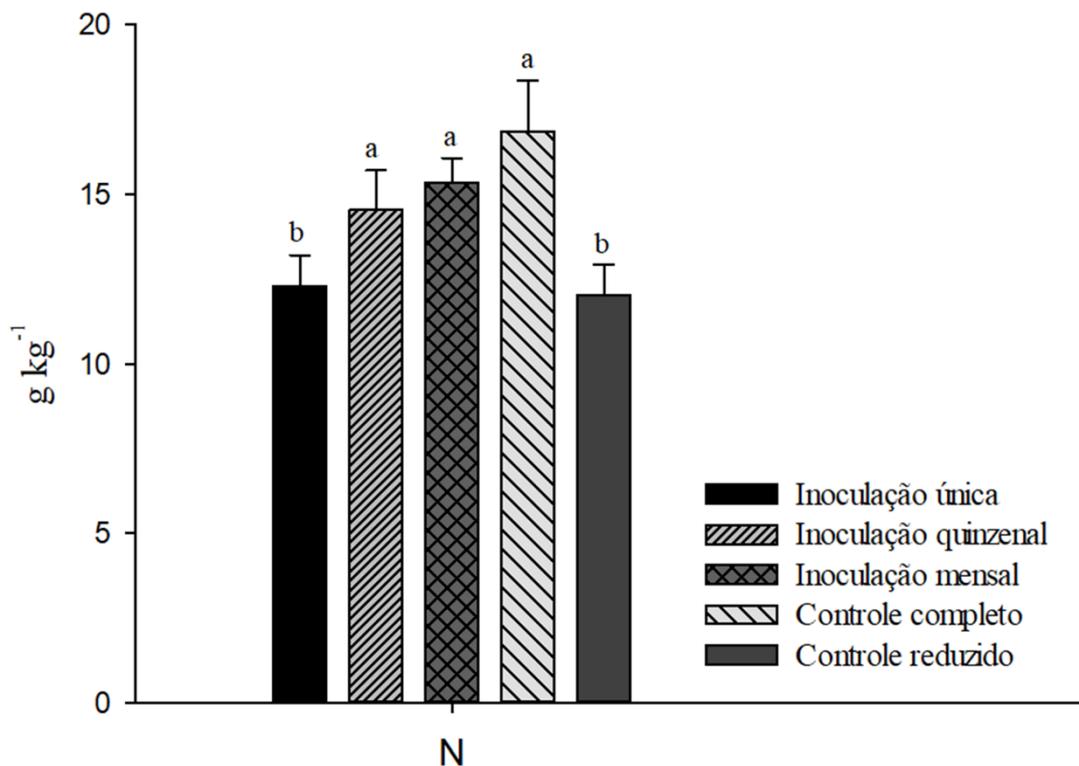
Steenhoudt e Vanderleyden (2000), realizando a inoculação de *Azospirillum brasilense* em gramíneas, observaram alterações na morfologia das raízes, sendo descrito como resultado de substâncias reguladoras, que ocasionou aumento do número de raízes laterais e raízes superficiais.

Essa diferença nos tratamentos, principalmente no tratamento com maior frequência de inoculação *Azospirillum brasilense*, pode ser decorrente da produção de fitormônios, como a auxina, que é promotora de expansão celular e pode influenciar em um maior acúmulo de biomassa (CASSÁN et al., 2016; DOBBELAERE et al., 1999; SOMERS et al., 2005).

Outro fator significativo, é que o acúmulo de auxina em níveis excessivos, com a inoculação com frequência de *Azospirillum brasilense* pode promover o efeito contrário de inibição do crescimento de raízes (SCHLINDWEIN et al., 2008). Esses dados são interessantes, em decorrência da resposta do tratamento com maior frequência de aplicação de *Azospirillum brasilense* que ocasionou menor comprimento das raízes das plantas.

O nitrogênio foliar do morangueiro foi significativamente influenciado pelos tratamentos (FIGURA 5). Maiores valores para essa variável foram obtidos a partir da frequência de aplicação a cada 15 (14,53 g de nitrogênio por kg de planta) e 30 dias (15,33 g de nitrogênio por kg de planta), e com a solução nutritiva completa (16,86 g de nitrogênio por kg de planta). Porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Figura 5 - Teor de nitrogênio (N) na parte aérea do morangueiro cv. Pircinque submetidas a inoculação de *Azospirillum brasilense*, controle 1 (solução nutritiva completa e sem inoculação) e controle 2 (solução nutritiva reduzida e sem inoculação) cultivadas em casa de vegetação por 105 dias.



Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

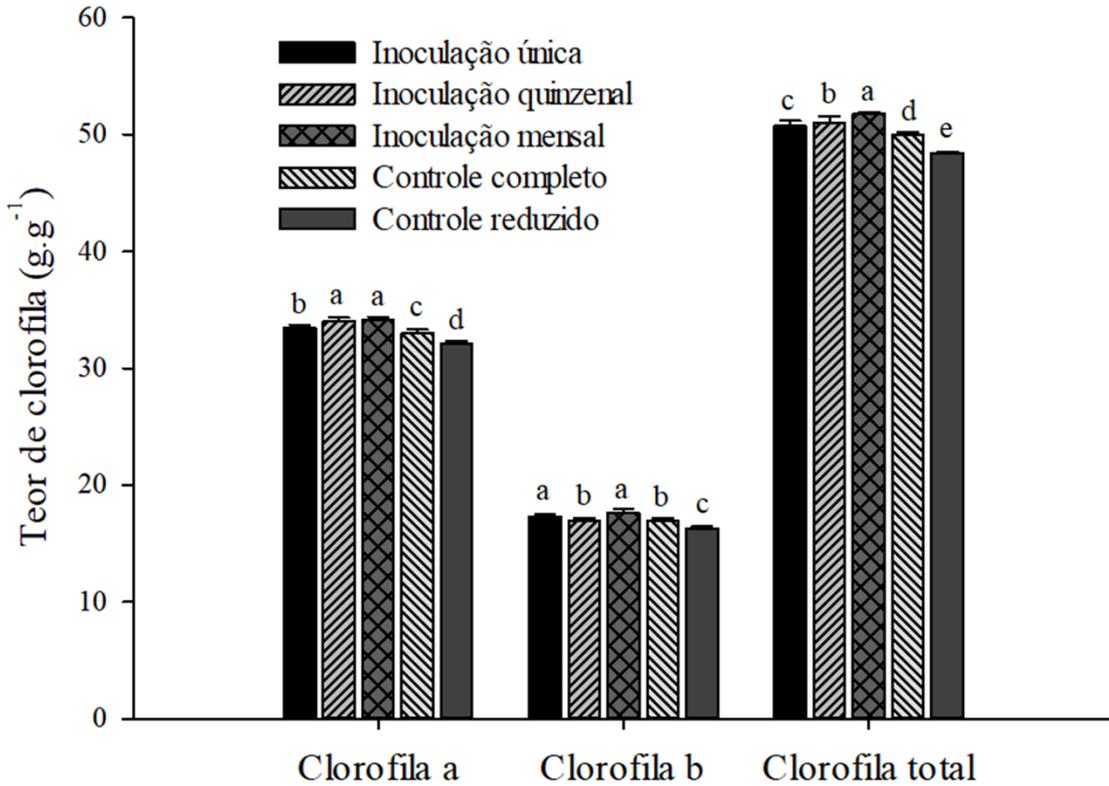
Fonte: Do autor (2020).

Menores teores de nitrogênio foram obtidos nos tratamentos com inoculação única de *Azospirillum brasilense* com 12,30 g de nitrogênio por kg de planta e no controle com solução nutritiva reduzida com 12,03 g de nitrogênio por kg de planta. Na aplicação do inoculante na frequência de 15 em 15 dias, 30 em 30 dias e solução nutritiva completa promoveram aumento de 18,13%, 24,63% e 37,07%, respectivamente. Nesse estudo, a frequência de aplicação de *Azospirillum brasilense*, além de induzir aumento no teor de nitrogênio foliar, também promoveu aumento na taxa fotossintética, transpiração, condutância estomática e teores de clorofila.

Em estudos realizados por Pii et al. (2019) em milho, foi possível observar que o *Azospirillum brasilense* é capaz de diminuir o uso de nitrogênio na forma de NO_3 por plantas. Esses dados podem exemplificar os menores valores no teor de nitrogênio foliar observados no estudo com as diferentes frequências de aplicação do inoculante em relação ao controle com solução nutritiva completa. Dessa forma, o *Azospirillum brasilense* pode ter exercido influência negativa no uso do nitrato do solo.

Diferença significativa entre os tratamentos foi observada para a clorofila *a*, *b* e total (FIGURA 6). Maiores teores de clorofila *a* foram obtidos nos tratamentos com aplicações a cada 15 e 30 dias, no entanto, não diferiram significativamente. O *Azospirillum brasilense* aplicado uma única vez ocasionou em valor intermediário para essa variável. Menores valores da clorofila *a* foram observados no tratamento controle, porém, com diferenças significativas.

Figura 6 - Clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e clorofila total (C) do morangueiro cv. Pircinque submetidas a inoculação de *Azospirillum brasilense* e o controle 1 (solução nutritiva completa e sem inoculação) e controle 2 (solução nutritiva reduzida e sem inoculação) cultivadas em casa de vegetação por 105 dias.



Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

Maiores valores de clorofila *b* ocorreram nos tratamentos com o inoculante aplicado somente uma vez no solo e a cada 30 dias de inoculação (FIGURA 6). O tratamento com solução de nutritiva reduzida apresentou menor valor de clorofila *b*. Nos outros tratamentos, foram verificados valores intermediários para essa variável e, significativamente, diferentes do controle com solução nutritiva reduzida e sem inoculação. Em relação aos teores de clorofila, o nitrogênio disponível poderia ser utilizado para a síntese de clorofila, exemplificando as diferenças entre os tratamentos nas plantas inoculadas e no controle (CURÁ et al., 2017).

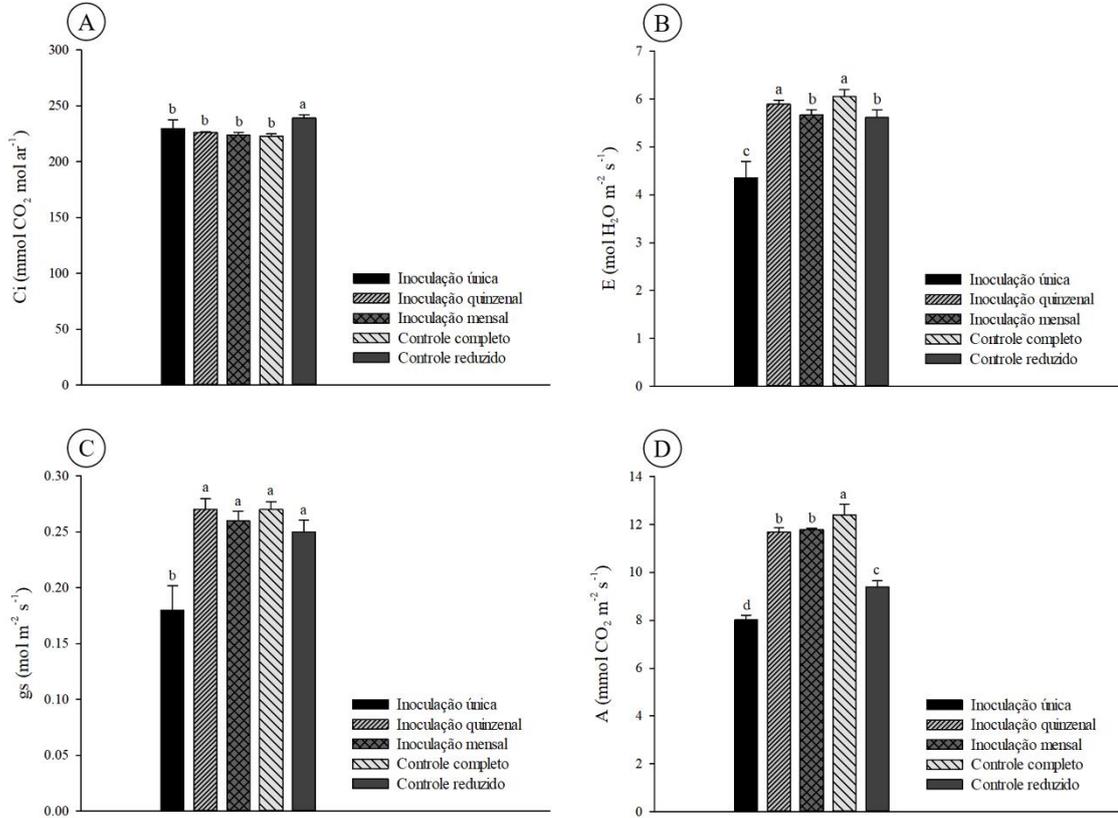
Morais et al. (2019), trabalhando com pigmentos fotossintéticos no morangueiro com diferentes bactérias promotoras de crescimento, observaram tendência do aumento do teor de clorofila em relação ao tratamento não inoculado, entretanto, não houve diferença significativa. Curá et al. (2017) verificaram aumento de 41% no teor clorofila total em milho utilizando

Azospirillum brasilense em comparação com o tratamento controle. Outros estudos como de Fasciglione et al. (2015) e Quadros et al. (2014) também mostraram a capacidade de a *Azospirillum* em aumentar os teores de clorofila e outros pigmentos fotossintetizantes.

A utilização de *Azospirillum brasilense* em plantas de morangueiro também foi avaliada com base em características fisiológicas, ocasionando mudanças nas plantas (FIGURA 7). Em relação à taxa de carbono interno (Ci), o maior valor foi alcançado no tratamento com solução nutritiva reduzida, os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si (FIGURA 7A). Segundo Jadoski et al. (2005), a concentração de Ci no mesofilo foliar diminui com o fechamento estomático, o que influencia na diminuição da taxa fotossintética. Desse modo, a redução da condutância estomática necessitaria limitar a absorção de carbono pelas plantas, em razão da redução da abertura estomática, fato esse que não ocorreu com o tratamento com solução nutritiva reduzida e sem inoculação. Calbo e Morais et al. (1997) observaram plantas com alto valor de Ci, entretanto, não apresentaram menor condutância estomática.

