



EDUARDA DE OLIVEIRA

**ÁCIDOS HÚMICOS E ÁCIDOS FÚLVICOS NA INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA AO ESTRESSE SALINO NA CULTURA DO
MORANGO**

**LAVRAS – MG
2020**

EDUARDA DE OLIVEIRA

**ÁCIDOS HÚMICOS E ÁCIDOS FÚLVICOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO
ESTRESSE SALINO NA CULTURA DO MORANGO**

Dissertação 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 Mestre.

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

**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, Eduarda de.

Ácidos húmicos e ácidos fúlvicos na indução de resistência ao estresse salino na cultura do morango / Eduarda de Oliveira. - 2020.
47 p. : il.

Orientador(a): Moacir Pasqual.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Salinidade. 2. Substâncias húmicas. 3. Estresse salino. I. Pasqual, Moacir. III. Título.

EDUARDA DE OLIVEIRA

**ÁCIDOS HÚMICOS E ÁCIDOS FÚLVICOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO
ESTRESSE SALINO NA CULTURA DO MORANGO**

**HUMIC ACIDS AND FULVIC ACIDS IN THE INDUCTION OF RESISTANCE TO
SALINE STRESS IN STRAWBERRY CULTURE**

Dissertação 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 Mestre.

Aprovada em 30 de outubro de 2020.

Dra. Joyce Dória Rodrigues UFLA

Dra. Priscila Pereira Botrel IFSULDEMINAS, Campus Muzambinho

Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

**LAVRAS - MG
2020**

A Deus, por me dar a oportunidade e a capacidade para realizar meu trabalho.

Aos meus pais, Cleide e João Batista.

À minha avó Aracy, tios e ao meu irmão Eduardo.

Ao meu namorado Rodrigo.

Sem vocês teria sido muito difícil!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e por me permitir viver e realizar meus sonhos, pois a concessão do título de Mestre é um sonho para mim e para toda a minha família.

Agradeço aos meus pais, por sempre me oferecerem o melhor. Pai, obrigada por confiar e me emprestar seu carro nesses anos do mestrado, sem ele não conseguiria chegar até Lavras, e mamãe, obrigada sempre por me motivar e dizer que sou capaz, sem vocês nada disso teria acontecido.

Ao meu irmão Eduardo, por ser meu espelho como profissional e por tudo que me ajudou nessa jornada. À minha cunhada Tamiris e à minha afilhada Vitória, que sempre me proporcionaram momentos de alegria. À minha avó Aracy, à Má, ao Nem, ao None e à Nara, que sempre me ajudaram no que eu precisava.

Ao meu namorado Rodrigo, que me ajudou desde o dia que fui prestar a prova de seleção. Você foi o presente mais lindo que a vida me proporcionou, é minha motivação, minha alegria. Obrigada por tudo, sem você não conseguiria ter concluído o mestrado, passamos e superamos juntos cada obstáculo. Minha admiração vai muito além do nosso namoro, gratidão eterna. Te amo.

Ao meu orientador Moacir Pasqual, que me concedeu a oportunidade de realizar o curso de mestrado concomitante ao meu trabalho. Obrigada professor, por entender e me ajudar nas minhas dificuldades, serei eternamente grata. Você é um exemplo de profissional e de ser humano.

À banca, Joyce Doria e a Priscila Pereira Botrel, por aceitarem o convite, é uma honra ter vocês para acrescentar informações à minha dissertação.

Ao Adalvan que me auxiliou no planejamento e execução experimental. Aos laboratoristas Filipe e Vantuil, por sempre me auxiliarem em momentos de incertezas. À Lilian, por me ajudar no experimento, sem você ficaria muito difícil a execução do trabalho. Às amigas que fiz no mestrado: Michele, Graci, Mariana e Thaís, sempre levarei vocês no meu coração. À Marli, secretária da pós-graduação, sempre prestativa e me oferecendo conselhos que levarei para por toda a vida.

À minha amiga Michele, você foi meu anjo da guarda no mestrado, desde o dia que nos conhecemos e até na escrita da dissertação você esteve comigo. Me acolheu em sua casa, me auxiliou no projeto sempre com alto astral e alegria. Te agradeço imensamente pelos seus ensinamentos, você é um exemplo de pessoa e profissional. Agradeço também ao Zé, pois sempre estava disposto a me ajudar.

Ao Instituto Federal do Sul de Minas, Campus Muzambinho, onde tudo começou, por me proporcionar uma história linda. Meu maior orgulho é trabalhar nessa Instituição de EXCELÊNCIA. Ao ex-diretor Luiz Carlos Machado Rodrigues, que me ofertou meu primeiro emprego na Fazenda Experimental de Guaxupé, e me apoiou para conciliar o emprego com o mestrado.

Ao Felipe Campos Figueiredo, que além de coordenador de trabalho, sempre me ajudou com seus ensinamentos, conselhos e apoio. Você foi fundamental na minha trajetória, foi meu orientador em Muzambinho. Um exemplo profissional.