Essa concentração de Ci pode ser explicada pelo estresse (exemplo, menor nutrição), que ocasionam falhas que ocorrem no fotossistema, desencadeando redução na difusão de carbono da câmara subestomática, e originando alto teor de carbono interno, que não é facilmente acessado mesmo em grande quantidade (BERTOLLI et al., 2015).

Figura 7 - (A) Transpiração (E); (B) condutância estomática (gs); (C) fotossíntese (A) e Carbono interno (Ci) do morangueiro cv. Pircinque submetidas a inoculação de *Azospirillum brasilense* e o controle 1 (solução nutritiva completa e sem inoculação) e controle 2 (solução nutritiva reduzida e sem inoculação) cultivadas em casa de vegetação por 105 dias.



Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

A taxa de transpiração foi significativamente influenciada pelos tratamentos (Figura 7B). Os maiores valores para essa variável foram verificados em tratamentos com frequência de inoculação a cada 15 dias e no controle com solução nutritiva completa. Esses tratamentos induziram aumento de 4,80% e 7,65%, respectivamente. O tratamento com inoculação de *Azospirillum brasilense* realizado de 30 em 30 dias não induziu taxa de transpiração significativamente diferente a do tratamento controle com solução nutritiva reduzida. O menor valor para a taxa de transpiração foi observado no tratamento com inoculação única.

Maiores valores de condutância estomática (gs) foram encontrados nos tratamentos com inoculações a cada 15 dias e controle com solução nutritiva completa (FIGURA 7C). Contudo, houve diferença significativa somente do tratamento com inoculação única. No presente estudo, foi verificado que as plantas dos tratamentos que tiveram maiores taxas de transpiração também

apresentaram maiores valores de condutâncias estomáticas. De acordo com Albuquerque et al. (2013), a taxa de transpiração e condutância estomática estão interligadas, os tratamentos menos eficientes no crescimento das plantas estão relacionados à diminuição da condutância estomática, o que leva ao fechamento dos estômatos, reduzindo as taxas de transpiração e de fotossíntese.

Em relação à taxa fotossintética, o tratamento com solução nutritiva completa apresentou o maior valor, com diferenças significativas dos outros tratamentos (FIGURA 7D). As inoculações de *Azospirillum brasilense* a cada 15 dias e 30 dias tiveram valores intermediários. A inoculação única de *Azospirillum brasilense* promoveu menor valor da variável, sendo inferior ao tratamento com solução nutritiva reduzida. O aumento da fotossíntese, nesse tratamento, pode estar ligado ao aumento da abertura estomática e, conseqüentemente, em maior acúmulo de biomassa na parte aérea das plantas de morangueiro.

No presente estudo, tratamentos que apresentaram maior acúmulo de nitrogênio pelas plantas também induziram maior capacidade fotossintética e maior teor de clorofila. De acordo com Jang et al. (2018), os teores de clorofila estão relacionados à capacidade fotossintéticas das plantas e ao teor de nitrogênio.

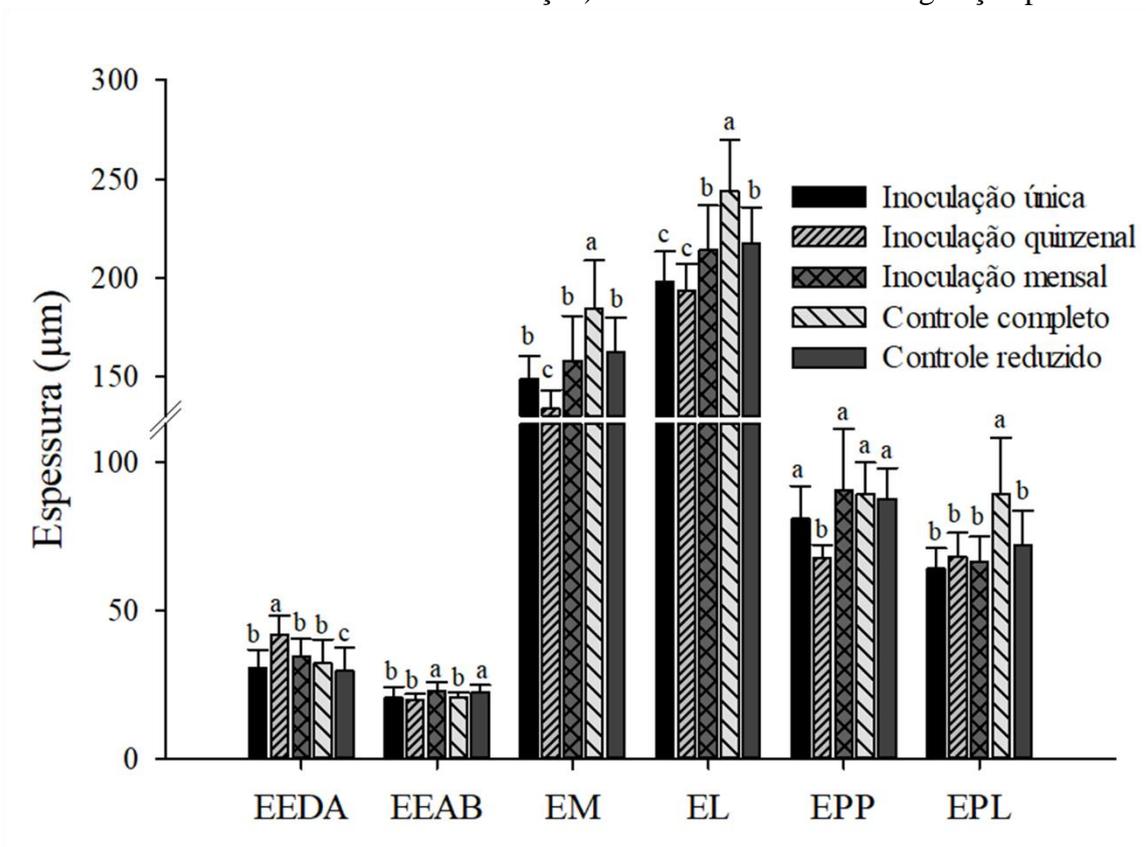
Considerando todas as características apresentadas, os resultados mostraram efeitos significativos na inoculação de *Azospirillum brasilense* realizados de 15 em 15 dias e 30 em 30 dias nos parâmetros de trocas gasosas foliar. Esses resultados mostram as diferenças significativas que ocorreram no crescimento e acúmulo de biomassa das plantas de morangueiro, principalmente na parte aérea, comparados com uma única inoculação da bactéria e do controle com solução nutritiva reduzida (Figura 7). Esse fato sugere a importância da frequência de aplicação do inoculante bacteriano, no decorrer do ciclo da cultura do morangueiro, com condição para melhorar a atividade fotossintética e, conseqüentemente, o crescimento das plantas.

Morais et al. (2019), trabalhando com morangueiro, observaram que a inoculação de bactérias promotoras de crescimento estimulou a mudança de muitos parâmetros fisiológicos, morfológicos e de qualidade de frutos e que a inoculação dos mesmos pode ser uma alternativa biotecnológica para a nutrição das plantas.

A inoculação de *Azospirillum brasilense*, assim como aplicação de solução nutritiva, proporcionaram diferenças significativas na anatomia foliar do morangueiro (FIGURA 8). A inoculação de *Azospirillum brasilense*, de 15 em 15 dias, induziu o aumento mais expressivo

na espessura da epiderme adaxial. A inoculação com *Azospirillum brasilense* uma única vez, de 30 em 30 dias e solução nutritiva completa apresentaram valores intermediários. Esses resultados podem ser observados na Figura 9.

Figura 8 - Espessura da epiderme adaxial (EEDA), espessura da epiderme abaxial (EEAB), espessura do mesofilo (EM), espessura do limbo foliar (EL), espessura do parênquima paliçádico (EPP) e espessura do parênquima lacunoso (EPL) do morangueiro cv. Pircinque submetidas a inoculação de *Azospirillum brasilense*, controle 1 (solução nutritiva completa e sem inoculação) e controle 2 (solução nutritiva reduzida e sem inoculação) cultivadas em casa de vegetação por 105 dias.



Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

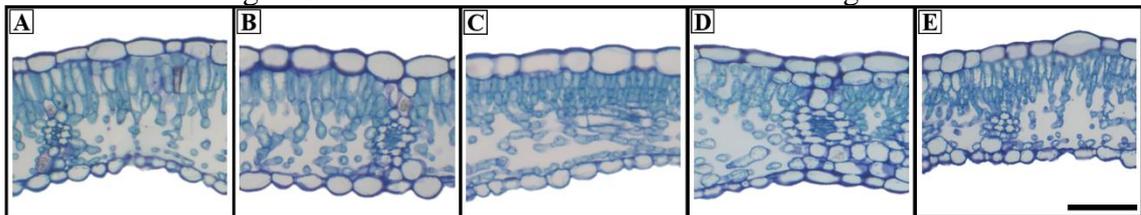
A espessura da epiderme abaxial também foi significativamente influenciada pelos tratamentos. A inoculação a cada 30 dias resultou no aumento mais expressivo para essa variável, entretanto, não diferiu do tratamento com solução nutritiva reduzida. Os outros tratamentos induziram valores intermediários para essa variável, não sendo, significativamente, diferente ao valor observado no tratamento com solução nutritiva completa.

Para a espessura do mesófilo e do limbo, os tratamentos apresentaram efeitos significativos. Maiores valores para ambas as variáveis foram observados para o tratamento com solução nutritiva completa. No que tange à espessura do mesofilo, a aplicação de *Azospirillum brasilense* uma única vez e a cada 30 dias apresentaram efeito intermediário, mas não induziram efeito diferente ao observado com solução nutritiva reduzida.

Os tratamentos apresentaram efeito significativo sobre a espessura dos parênquimas paliádico e lacunoso. Maiores valores para a primeira variável foram observados em quase todos os tratamentos, com exceção do tratamento com aplicações a cada 15 dias que promoveu crescimento intermediário. Para o parênquima lacunoso o valor mais elevado foi verificado para a solução nutritiva completa. Os outros tratamentos apresentaram valores intermediários para esse parâmetro e todos foram estatisticamente diferentes do tratamento controle com solução nutritiva completa.

De acordo com Larraburu et al. (2015), em condições de estresse hídrico ou nutricional ou de qualquer outra forma de estresse de origem ambiental pode ocasionar alterações anatômicas nas plantas e os mesmos serem detectados em estudos anatômicos. Essas alterações ocasionam mudanças da espessura da epiderme, mesofilo, parênquima paliádico e lacunoso modificando os espaços intracelulares nesse tecido (CASSÁN et al., 2016; FERREIRA et al., 2019; LARRABURU et al., 2010). Contudo, o efeito da inoculação de bactérias promotoras de crescimento na mudança das espessuras anatômicas de plantas, pode estar interligado a outros mecanismos que ocorrem durante a interação com as plantas e que ainda não são totalmente esclarecidos (BASHAN et al., 2010).

Figura 9 - Cortes anatômicas de folhas de morangueiro.



Legenda: Corte transversal. A: 1 aplicação de *Azospirillum brasilense*; B: inoculação de 15 em 15 de *Azospirillum brasilense*; C: inoculação a cada 30 dias de *Azospirillum brasilense*; D: controle com solução nutritiva completa; E: controle com solução nutritiva reduzida. Barra = 100 µm.

Fonte: Do autor (2020).

As plantas de morangueiro, observados com a inoculação de *Azospirillum brasilense* realizada em diferentes períodos do cultivo das plantas sofreram grande influência. Com isso,

o estudo mostrou os potenciais da inoculação da bactéria promotora de crescimento *Azospirillum brasilense* como alternativa para a nutrição das plantas de morangueiro.

4 CONCLUSÕES

A inoculação de *Azospirillum brasilense*, de 15 em 15 dias, para a promoção de crescimento vegetal do morangueiro promoveu efeitos positivos nas características fitotécnicas, pigmentos fotossintéticos, fisiológicas e epiderme adaxial. No tratamento com uma única aplicação, o inoculante induziu resultados promissores no sistema radicular do morangueiro.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M.P.F. et al. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno-africano submetidas a deficit hídrico e reidratação. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 48, n. 1, p. 9-16, 2013.
- ANDRADE, F.M. et al. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v. 223-225, p. 120-128, 2019.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. (Ed.). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. In: **Advances in agronomy**: Elsevier, 2010. V.108. p. 77-136.
- BASHAN, Y. et al. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 5, p. 1938-1945, 1995.
- BERTOLLI, S.C.; DE SOUZA, J.; SOUZA, G.M. Caracterização fotossintética da espécie isohídrica pata-de-elefante em condições de deficiência hídrica. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 3, p. 196-205, 2015.
- BONIFAS, K.D. et al. Nitrogen supply affects root: shoot ratio in corn and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). **Weed Science**, v. 53, n. 5, p. 670-675, 2005.
- CALBO, M.E.R.; MORAES, J. Fotossíntese, condutância estomática, transpiração e ajustamento osmótico de plantas de buriti submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, n. 2, p. 117-123, 1997.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117-130, 2016.
- CURÁ, J. et al. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017.
- DELAPORTE-QUINTANA, P. et al. Contribution of *Gluconacetobacter diazotrophicus* to phosphorus nutrition in strawberry plants. **Plant and soil**, v. 419, n. 1-2, p. 335-347, 2017.
- DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and soil**, v. 212, n. 2, p. 153-162, 1999.
- FASCIGLIONE, G. et al. *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 154-162, 2015.
- FERREIRA, C.M.; SOARES, H.M.; SOARES, E.V. Promising bacterial genera for agricultural practices: an insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **Science of The Total Environment**. v. 682, p. 779-799, 2019.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 73, 2018.

GONZÁLEZ, A.H. **Promoção do crescimento de leguminosas herbáceas utilizando rizóbios isolados de áreas de mineração de carvão**. 2015. 105 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.

GUERRERO-MOLINA, M.F.; WINIK, B.C.; PEDRAZA, R.O. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied soil ecology**, v. 61, p. 205-212, 2012.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **California agricultural experiment station**, 1950. 347 p. (Documentos).

JADOSKI, S.O.; KLAR, A.E.; SALVADOR, E.D. Relações hídricas e fisiológicas em plantas de pimentão ao longo de um dia. **Ambiência**, v. 1, n. 1, p. 11-19, 2005.

JANG, J. et al. Physiological changes and growth promotion induced in poplar seedlings by the plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus subtilis* JS. **Photosynthetica**, v. 56, n. 4, p. 1188-1203, 2018.

LARRABURU, E.E.; APÓSTOLO, N.M.; LLORENTE, B.E. Anatomy and morphology of photinia (*Photinia × fraseri* Dress) in vitro plants inoculated with rhizobacteria. **Trees**, v. 24, n. 4, p. 635-642, 2010.

LARRABURU, E.E.; BUSUSCOVICH, A.C.; LLORENTE, B.E. *Azospirillum brasilense* improves in vitro and ex vitro rooting-acclimatization of jojoba. **Scientia Horticulturae**, v. 209, p. 139-147, 2016.

LARRABURU, E.E.; LLORENTE, B.E. Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in in vitro rooting of pink lapacho. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 1, p. 175-184, 2015.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S.D. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Potassa e do Fósforo, 1997. 319 p.

MORAES SÁ, J.C. et al. Low-carbon agriculture in South America to mitigate global climate change and advance food security. **Environment international**, v. 98, p. 102-112, 2017.

MORAIS, M.C. et al. Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 12, p. 5341-5349, 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NADEEM, S.M. et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 2, p. 429-448, 2014.

NAIK, K. et al. Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101326, 2019.

PII, Y. et al. *Azospirillum brasilense* inoculation counteracts the induction of nitrate uptake in maize plants. **Journal of experimental botany**, v. 70, n. 4, p. 1313-1324, 2019.

QUADROS, P.D.D. et al. Desempenho agronômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, p. 209-218, 2014.

RUÍZ-SÁNCHEZ, M. et al. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 10, p. 1031-1037, 2011.

RSTUDIO TEAM. **RStudio**: Integrated development for R [Computer software]. Boston, MA: RStudio, Inc. Disponível unter, 2016. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>. Acesso em: 10 out. 2019.

SANTOS, M.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 205, 2019.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 658-664, 2008.

SOMERS, E. et al. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 4, p. 1803-1810, 2005.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 487-506, 2000.

SYSTAT SOFTWARE Inc. **Sigmaplot for Windows, version 13**. 2006. Disponível em: <<http://www.statsoft.com/products/sigmaplot/>>. Acesso em: 10 out. 2019.

TORTORA, M.L.; DÍAZ-RICCI, J.C.; PEDRAZA, R.O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 279-290, 2012.

ARTIGO 3 - Diatomaceous earth promotes *in vitro* development of sweet potato

ABSTRACT

The supplementation of culture medium with silicon (Si) favors the development of *in vitro* cultivated plants and minimizes seedling losses during the acclimatization phase. The objective of this work was to evaluate the effect of different concentrations of diatomaceous earth on phytotechnical characteristics, pigment contents, and the *in vitro* anatomical development of the sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivar Brazlândia Branca. Nodal segments of sweet potato established *in vitro* were inoculated into MS tissue culture medium containing 60 g L⁻¹ of sucrose and solidified with 5.5 g L⁻¹ of agar. In our experiments, MS media containing four different concentrations of diatomaceous earth (1, 2, 3, and 4 g L⁻¹) were tested. As a control, we also tested the effect of MS medium free from diatomaceous earth. After 30 days of *in vitro* culture, chlorophyll, carotenoids, and phytotechnical and anatomical characteristics from *in vitro* propagules of sweet potato were evaluated. We found that increase in fresh and dry mass of sweet potato plants occurred in the presence of diatomaceous earth. The supplementation of the culture medium with diatomaceous earth resulted in higher levels of carotenoids, total chlorophyll, and chlorophyll *a* and *b*. The addition of a silicon source in MS medium resulted in increased tissue thickness of adaxial and abaxial epidermis, lacunous parenchyma, and leaf blade. Thus, the use of diatomaceous earth promotes the development of micropropagated sweet potato plants. Furthermore, the addition of diatomaceous earth to the MS medium leads to higher chlorophyll and carotenoid contents and greater thickness of the leaf epidermis.

Keywords: *Ipomoea batatas*. Silicon. Plant anatomy. Plant tissue culture.

1 INTRODUCTION

Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) is a tropical plant grown throughout Brazil. Due to its rusticity and wide adaptation to the most varied environments and conditions, this crop is a viable and easy cultivation alternative for producers with low technological input (QUEIROGA et al., 2007).

With strong economic and social appeal, the production of sweet potato has been growing over the years. In 2017, Brazil produced about 780 thousand tons in a total area of 54 thousand hectares, while the world production of sweet potato was approximately 112.8 million tons during this time (FAO, 2019).

Despite these numbers, sweet potato productivity in Brazil is still far below its productive potential, as yields of upto 40 tons per hectare can be obtained, depending on the cultivated cultivar (SILVA et al., 2015).

The sweet potato cultivar Brazlândia Branca, a fruit of the genetic improvement program developed by Embrapa Hortaliças launched in 1984, stands out in the consumer market for its high levels of antioxidants, vitamins A, B, C, K and E, fatty acids, as well as potassium, magnesium, phosphorus, among other minerals that make it strongly appreciated in diets, especially amongst those who practice physical activity (EMBRAPA, 2019).

In vitro cultivation of sweet potato is an important method of crop propagation aimed at the production of high quality, pathogen-free seedlings. Tuberos roots or roots are used for crop production, which can cause losses to final production due to the presence of diseases (FLORES et al., 2015).

In agricultural production, silicon, although not considered an essential element in general, has played an important role in plant nutrition. In addition, this nutrient may confer resistance to plants against biotic and abiotic stresses (CRUZ et al., 2013). Thus, as a source of silicon we can use diatomaceous earth, which is composed approximately of 91% of opaline silica, in addition to containing impurities such as clay minerals, organic matter, carbonates, and hydroxides (SOUZA et al., 2003).

The objective of this work, therefore, was to evaluate the effect of different concentrations of diatomaceous earth on the phytotechnical characteristics, pigment content, and anatomical development *in vitro* of sweet potato cultivar Brazlândia Branca.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Preparation of plant material

Plants propagated *in vitro* through the cultivation of meristems were used as plant material. The mother plants, belonging to the cultivar Brazlândia Branca, were obtained from the Department of Agriculture (DAG) of the Federal University of Lavras (UFLA), Lavras-MG, Brazil. In the Plant Tissue Culture Laboratory of the DAG/UFLA, the plants were multiplied using 0.5 cm long nodal segments, which were inoculated into test tubes containing 15 mL MS tissue culture medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962), plus 60 g L⁻¹ sucrose, 5.5 g L⁻¹ agar and pH adjusted to 5.8 before autoclaving at 121°C and 1.0 atm pressure for 20 min. Subsequently, the tubes were placed in a growth room with a 16-hour photoperiod and a

temperature of 25 ± 2 °C, with artificial illumination provided by a white LED lamp and an average irradiance of $49.4 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 30 days.

2.2 *In vitro* assay

After 30 days, the plants were used as explant suppliers for the tests. Each nodal segment (approximately 0.5 cm) long was inoculated into a test tube containing 15 mL of sterile MS culture medium, plus diatomaceous earth at concentrations of 1, 2, 3, and 4 g L⁻¹ as well as MS medium without diatomaceous earth as a control. The test tubes were placed in tissue culture conditions identical to those described above.

2.3 Phytotechnical analysis

After 30 days of *in vitro* cultivation, the plants were removed from the vials, and subjected to washing in water to remove culture adhered to the roots. Then, leaf number, shoot length (cm), root length (cm), shoot fresh mass and shoot dry mass (g), root fresh mass and root dry mass (g) were analyzed. The dry mass of the plant material was analyzed after drying in oven Ar - SL-102/Solab at 60°C for 72 hours until the plant material reaches a constant weight.

2.4 Pigment analysis

The analysis of pigment contents in sweet potato was carried out at the Seed Laboratory of the DAG/UFLA. Six plants were used per treatment, corresponding to two plants per replication. A known amount of fresh plant material (± 0.5 g) was used in the analysis and then milled in 10 mL of 80% acetone to extract chlorophyll. The solution was filtered and analyzed by spectrophotometry (Multiskan FC – Thermo Scientific – Uniscience) at wavelengths of 470, 645, 652 and 663 nm, according to the methodology of Engel e Poggiani (1991). For the determination of chlorophyll *a*, *b*, and total, and carotenoids levels, equations proposed by Li et al (2013) were used.

2.5 Anatomical analysis

For anatomical analysis, the median region of the second fully expanded leaf was used. Samples were obtained from four individuals for each treatment. Subsequently, the samples were transferred to bottles with 70% alcohol, dehydrated in alcohol series (70, 80, 90, and 100%), and left for 15 minutes in and two hours at each alcohol concentration. The samples were then kept for 24 hours in a pre-infiltration resin solution composed of 100% and liquid base resin (1:1), then packaged with the HistoResin kit (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

The cross sections were obtained using ten 8 μm thick semi-automatic microtome. These sections were then stained with toluidine blue and washed with distilled water to remove dye. Subsequently, the blades were mounted with stained glass varnish as mounting.

The slides were observed and photographed under optical microscope (Motic BA 210) with attached (Moticam 5) to capture the images. For each repetition, ten photographs were taken, using six slides with the cross sections. The images obtained were analyzed using the Motic Images Plus 3.0 image analysis software

To determine leaf tissue thickness, the following parameters were evaluated: adaxial epidermis thickness, abaxial epidermis thickness; palisade parenchyma thickness, lacunous parenchyma (EPL), mesophyll thickness (MS) and leaf blade thickness (ELF).

2.6 Statistical analysis

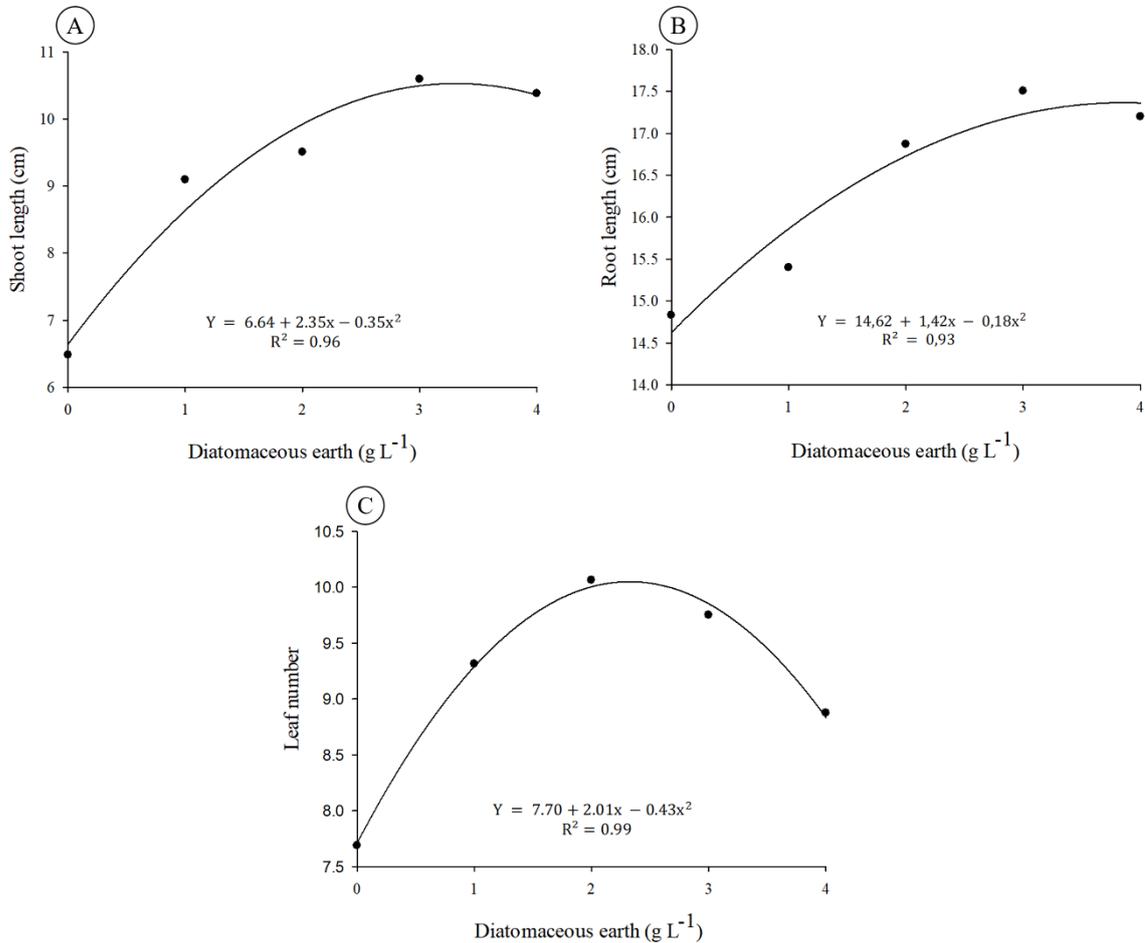
The experimental design was completely randomized with eight replications (two seedlings per replication). Data were subjected to analysis of variance and regression with ($P < 0.05$). Statistical analyzes were performed with the R software (v. 3.2.2).

3 RESULTS AND DISCUSSION

The concentrations of diatomaceous earth applied to the MS culture medium benefited the growth of sweet potato plants cultivar Brazlândia Branca. Addition of diatomaceous earth had significant effect on leaf number, shoot length, and root length according with the concentration. Increasing concentrations of diatomaceous earth showed quadratic growth, with

peak function indicating increased shoot and root length to the estimated product concentration of 3.35 and 3.94 g L⁻¹, respectively (Figure 1A and B).

Figure 1 - (A) shoot length (cm); (B) root length (cm); (C) leaf number of sweet potato plants *in vitro* cultivated in different concentrations of diatomaceous earth.



Source: The author (2020).

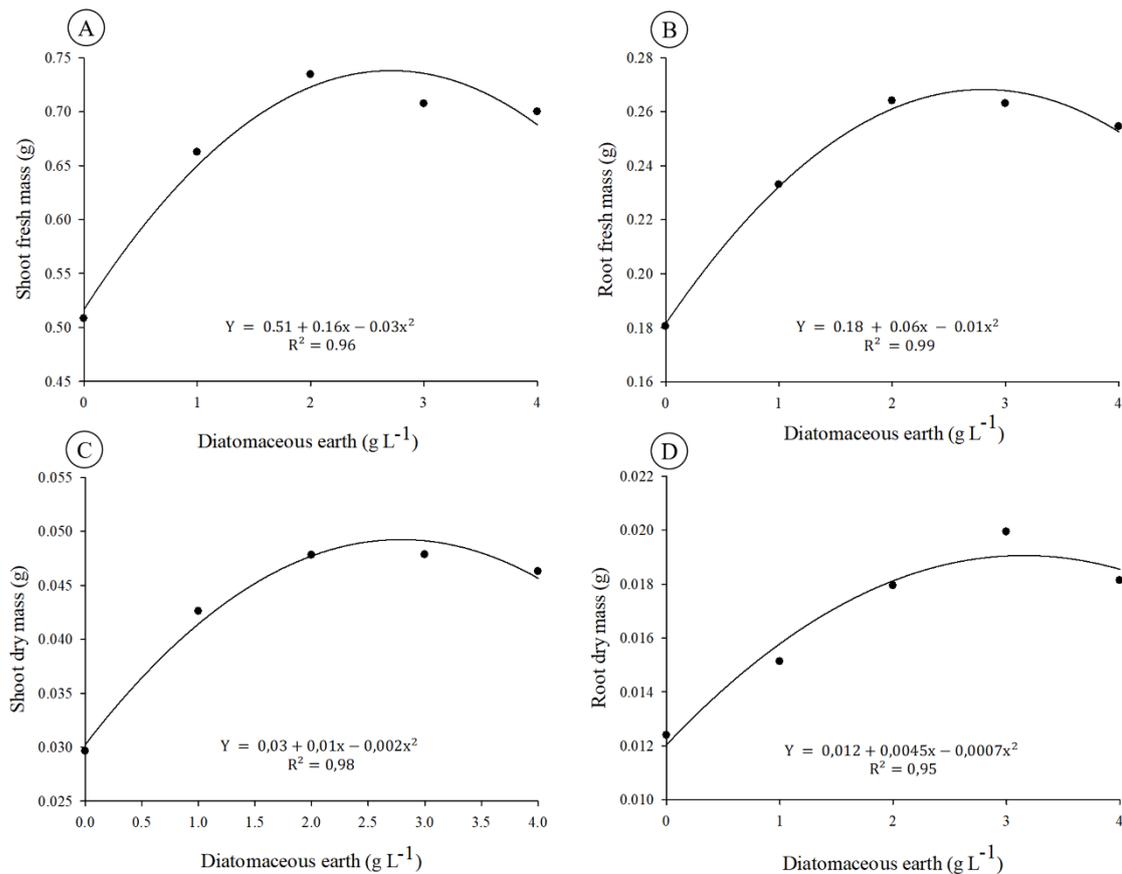
Soares et al. (2011) used silicon sources for orchid micropropagation and obtained similar responses. While studying the effect of different concentrations and sources of silicon on micropropagated yams, Rodrigues et al. (2017) reported a significant effect on plant shoot length. In addition, Asmar et al. (2011) showed that sources of silicon promote shoot growth in banana plants.

In this work, it was observed that the addition of 2 g L⁻¹ of diatomaceous earth resulted in a higher leaf number in plants, followed by a sharp decline in the number of leaves of plants treated with higher concentrations of the product (FIGURE 1C). This finding is in agreement

with data from Soares et al. (2011), who observed an increase in the number of *Cattleya* group orchid leaves using two sources of silicon. Braga et al. (2009), working with different silicon sources in micropropagated strawberry described similar results. Pasqual et al. (2011) reported that in two orchid species, the number of leaves decreased as silicon concentration increased.

Shoot fresh mass and root fresh mass had a quadratic increase corresponding to the increasing concentration of the diatom soil (Figure 2). The maximum increment was estimated at concentrations of 2.66 and 3 g L⁻¹ of the product, respectively. The use of this product increased shoot fresh mass and root fresh mass by approximately 45% at a concentration of 2 g L⁻¹ as compared to control treatment. Similarly, Rodrigues et al. (2017) reported that potassium silicate and calcium silicate also increased the shoot fresh mass of yam plants.

Figure 2 - (A) shoot fresh mass (g); (B) root fresh mass (g); (C) shoot dry mass (g); (D) root dry mass (g) of sweet potato plants *in vitro* cultivated in different concentrations of diatomaceous earth.



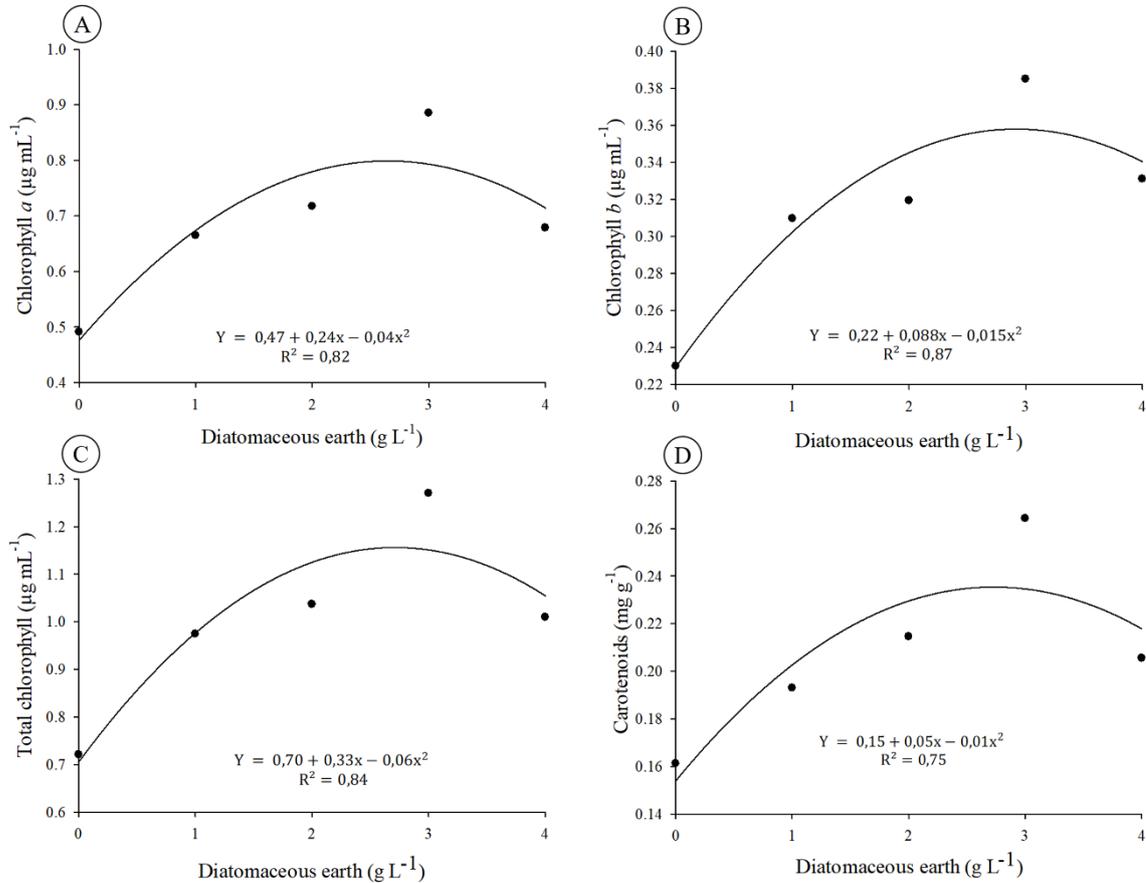
Source: The author (2020).

The addition of diatomaceous earth to the culture medium had a significant effect on shoot dry mass (FIGURE 2C). The shoot dry mass had a biomass gain of 61% at the concentration of 2 g L⁻¹ of the product. Dias et al. (2017) also reported an increase in dry shoot mass with the use of sodium silicate. Asmar et al. (2011), working with banana *in vitro*, reported higher dry mass volume of shoots when using culture medium supplemented with sodium silicate. At the concentration of 2 g L⁻¹ (Figure 2D), the root dry mass gained approximately 44% in relation to the control in our experiments. Further increases in diatomaceous earth beyond a concentration of 2g L⁻¹ resulted in marked decreases in fresh shoot mass, fresh root mass, shoot dry mass and root dry mass. The reduction in plant growth observed *in vitro* with increasing Si concentrations may result nutritional imbalance in the plant caused by excess nutrient uptake (DIAS et al., 2017).

Our results demonstrate that addition of Si confers great benefits to sweet potato plants, increasing the nutrient absorption capacity of the medium and increasing the biomass accumulation in the shoot, producing better quality seedlings. Additionally, it is possible that these seedlings may have greater resistance to biotic and abiotic stresses in the process of acclimatization, increasing the chances of development and eventually leading to greater seedling production capacity.

Increased levels of chlorophyll *a* and *b*, total chlorophyll and carotenoids were observed at the concentration of 2 and 3 g L⁻¹ of with the use of diatomaceous earth, showing quadratic behavior in the curve (FIGURE 3). Taken together, our results show that the use of silicon in the tissue culture medium increases leaf growth and root growth and promotes better development of anatomical structures. Furthermore, silicon upregulates photosynthetic pigment content of *in vitro* propagated plants by facilitating the development of larger photosynthetic apparatuses (ASMAR et al., 2011; BRAGA et al., 2009).

Figure 3 - (A) chlorophyll *a*; (B) chlorophyll *b*; (C) total chlorophyll; (D) carotenoids of sweet potato plants *in vitro* cultivated in different concentrations of diatomaceous earth.

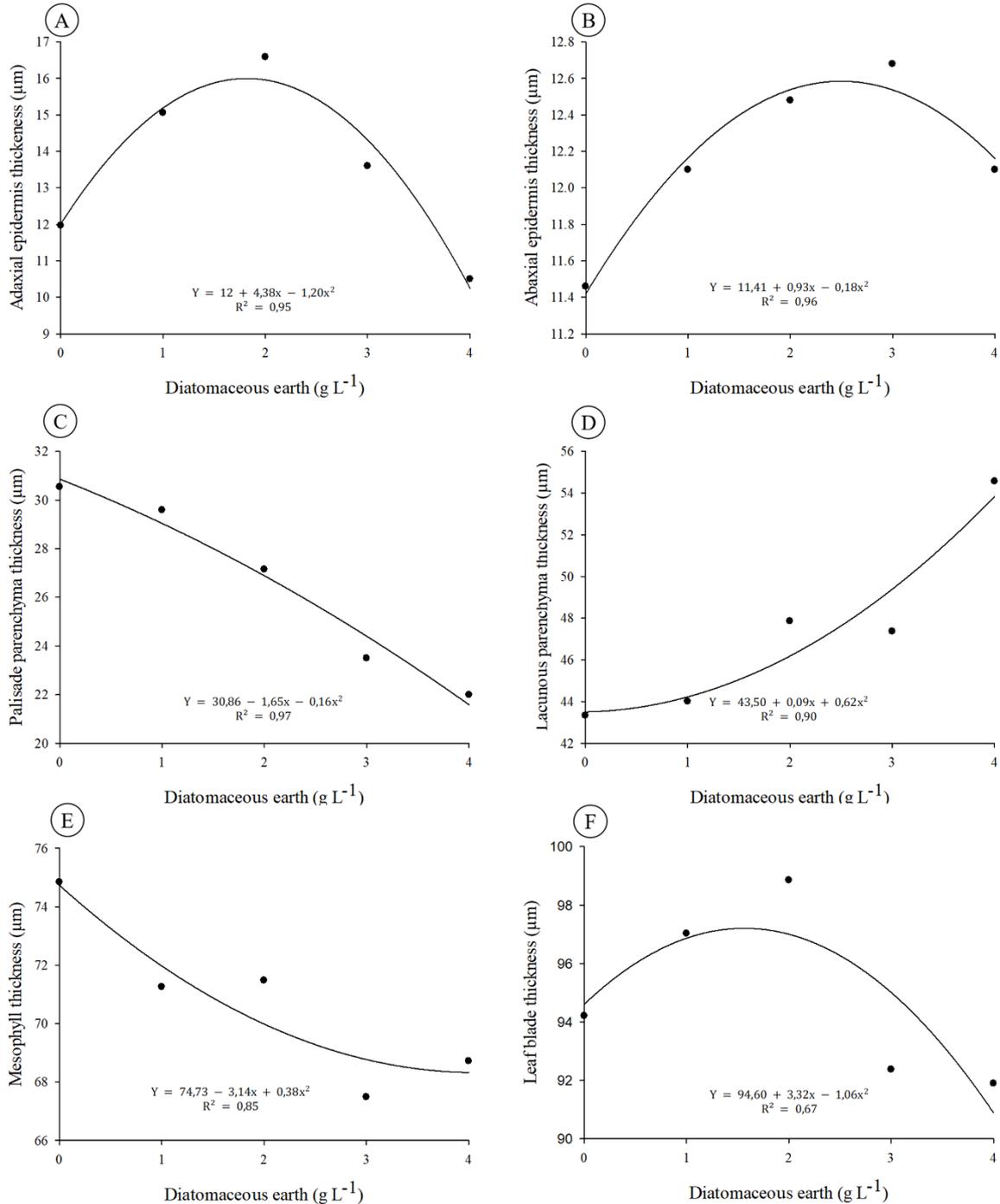


Source: The author (2020).

Asmar et al. (2013a) working with the *in vitro* cultivation of banana plant cultivar Maçã with different sources of silicon, reported higher levels of total chlorophyll, as well as chlorophyll *a* and *b* in treated plants. Recently, Martins et al. (2019) reported that plants grown in medium supplemented with a source of calcium silicate showed increased photosynthetic pigments and photosynthetic performance, as a result of containing higher levels of chlorophyll and carotenoids.

The concentrations of diatomaceous earth had an effect on adaxial and abaxial epidermal thickness (FIGURES 4A and 4B). The use of diatomaceous earth resulted in thicker adaxial and abaxial epidermis when compared to the control treatment, with an increase in the concentration up to 1.82 and 2.58 g L⁻¹ of the product, respectively.

Figure 4 - (A) adaxial epidermis thickness; (B) abaxial epidermis thickness; (C) palisade parenchyma thickness; (D) lacunous parenchyma thickness; (E) mesophyll thickness and (F) leaf blade thickness of sweet potato plants *in vitro* cultivated in different concentrations of diatomaceous earth.



Source: The author (2020).

An approximate 38% increase in adaxial epidermis thickness was observed, when the medium was supplemented with 2 g L⁻¹ of diatomaceous earth compared with the control.

However, higher concentrations of this compound impaire development, resulting in lower thickness when compared to the control. According to Assis et al. (2018), the adaxial epidermis is more susceptible to environmental factors such as solar radiation and high temperatures than the abaxial epidermis. Thus, greater epidermal thickness can offer greater tolerance to plants exposed to high solar radiation (TAIZ; ZEIGER, 2006) and can significantly contribute to improving pest and disease resistance (ALVES et al., 2015; BARBOSA FILHO et al., 2001; REYNOLDS et al., 2016).

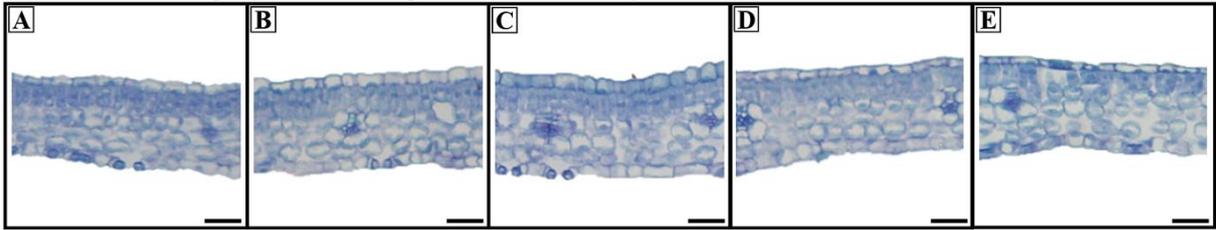
Our results convincingly demonstrate that the leaves cultivated in medium supplemented with a silicon source, such as diatomaceous earth, develop thicker leaf structures, which give these plants better opportunities to adapt to the acclimatization process, generating higher quality seedlings which are consequently of greater value.

Palisade parenchyma thickness and mesophyll thickness decreased with increasing diatomaceous earth concentrations in relation to control. The lowest thickness of the palisade parenchyma and mesophyll was observed at a concentration of 4 g L^{-1} in both (FIGURES 4C and 4E). In contrast, there was an increase in thickness of the lacunous parenchyma at a concentration of 4 g L^{-1} of the product. Leaf blade thickness increased at a concentration of 1.56 g L^{-1} of diatomaceous earth, showing a reduction in thickness in higher concentrations of the product (FIGURE 4D).

Our results relating to the thickness of the lacunous parenchyma resemble those of Braga et al. (2009), who demonstrated that supplementing MS medium with silicon sources such as potassium or calcium silicate and sodium silicate favored the increase of the thickness of these tissues in *in vitro* strawberry plants. According to Castro et al. (2009), the thicker spongy or spongy parenchyma facilitates a greater accumulation of gases during gas exchange, due to the irregular shape of its cells, resulting in an abundance of intercellular space.

Through cross sectioning, differences in leaf tissue thickness after treatment with diatomaceous earth were verified, corroborating with the statistical data. These results demonstrate the superiority of the plants in culture medium supplemented with diatomaceous earth (FIGURE 5).

Figure 5 - Cross section of sweet potato leaf cultivar Brazlândia Branca developed *in vitro* in different concentrations of diatomaceous earth. (A - control; B - 1 g L⁻¹; C - 2 g L⁻¹; D - 3 g L⁻¹ and E - 4 g L⁻¹). Bar = 100 μm.



Source: The author (2020).

Anatomical changes caused *in vitro* by supplementing the culture medium with silicon can be triggered in *ex vitro* conditions, favoring the acclimatization process (Asmar et al., 2013b; Martins et al., 2018), which is the end phase of the plant micropropagation process. This practice is based on the fact that *in vitro* plants show improvements in the anatomical and physiological characteristics of the leaves. Thus, with thicker leaf tissues, the chance of plant survival during transfer to the *ex vitro* environment was greater, being less susceptible to biotic and abiotic stresses (ASMAR et al., 2015).

In general, our results provides novel information on the role of silicon in promoting plant biomass gain, pigment content, and leaf structure thickness, contributing to *in vitro* cultivation of sweet potato. In addition, it is important to note that the benefits of using diatomaceous earth on sweet potato cultivation are evident at specific concentrations. Therefore, our results show the critical importance of diatomaceous earth in supporting the proper development of sweet potato plantlets *in vitro*, with the ultimate aim of obtaining seedlings with greater resistance to the acclimatization process in field-based conditions.

4 CONCLUSIONS

The use of diatomaceous earth at the concentration of 2 and 3 g L⁻¹ promotes an increase in the overall quality of micropropagated sweet potato plants. In addition, the addition of diatomaceous earth to MS medium leads to higher chlorophyll and carotenoid levels and greater thickness of the leaf epidermis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support.

REFERENCES

- ALVES, A.O. et al. Use of silicon for reducing the severity of bacterial wilt of sweet pepper. **Journal of Plant Pathology**. v. 97, n. 3, p. 419-429, 2015.
- ASMAR, S.A., et al. Changes in leaf anatomy and photosynthesis of micropropagated banana plantlets under different silicon sources. **Scientia Horticulture-Amsterdam**. v. 161, p. 328-332, 2013a.
- ASMAR, S.A. et al. Morphophysiological characteristics of acclimatized 'Grande Naine' banana plants in response to in vitro use of silicon. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 73-82, 2013b.
- ASMAR, S.A. et al. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira 'Maçã' micropropagadas. **Ciência Rural**. v. 41, p. 1127-1131, 2011.
- ASMAR, S.A. et al. Anatomical and structural changes in response to application of silicon (Si) 'in vitro' during the acclimatization of banana cv. 'Grand Naine'. **Australian Journal Crop Science**, v. 9, n. 12, p. 1236-1241, 2015.
- ASSIS, F.A.D. et al. Silicon and agar on in vitro development of cockscomb (Amaranthaceae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, p. 30-41, 2018.
- BARBOSA FILHO, M.P. et al. Silicato de cálcio como fonte de silício para o arroz de sequeiro. **Revista Brasileira Ciência do Solo**. v. 25, p. 325-330, 2001.
- BRAGA, F.T. et al. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 128-132, 2009.
- CASTRO, E.D.; PEREIRA, F.J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: Estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- CRUZ, M.F. et al. Potassium silicate and calcium silicate on the resistance of soybean to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Bragantia**, v. 72, p. 373-377, 2013.
- DIAS, G.D.M.G. et al. Morphological and physiological characteristics in vitro anthurium plantlets exposed to silicon. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 17, p. 18-24, 2017.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soluções tecnológicas: Batata-doce Brazlândia Branca**. 2019. Available in: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/1604/batata-doce-brazlandia-branca>> Access in: 7 August 2019.
- ENGEL, V.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

FAO, 2019. FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Available in: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC10>>. Access in: 6 August 2019.

FLORES, R. et al. Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas*. **Revista Ciência Agrária**. v. 38, n. 3, p. 429-437, 2015.

LI, H.; TANG, C.; XU, Z. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 117-124, 2013.

MARTINS, A.D. et al. Morpho-physiological changes in *Billbergia zebrina* due to the use of silicates *in vitro*. **Anais Academia Brasileira Ciência**. v. 90, p. 3449-3462, 2018.

MARTINS, J.P.R. et al. Sources and concentrations of silicon modulate the physiological and anatomical responses of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) during *in vitro* culture. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 137, n. 2, p. 397-410, 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PASQUAL, M. et al. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**. v. 29, n. 3, p. 324-329, 2011.

QUEIROGA, R.C.F.D. et al. Fisiologia e produção de cultivares de batata-doce em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**. v. 25, n. 3, p. 371-374, 2007.

REYNOLDS, O.L. et al. Silicon: Potential to Promote Direct and Indirect Effects on Plant Defense Against Arthropod Pests in Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 744, p. 1-13, 2016.

RODRIGUES, F.A. Application of silicon sources in yam (*Dioscorea* spp.) micropropagation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n.11, p. 1469-1473, 2017.

RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated development for R** [Computer software]. Boston, MA: RStudio, Inc. Disponível unter, 2016. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>. Acesso em: 10 out. 2019.

SILVA, G.O.D. et al. Desempenho de cultivares de batata-doce para caracteres relacionados com o rendimento de raiz. **Revista Ceres**, v. 62, n. 4, p. 379-383, 2015.

SOARES, J.D.R. et al. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo Cattleya. **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 33, p. 503-507, 2011.

SOUZA, G. et al. Caracterização de material compósito diatomáceo natural. **Cerâmica**. v. 49, n. 309, 40-43, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 2006. 719 p.

ARTIGO 4 - Acclimatization of sweet potatoes under *in vitro* application of diatomaceous earth

ABSTRACT

Diatomaceous earth is a naturally occurring material of organic origin that is rich in silicon. This silicon source can be used in organic agriculture, with its *in vitro* application used in the acclimatization of crops. However, there are no reports of the effects of diatomaceous earth supplementation on the micropropagation of sweet potato cv. 'Brazlândia Branca' (*Ipomoea batatas*) (white sweet potato). Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of different concentrations of diatomaceous earth applied *in vitro* on the growth, physiology and anatomy of sweet potato cv. 'Brazlândia Branca' after acclimatization. Sweet potato nodal segments pre-established *in vitro* were inoculated in MS medium supplemented with 60 g L⁻¹ sucrose and solidified with 5.5 g L⁻¹ of nutrient agar, with pH 5.8. Four concentrations of diatomaceous earth, 1, 2, 3 and 4 g L⁻¹, and MS medium without diatomaceous earth as a control treatment were tested. After 30 days of *in vitro* cultivation, the plants were transferred to a greenhouse for acclimatization for 45 days. The experimental design was completely randomized. The supplementation of diatomaceous earth in the *in vitro* cultivation had beneficial effects, increasing the accumulation of biomass, improving the photosynthetic apparatus and promoting favorable anatomical characteristics during the acclimatization of the sweet potato plants. In addition, the use of diatomaceous earth achieved adequate seedling development, with higher seedling quality and resistance to biotic and abiotic effects than attained with control treatment.

Keywords: Micropropagation. Physiology. Leaf anatomy. *Ipomoea batatas*.

1 INTRODUCTION

Sweet potato (*Ipomoea batatas*) is a popular crop grown in all Brazilian states. Due to its roots, hardiness, high adaptability and large production capacity, it has economic and social importance (FLORES et al., 2015). The sweet potato originated in Central and South America (LOEBENSTEIN, 2009).

Sweet potato is vegetatively propagated via branches or stems and can be produced under difficult growth conditions; however, some factors can cause decreased production, such as pests and diseases. In the cultivation of sweet potato, 270 species of insects that can attack the crop in the field or in storage have been recorded; although high levels of losses are not common in well-managed crops, the damage can be high under poor crop management (WANDERLEY et al., 2004). Some insects cause damage to the leaf surface, roots and pulp (OLIVEIRA et al., 2015).

There are reports in the literature that silicon (Si), in its amorphous silica form, accumulates in the cell wall, forming a protective layer that acts as a barrier of mechanical resistance to the invasion of diseases and pests (BARBOSA FILHO et al., 2001). This element has high potential in agriculture because its benefits have direct effects on crop productivity, significantly improving resistance against pests and diseases (ALVES et al., 2015; REYNOLDS et al., 2016).

Studies of the effects of Si applied to sweet potato micropropagation are scarce. However, studies of *in vitro* cultivation with silicon have been conducted with other crops, such as yam (RODRIGUES et al., 2017) banana (ASMAR et al., 2013a), strawberry (BRAGA et al., 2009), orchids (SOARES et al., 2011), *Anthurium* (DIAS et al., 2017) and *Billbergia zebrina* (MARTINS et al., 2018). These studies show that changes to the culture medium, such as the addition of silicon sources, can have beneficial effects on plants. This element also causes structural and physiological changes during acclimatization, improving the photosynthetic apparatus (ASMAR et al., 2013b).

The acclimatization process is a critical stage of micropropagation, which is the passage from the *in vitro* phase to the greenhouse, during which the seedlings are influenced by water, phytosanitary treatment, nutrient absorption and photosynthesis, causing variation in plants growth (LOPES DA SILVA et al., 2011). During this process, it is necessary for the seedlings to decrease the environments effects and improve the conditions for their growth and development.

Silicon has characteristics beneficial to plants, such as its accumulation in the cell wall; this accumulation creates a barrier that reduces water loss by evapotranspiration and improves plant adaptation to water stress, reducing the plant's water demands and increasing its resistance to drought (SANGSTER et al., 2001). During acclimatization, this characteristic lowers the percent mortality of micropropagated plants due to reduced water loss and increased photosynthetic capacity and growth (EPSTEIN, 1999).

Thus, diatomaceous earth, as an organic and naturally occurring source of silicon, is used in organic agriculture. It reduces the amount of chemical inputs required during cultivation and improves the growth and development of plants. However, there is little research on the growth and development of horticultural crops treated with diatomaceous earth, which is mainly used for seedling acclimatization.

As diatomaceous earth is a natural compound with high silicon content that can benefit the growth and development of plants and in light of the scarcity of information on its use with sweet potato, the present study aimed to evaluate the effects of different concentrations of diatomaceous earth during *in vitro* cultivation on the growth, physiology and anatomy of sweet potato cv. 'Brazlândia Branca' after acclimatization.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant materials and growth environment

The plant materials in this study were plants propagated *in vitro* through the cultivation of meristems. Parent plants of the cultivar 'Brazlândia Branca' were obtained from the Department of Agriculture (Departamento de Agricultura, DAG) of the Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras, UFLA), Lavras-MG. At the DAG/UFLA Plant Tissue Culture Laboratory, the plants were multiplied using nodal segments 0.5 cm in length. The segments were inoculated in test tubes containing 15 mL of MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 60 g L⁻¹ sucrose and 5.5 g L⁻¹ agar, with pH adjusted to 5.8. The tubes were then autoclaved at 121 °C and 1.0 atm for 20 min. Subsequently, the tubes were maintained in a growth chamber for 30 days under a photoperiod of 16 h and a temperature of 25 ± 2 °C, with artificial lighting provided by a white LED lamp yielding a mean irradiance of 49.4 μM m⁻² s⁻¹.

2.2 *In vitro* assay

After the period in the growth chamber, the plants were used as suppliers of explants for the assays. Each nodal segment of approximately 0.5 cm length was inoculated in a test tube containing 15 mL of either MS culture medium supplemented with diatomaceous earth at concentrations of 1, 2, 3 or 4 g L⁻¹ or MS medium without diatomaceous earth as a control. Each tube was supplemented with 60 g L⁻¹ of sucrose and 5.5 g L⁻¹ of agar, with pH adjusted to 5.8, and then autoclaved at 121 °C and 1.0 atm for 20 min. Subsequently, the tubes were maintained in a growth chamber under a photoperiod of 16 h and a temperature of 25 ± 2 °C,

with artificial lighting provided by a white LED lamp yielding an average irradiance of $49.4 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.3 Acclimatization

After 30 days of *in vitro* cultivation, the plants were removed from the vials, washed in running water to remove the excess culture medium adhered to the roots, and immediately transferred to 1-L pots filled with commercial Plantmax[®] substrate. The plants were placed in a greenhouse covered with transparent polyethylene film (150 microns) and 70% shade cloth and equipped with an intermittent misting system. The plants were maintained in the greenhouse for 45 days, corresponding to the months of September and October.

2.4 Gas exchange and chlorophyll determination

Gas exchange was measured with an IRGA Infra-Red Gas Analyzer (Licor - 6400XT, Li - Cor, Lincoln, NE, EUA). Completely expanded leaves from eight plants per treatment were selected, and measurements were started at 08:00. The photosynthetic photon flux density in the analyzer chamber was fixed to $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The following measurements were recorded: photosynthetic rate (A) in $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, transpiration rate (E) in $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stomatal conductance (gs) in $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and internal carbon (Ci).

For the determination of chlorophyll content, a ClorofiLOG meter (model Cfl 1030) was used, and measurements were performed on two fully expanded leaves of each plant.

2.5 Phytotechnical analysis

After 45 days, the number of leaves, shoot length (cm), root length (cm), fresh and dry mass of the shoot (g) and fresh and dry mass of the roots (g) were analyzed. The dry mass of the plant material was analyzed after drying in an oven Ar - SL-102/Solab to constant weight at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for 72 h.

2.6 Anatomical analysis

For the anatomical analysis, the median region of the second fully expanded leaf was used. Samples were collected from four different individuals of each treatment. Subsequently, the samples were transferred to vials with 70% alcohol, dehydrated in an alcohol series (70, 80, 90 and 100%) for 2 hours per alcohol concentration and then dried for 15 min under vacuum. Next, the samples were maintained for 24 h in a preinfiltration resin solution composed of 100% ethanol and liquid resin base (1:1) and then embedded with the HistoResin kit (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

Cross sections with a thickness of 8 μm were obtained with a semiautomatic rotating microtome, stained with toluidine blue and washed with distilled water to remove excess dye. Subsequently, the slides were mounted with stained glass varnish as mounting medium.

The slides were observed and photographed under an optical microscope (Motic BA 210) with a coupled camera (Moticam 5). For each replicate, ten photographs were taken using six slides of cross sections. The images were analyzed using Motic Images Plus 3.0 image analysis software.

Leaf thickness was assessed using adaxial epidermis thickness (AdET), abaxial epidermis thickness (AbET), palisade parenchyma thickness (PPT), spongy parenchyma thickness (SPT), mesophyll thickness (MT) and leaf blade thickness (LBT). To determine the thickness of root tissues, the following were evaluated: total area (TA), central cylinder area (CCA), epidermis thickness (ET) and cortical parenchyma thickness (CPT).

2.7 Silicon concentration

The plant material used to determine silicon concentration was dry shoot, which was attained by drying shoots to constant weight in a ventilated oven Ar - SL-102/Solab at 60 °C for 72 h; after this step, the shoots were ground. The determination of silicon was performed using the methodology proposed by Korndörfer et al., (2004). A total of 0.1 g of sample (dry, ground shoots) was placed in a polyethylene tube, to which 2.0 mL of 30% (v/v) of H_2O_2 and 3.0 mL of NaOH were added (25 mol L^{-1}). The tubes were sealed and autoclaved for 1 h at 123 °C and 0.15 MPa. After cooling, deionized water was added to complete volume. A 1-mL aliquot of the extract was transferred to a 20-mL flask, and deionized water was added to

complete volume. The concentration of silicon was determined by spectrophotometric analysis at 410 nm of the molybdosilicic acid yellow color formed after the reaction between silicon and ammonium molybdate in HCl medium.

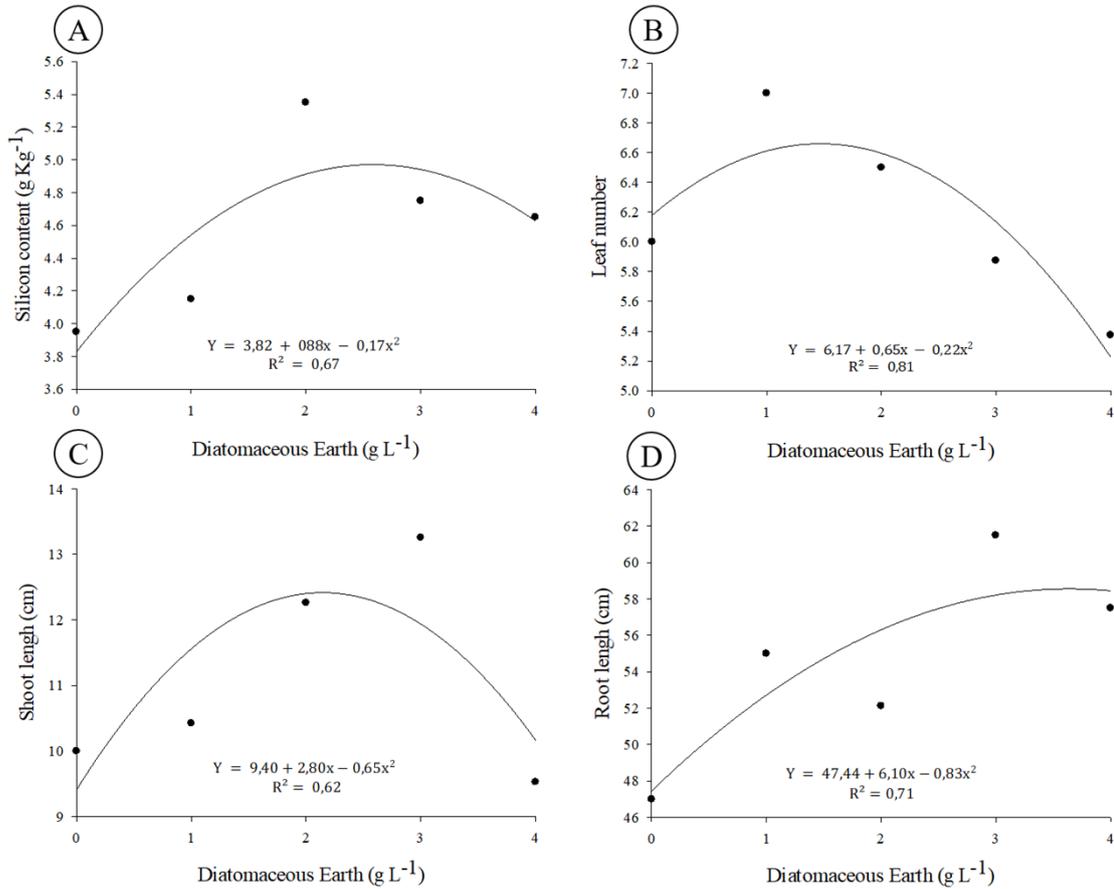
2.8 Statistical analysis

The experimental design was completely randomized, with four replicates (two seedlings per replicate). The data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and means were separated using the Tukey test at 5% probability or by regression according to model fit. The statistical analyses were performed with R software (v. 3.2.2).

3 RESULTS AND DISCUSSION

The diatomaceous earth of various concentrations influenced the growth of acclimated sweet potato seedlings. The silicon levels in the shoot of sweet potato increased with the addition of diatomaceous earth, with an estimated maximum level (5 g kg^{-1}) observed at a concentration of 2.58 g L^{-1} of diatomaceous earth. Relative to control treatment, 2 g L^{-1} of diatomaceous earth, yielded a 35% increase in silicon in the shoots of plants (FIGURE 1A). Following the application of calcium silicate in the *in vitro* cultivation of the Grand Naine banana plant, Asmar et al. (2013b) observed an increased silicon content in the shoots of acclimatized seedlings. Similar results were obtained by Almeida et al. (2009) in calla lilies, with silicon yielding an increase in the nutrient content in plant leaves. In a study of *B. zebrina* in which sodium silicate was used as the silicon source, Martins et al. (2018) found that relative to control plants, treated plants exhibited an increase in silicon absorption, resulting in 92% more silicon in treated plants than in controls.

Figure 1 - (A) Silicon content, (B) leaf number, (C) shoot length and (D) length of the largest root in sweet potato plants subjected to different concentrations of silicon (diatomaceous earth) and acclimated for 45 days.



Source: The author (2020).

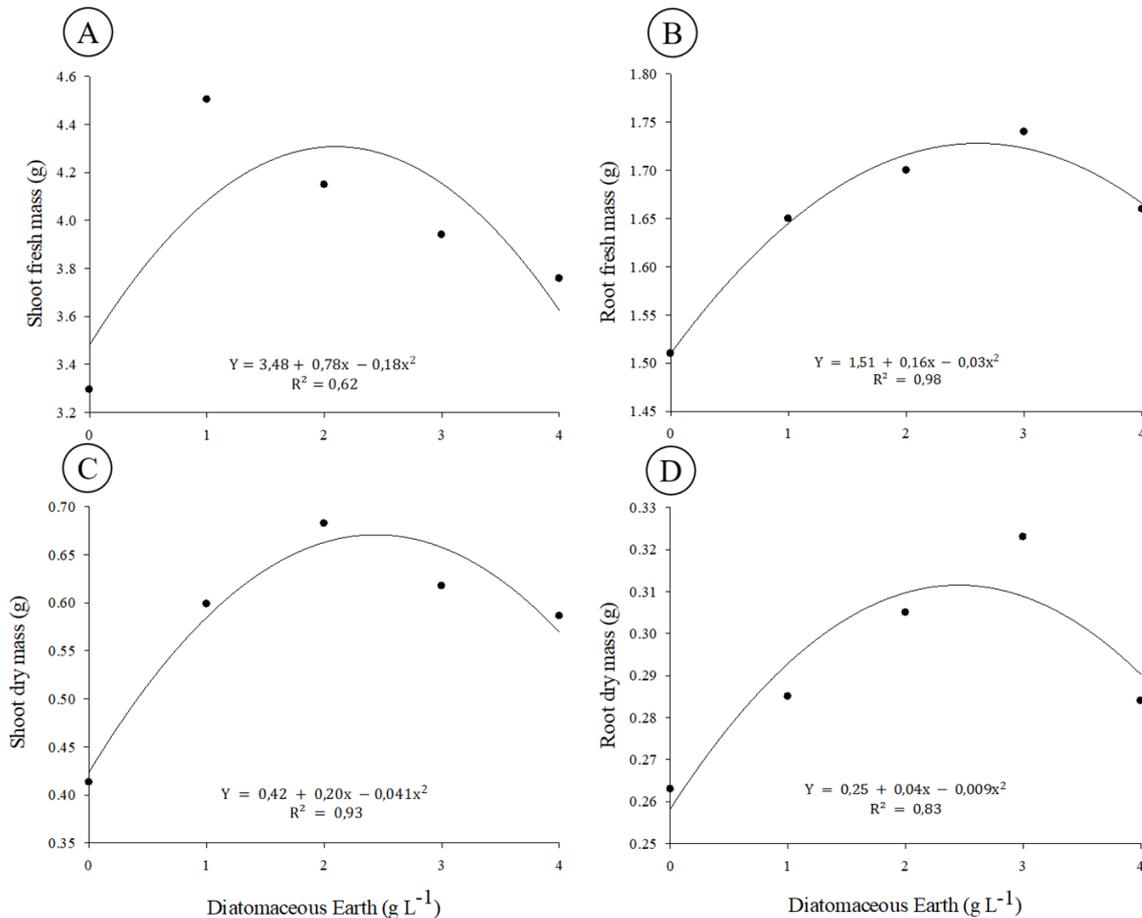
The silicon present in plants of treatments that did not receive diatomaceous earth possibly originated from the water used in the experiment. However, this possibility could not be confirmed, because the water used to prepare the culture medium or used in the irrigation system in the greenhouse was not tested for silicon. According to Lazzerini and Bonotto (2014), silicon is a very abundant element in nature, being present everywhere, including in water. The amount of absorbed silicon in the control plants was low relative to the amounts in plants from treatments that received diatomaceous earth.

As shown in Figure 1, there were significant effects of the concentration of diatomaceous earth on the number of leaves, shoot length and length of the largest root, with maximum values achieved with estimated additions of 1.52, 2.08 and 3.67 g L⁻¹, respectively, of diatomaceous earth. Similar results were obtained by Dias et al. (2017), who observed

increases in number of leaves and shoot length in response to the addition of sodium silicate in the *in vitro* cultivation of anthurium. Furthermore, Pasqual et al. (2011) observed a similar response in leaf number in two orchid species when calcium silicate was used as the silicon source. When studying the effect of the type of silicon source added to MS medium for yam micropropagation, Rodrigues et al. (2017) observed differences in the number of leaves between silicon-supplemented medium and control medium.

The addition of diatomaceous earth enhanced biomass accumulation in the shoots of the sweet potato plants, with maximum accumulation of fresh and dry biomass achieved under the estimated addition of 2.16 and 2.44 g L⁻¹, respectively, of diatomaceous earth. The use of this material at a dosage of 1 g L⁻¹ increased fresh shoot biomass relative to the control amount by 37%. Relative to that under control treatment, the dry shoot biomass under a concentration of 3 g L⁻¹ of diatomaceous earth was increased by almost 67% (Figure 2).

Figure 2 - (A) Shoot fresh mass, (B) root fresh mass, (C) shoot dry mass and (D) root dry mass of sweet potato plants subjected to different concentrations of silicon (diatomaceous earth) and acclimated for 45 days.



Source: The author (2020).

Root fresh and dry weight increased with increasing diatomaceous earth supplementation up to 2.66 and 2.22 g L⁻¹ of the product, respectively, demonstrating a quadratic relationship with diatomaceous earth concentration, and achieving gains of 15% and 23% relative to the control values (FIGURE 2). Asmar et al. (2013b) found increased shoot levels of silicon in banana with the addition of calcium silicate to the *in vitro* growth medium, which also favored higher biomass accumulation in the shoots and roots of the plants.

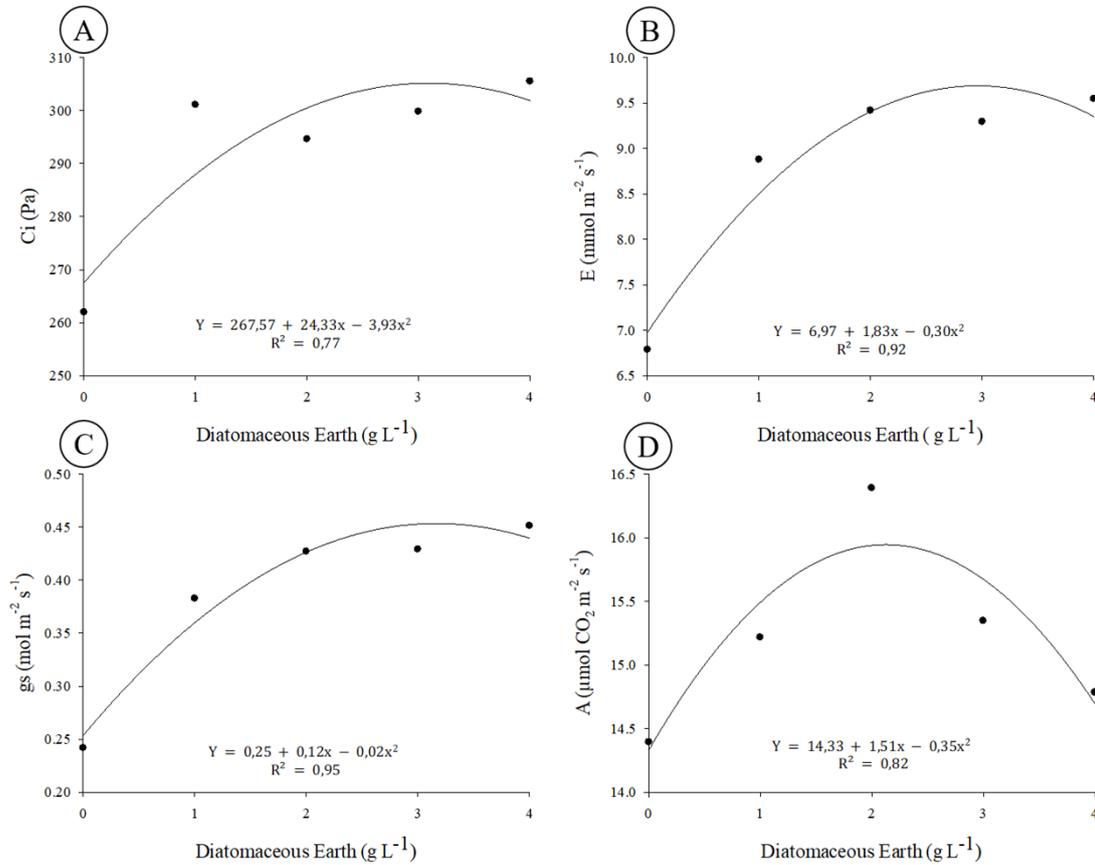
However, decreases in biomass were observed at higher concentrations of diatomaceous earth, possibly because any nutrient, including silicon, taken in excess may cause nutritional imbalances (DIAS et al., 2017).

The biomass results indicate that diatomaceous earth provides several benefits to plant development, increasing the capacity of nutrient absorption, producing seedlings of higher quality and with greater resistance to biotic and abiotic effects, thereby increasing the chances of cultivation success. Thus, diatomaceous earth can lead to higher seedling production, shorter cultivation time and, consequently, higher producer profit.

The photosynthetic efficiency (A) of the plants was increased when the plants were cultivated in the presence of diatomaceous earth, with the highest efficiency observed at the concentration of 2 g L⁻¹ (FIGURE 3D). This increase was a result of the increased stomatal conductance (gs) with the increase in internal carbon concentration and the higher content of chlorophyll *a* (FIGURE 4). Plant transpiration (E) was also increased in the presence of diatomaceous earth, with the highest rates observed at concentrations above 2 g L⁻¹. The pattern of E was consistent with that of gs, demonstrating a connection between these processes. Transpiration is important in the regulation of internal temperature and affects plant growth by controlling the flow of sap within the plant.

Stomatal conductance regulates gas exchange and is directly related to the photosynthetic process, thereby influencing plant growth and development (PAIVA et al., 2005). The results of the present study revealed a higher photosynthesis rate and greater stomatal conductance under treatment with diatomaceous earth than under control treatment, revealing an influence of diatomaceous earth on gas exchange.

Figure 3 - (A) Internal carbon (Ci); (B) transpiration (E); (C) stomatal conductance (gs) and photosynthesis (A) in sweet potato plants subjected to different concentrations of silicon (diatomaceous earth) and acclimated for 45 days.

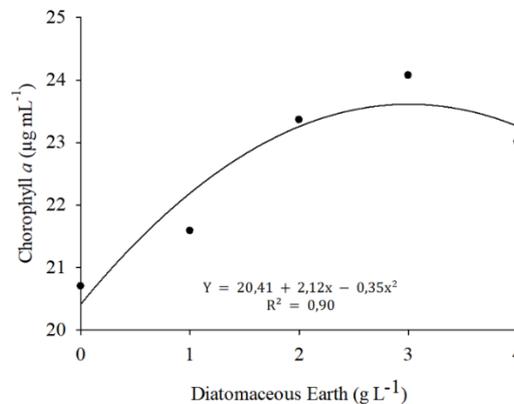


Source: The author (2020).

The amount of internal carbon (Ci) was positively influenced by the addition of diatomaceous earth; a higher concentration of Ci is associated with a greater carboxylation capacity of plants, which might have contributed to the increased photosynthetic rate observed in plants grown in the presence of diatomaceous earth. An increase in plant gs in response to diatomaceous earth was also observed; gs directly influences several parameters, such as Ci, A and E. Greater stomatal opening is associated with an increased capacity of gas exchange, facilitating CO₂ influx to the plant, which increases the levels of Ci, and the outflow of H₂O to the external environment, contributing to higher transpiration rates, as seen in the graphs below. Pinto et al. (2012) applied potassium silicate to a cocoa crop and found that with 3 ml L⁻¹ potassium silicate, the photosynthetic rate was increased by 44% relative to the control rate, whereas stomatal conductance, transpiration and internal carbon were not influenced by silicon addition.

Chlorophyll content increased with increasing concentration of diatomaceous earth from 2 g L⁻¹ and above (FIGURE 4). This result is consistent with the higher photosynthetic rate observed in plants grown in the presence of diatomaceous earth, as the presence and concentration of chlorophyll are directly related to the photosynthetic process. Chlorophyll a is the pigment directly involved in the photochemical phase of photosynthesis. According to Asmar et al. (2013b), the absorption of silicon brings several benefits, such as an increase in chlorophyll levels, thereby improving photosynthetic efficiency.

Figure 4 - Chlorophyll *a* content of sweet potato plants subjected to different concentrations of silicon (diatomaceous earth) and acclimated for 45 days.



Source: The author (2020).

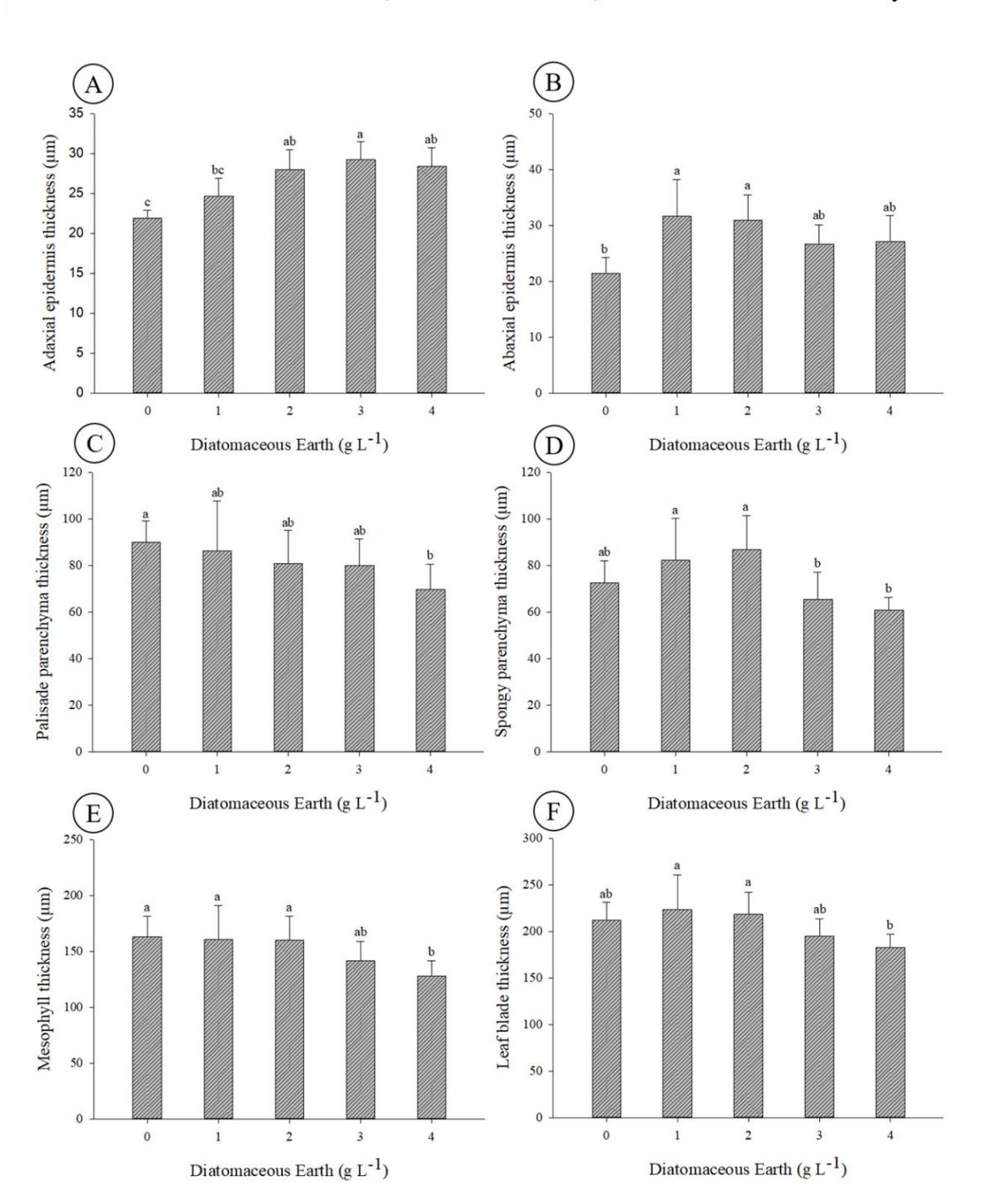
The treatments with higher photosynthetic rates, transpiration rates and chlorophyll contents had the highest accumulation of biomass. Biomass accumulation directly influences the growth and development of the plant throughout the cultivation cycle, culminating in higher productivity at the end of the crop cycle.

The results of the present study demonstrated the efficacy of silicon application in enhancing chlorophyll content in sweet potato, consistent with findings of Al-aghabary et al. (2005), who observed an increase in chlorophyll content in response to silicon supplementation. Similarly, Braga et al. (2009) reported higher chlorophyll contents in 'Oso Grande' strawberry when the medium was supplemented with a silicon source.

Analysis of the cross sections of the leaves of sweet potato seedlings grown *in vitro* and acclimatized in a greenhouse revealed significant effects of diatomaceous earth on all measures of leaf tissue thickness at all concentrations. The use of diatomaceous earth at 3 g L⁻¹ resulted in thicker adaxial epidermis than did other treatment concentrations, and a significant difference

was observed among the control treatment and the 1 g L⁻¹ treatment. Relative to control treatment, the 3 g L⁻¹ concentration of diatomaceous earth increased the adaxial epidermis thickness by 34% (FIGURE 5).

Figure 5 - Adaxial epidermis thickness (A), abaxial epidermis thickness (B), palisade parenchyma thickness (C), spongy parenchyma thickness (D), mesophyll thickness (E) and leaf blade thickness (F) of sweet potato plants subjected to different concentrations of silicon (diatomaceous earth) and acclimatized for 45 days.



Means represented by the same letter did not differ significantly by the Tukey test, at 5% probability.

Source: The author (2020).

Greater abaxial epidermis thickness was observed with the dose of diatomaceous earth at 1 and 2 g L⁻¹ than under the other treatments; however, significant differences were observed only among these treatments and the control (FIGURE 5). In the *in vitro* cultivation of 'Maçã' banana plants, greater thickness of the abaxial epidermis was obtained when using calcium silicate than when using other sources of silicate (ASMAR et al., 2013a). The responses of silicon accumulation and absorption in plants vary with the source and concentration used, how it is available, and plant species (ASMAR et al., 2013b; MARTINS et al., 2018).

The deposition of silicon in the cell wall leads to its accumulation in the leaves. This accumulation creates a protective barrier, making the plant more resistant to fungi and insects, preventing the loss of plant water, decreasing transpiration and aiding the acclimatization of micropropagated plants, which may increase the survival rate during acclimatization (PASQUAL et al., 2011; SILVA et al., 2008).

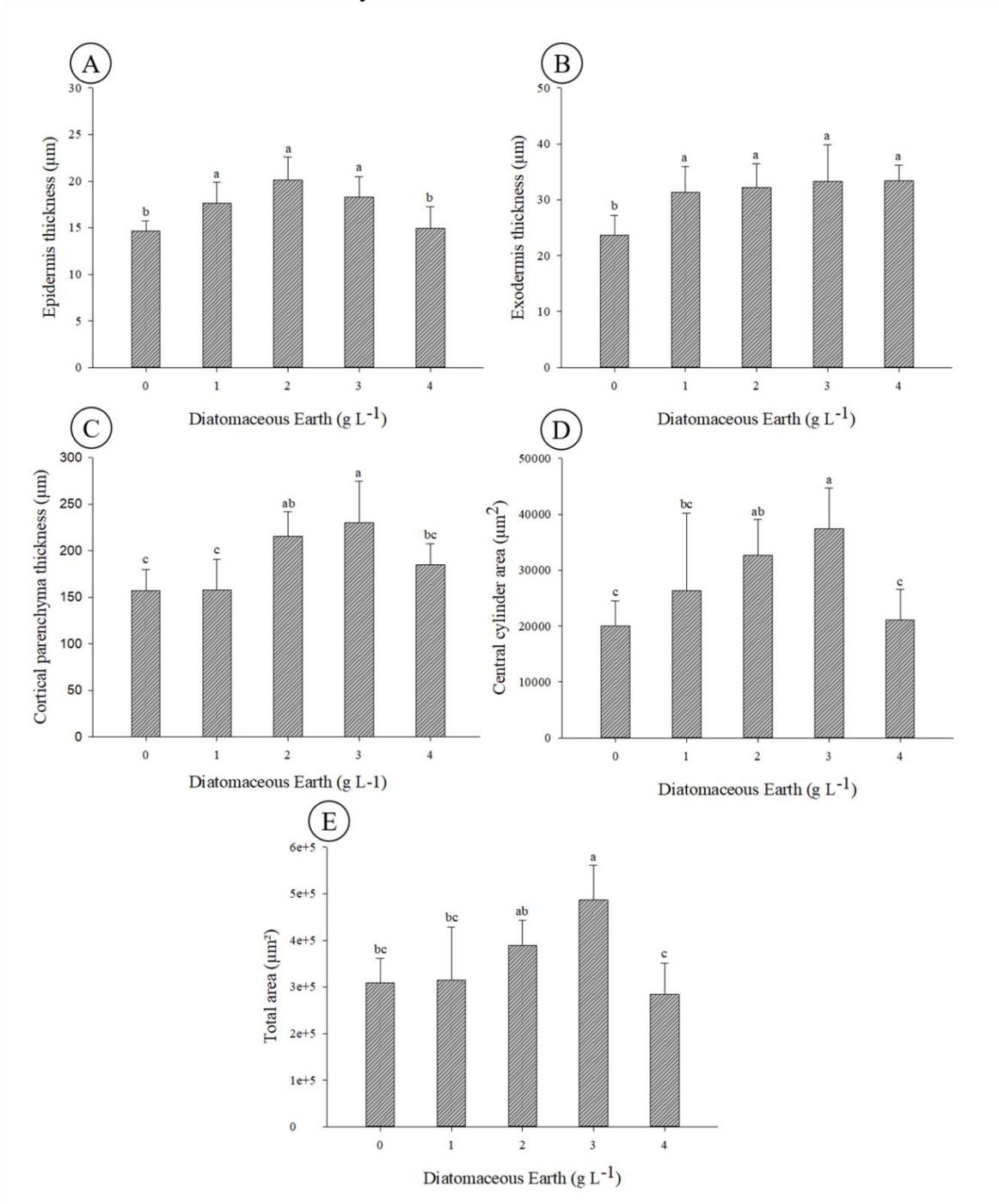
For palisade parenchyma and mesophyll thickness, the highest concentration of diatomaceous earth yielded values significantly lower than the control. The doses of 1 and 2 g L⁻¹ of diatomaceous earth resulted in higher thicknesses of the spongy parenchyma and leaf blade than did the other treatments; however, there were no significant differences from the control values (FIGURE 5). Braga et al. (2009), working with strawberries *in vitro* with different silicon sources, also observed increased thickness of the leaf blade under silicon supplementation. Plants with greater leaf blade thickness have higher chances of survival at the time of transfer to the greenhouse, with blade thickness being a determining factor in tissue culture (BARBOZA et al., 2006).

The greatest influence of diatomaceous earth on leaf anatomy was observed for epidermal thickness, both adaxial and abaxial, with lower values observed in the control treatment than in all of the other treatments. For the other variables, no increases were observed under the addition of diatomaceous earth. High concentrations of diatomaceous earth tended to reduce the thickness of the internal tissues of the leaf.

These changes in the leaf anatomy of acclimatized seedlings are directly related to photosynthetic rate and transpiration, contributing positively to the growth and development of sweet potato seedlings. Furthermore, such changes enhance adaptation to the greenhouse during the acclimatization process and, consequently, the responses to field conditions (SILVA et al., 2012).

Significant effects of diatomaceous earth addition were observed for all parameters related to root tissue thickness. Epidermis and exodermis thickness increased with supplementation with diatomaceous earth, with largely equal values across treatments, with significant differences from the control values. Epidermis thickness at the concentration of 2 g L⁻¹ was increased by 37% relative to the control value (FIGURE 6).

Figure 6 - Epidermis thickness (A), exodermis thickness (B), cortical parenchyma thickness (C), central cylinder area (D) and total area (E) of the root system of sweet potato plants subjected to different concentrations of silicon (diatomaceous earth) and acclimatized for 45 days.



Means represented by the same letter did not differ significantly by the Tukey test, at 5% probability.

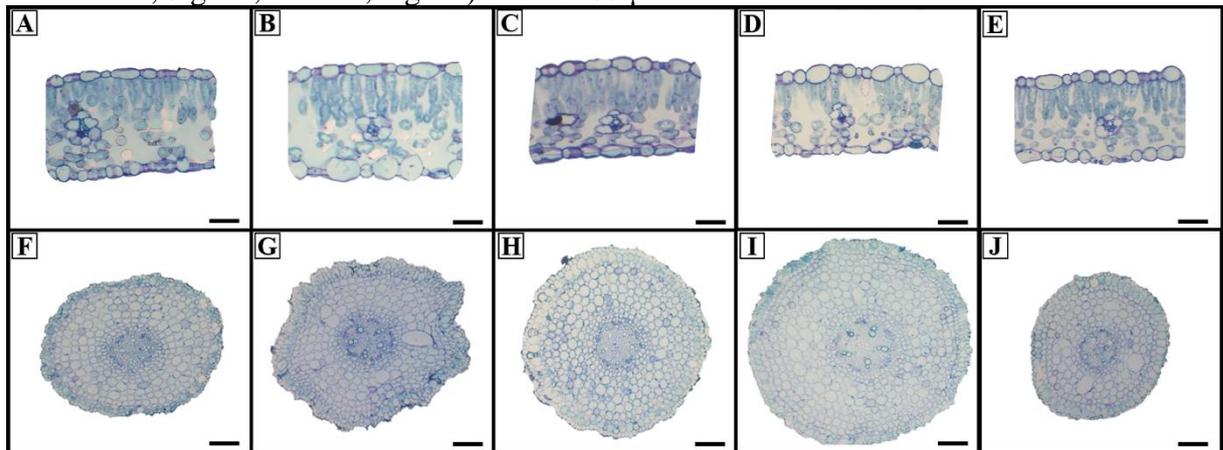
Source: The author (2020).

The highest values of cortical parenchyma thickness, central cylinder area and total area were observed with doses of diatomaceous earth of 2 and 3 g L⁻¹; these values which were

significantly different from the corresponding control values and those at the dose of 4 g L⁻¹. The increases in these variables with 3 g L⁻¹ of diatomaceous earth relative to the control values were greater than 50% (FIGURE 6C).

The images of the anatomical sections of the acclimatized sweet potato seedlings (FIGURE 7) reveal differences among treatments in the thicknesses of the leaf and root tissues, corroborating the quantitative results and demonstrating the desirable responses achieved using diatomaceous earth. The silicon-induced changes in the thicknesses of the tissues, both leaf and root, influenced the accumulation of plant biomass and improved nutrient absorption, cell rigidity and plant water maintenance. These effects improved the acclimatization ability of the seedlings, allowing the plants to maintain adequate growth and development (ASMAR et al., 2011).

Figure 7 - Cross sections of leaves (A to E) and roots (F to J) of sweet potato cv. 'Brazlândia Branca' grown with different concentrations of diatomaceous earth *in vitro* and acclimatized for 45 days (A and F, control; B and G, 1 g L⁻¹; C and H, 2 g L⁻¹; D and I, 3 g L⁻¹; E and J, 4 g L⁻¹). Bar = 100 µm.



Source: The author (2020).

Supplementation with diatomaceous earth at various concentrations had a great influence on the performance of sweet potato seedlings during acclimatization to *in vitro* cultivation, with results superior to control treatment. Changes in the anatomical structure of leaf and root tissues were observed in the seedlings, in addition to increased photosynthetic rates, chlorophyll contents and biomass, leading to improved production of the sweet potato seedlings. These findings highlight the importance of this study. However, high concentrations of diatomaceous earth did not have positive effects on seedling development.

4 CONCLUSIONS

The use of diatomaceous earth *in vitro* provides as low cost and benefits during the acclimatization process by increasing biomass, photosynthetic rate and chlorophyll *a* content and improving the anatomical parameters of sweet potatoes, which directly influence the growth and development of the plants throughout the production cycle at the concentration of 2 and 3 g L⁻¹. The use of diatomaceous earth is strongly encouraged because it results in anatomical characteristics that favor the adaptation of seedlings to field conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

REFERENCES

- AL-AGHABARY, K.; ZHU, Z.; SHI, Q. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. **Journal Plant Nutrition**, v. 27, n. 12, p. 2101-2115, 2005.
- ALMEIDA, E.F.A. et al. Efeito do silício no desenvolvimento e na nutrição mineral de copo-de-leite. **Ornamental Horticultura**, v. 15, n. 2, p. 103-113, 2009.
- ALVES, A.O. et al. Use of silicon for reducing the severity of bacterial wilt of sweet pepper. **Journal Plant Pathology**. v. 97, n. 3, 419-429, 2015.
- ASMAR, S.A. et al. Changes in leaf anatomy and photosynthesis of micropropagated banana plantlets under different silicon sources. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 328-332, 2013a.
- ASMAR, S.A. et al. Morphophysiological characteristics of acclimatized 'Grande Naine' banana plants in response to *in vitro* use of silicon. **Semina Ciência Agrária**. v. 34, n. 1, p. 73-82, 2013b.
- ASMAR, S.A. et al. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira 'Maçã' micropropagadas. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1127-1131, 2011.
- BARBOSA FILHO, M.P. et al. Silicato de cálcio como fonte de silício para o arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciencia Solo**, v. 25, p. 325-330, 2001.
- BARBOZA, S.B.S.C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 185-194, 2006.
- BRAGA, F.T. et al. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 44, p. 128-132, 2009.
- DIAS, G.D.M.G. et al. Morphological and physiological characteristics *in vitro* anthurium plantlets exposed to silicon. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 18-24, 2017.
- EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 641-664, 1999.
- FLORES, R. et al. Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas*. **Revista Ciência Agrária**, v. 38, p. 429-437, 2015.
- KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA H.S.; NOLLA, A. **Análise de silício: solo, planta e fertilizante**. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia (Boletim técnico), 2004, 34 p.
- LAZZERINI, F.T.; BONOTTO, D.M. O silício em águas subterrâneas do Brasil. **Ciência Natura**, v. 36, n. 2, p. 159-168, 2014.

- LOEBENSTEIN, G. Origin, Distribution and Economic Importance, In: Loebenstein, G., Thottappilly, G. (Eds.), **The Sweet potato**. Springer Netherlands: Dordrecht. 2009. p. 9-12.
- LOPES DA SILVA, A.L. et al. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Sm. **Revista Acadêmica: Ciência Agrária Ambiental**, v. 9, p. 179, 2011.
- MARTINS, A.D. et al. Morpho-physiological changes in *Billbergia zebrina* due to the use of silicates *in vitro*. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**. 90, 3449-3462, 2018.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, A.M. et al. Características produtivas de clones de batata-doce cultivados em três períodos de cultivo em São Cristóvão-SE. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 377-382, 2005.
- PAIVA, A.S. et al. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, p. 161-169, 2005.
- PASQUAL, M. et al. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 324-329, 2011.
- PINTO, D.G. et al. Alterações fisiológicas após aplicação de silício em cacau e sua influência na preferência por pulgões. **Revista Ceres**, v. 59, p. 360-367, 2012.
- REYNOLDS, O.L. et al. Silicon: Potential to Promote Direct and Indirect Effects on Plant Defense Against Arthropod Pests in Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 744, p. 1-13, 2016.
- RODRIGUES, F.A. et al. Application of silicon sources in yam (*Dioscorea* spp.) micropropagation. **Australian Journal Crop Science**, v. 11, p. 1469-1473, 2017.
- RSTUDIO TEAM. **RStudio**: Integrated development for R [Computer software]. Boston, MA: RStudio, Inc. Disponível unter, 2016. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>. Acesso em: 10 out. 2019.
- SANGSTER, A.G.; HODSON, M.J.; TUBB, H.J. Chapter 5. **Silicon deposition in higher plants**. In: DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; KORNDÖRFER, G.H. (Eds.). *Studies in Plant Science*: Elsevier, 2001, p. 85-113.
- SILVA, A.B. et al. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciência**, v. 33, n. 11, p. 839-843, 2008.
- SILVA, A.B.D. et al. Morfofisiologia e anatomia foliar de mudas micropropagadas e aclimatizadas de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne em diferentes substratos. **Revista Ceres**, v. 59, 580-586, 2012.

SOARES, J.D.R. et al. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum Agronomy**, 33, 503-507, 2011.

WANDERLEY, P.A.; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; WANDERLEY, M.J.A. Resistência de cultivares de batata-doce a *Euscepes postfasciatus* Fairmaire (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 371-377, 2004.