Aos meus colegas de trabalho, Luizão e Armando, vocês sempre me motivaram. Muito obrigada pelas palavras bonitas que falavam quando eu estava desanimada.

Aos alunos da Agrifort Jr, principalmente à Júlia G., Amanda M., Maisa C., Otávio M., Paulazine, Bruno S., João Pedro M., Tucura e Renan, pela convivência e trabalho em equipe. Participar na formação profissional de vocês é um presente.

Aos meus amigos Yara L., Guilherme T., Laís C., Júlia G., Lívia S. Gabi X. e Jaque M., por sermos confidentes e trocar nossas experiências. De forma especial, queria agradecer à minha amiga Jéssica B. Obrigada por tudo que me ajudou no trabalho, e pelos conselhos, você é um ser humano de luz.

À São Cristóvão, padroeiro dos motoristas, que sempre me protegeu nessas idas e vindas de Lavras. Aos caroneiros que levei nesses dois anos, pelas conversas, e por fazer a viagem semanal ser menos cansativa.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura, por me permitirem usufruir da estrutura magnífica. À professora Heloísa, do departamento de sementes, pela concessão das análises enzimáticas. Aos professores, pelas aulas excelentes e por contribuírem de forma significativa na minha formação acadêmica.

Foram anos de luta, aprendizado profissional e autoconhecimento pessoal.

Muito obrigada!

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

RESUMO

Os estresses abióticos causam inúmeros malefícios as culturas, como limitação no crescimento e declínio na produtividade das plantas. O estresse salino é um dos principais vilões dessas limitações. O morango é uma fruta consumida mundialmente, rica em nutrientes e flavonoides, possui propriedades antioxidantes e alta demanda pela população. A necessidade do aumento de produtividade torna a busca por plantas mais tolerantes aos estresses abióticos, uma demanda urgente. Nesse sentido, processos empregados através da cultura de tecidos vegetais apresentam-se como uma ferramenta potente, pois aceleram estudos auxiliando no entendimento de processo e, conseqüentemente, contribuindo para o melhoramento vegetal. Dentre os indutores de resistências ou produtos que mitiguem esses estresses estudados destacam-se o uso de microrganismos como a rizobactérias, nutrientes como o silício, biofertilizantes, e os ácidos orgânicos, como os ácidos húmicos e fúlvicos. O objetivo do trabalho foi investigar se os ácidos húmicos e ácidos fúlvicos promovem resistência ao estresse salino em plantas de morango. A indução ao estresse salino nas mudas foi realizada *in vitro*, e, posteriormente, as plantas foram levadas à casa de vegetação e cultivadas em situação de estresse para verificar possível eficiência do processo. Foi analisada a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e a ocorrência de peroxidação lipídica, o acúmulo de clorofilas e carotenoides, e o acúmulo de macronutrientes e micronutrientes. Além das análises de crescimento do comprimento da parte aérea, sistema radicular, número de brotos e folhas, e massa seca. Os dados foram submetidos ao Teste t, e quando significativos, à análise de regressão. Diante dos resultados, foi possível verificar que a concentração de sal utilizada *in vitro* foi suficiente para ocasionar estresse nas plantas. Observou-se uma relação direta entre o aumento das concentrações de ácidos húmicos e fúlvicos e aumento da atividade do sistema de defesa vegetal em resposta ao sal aplicado durante o crescimento das mudas em casa de vegetação, sugerindo que plantas desenvolvidas *in vitro*, na presença dos ácidos respondem ao estresse biótico de forma mais rápida. Os ácidos também propiciaram um efeito positivo no aumento do teor de clorofila das mudas expostas ao estresse. Concluímos que os ácidos húmicos e fúlvicos podem ser utilizados *in vitro* para produzir mudas de morangueiros mais responsivas ao estresse por salinidade. O aumento gradativo das concentrações de ambos os ácidos aumenta a resposta das plantas a situação de estresse.

Palavras chaves: Estresse salino. Indutores de resistência. Ácidos húmicos. Ácidos fúlvicos.

ABSTRACT

Abiotic stresses cause numerous harms such as crops, such as limiting plant growth and declining plant productivity. Saline stress is one of the main villains of limitations. The strawberry is a fruit consumed worldwide, rich in nutrients and flavonoids, has antioxidant properties, and high demand by the population. The need for increased productivity and the search for plants more tolerant to abiotic stresses is an urgent demand. In this sense, employees employed in the culture of organic tissues, as they speed up studies helping to understand the process and consequently contributing to plant breeding. Among the resistance inducers or products that mitigate these studied stresses, we highlight the use of microorganisms such as rhizobacteria, nutrients such as silicon, biofertilizers, and organic acids, such as humic and fulvic acids. The objective of the work was to investigate whether humic acids and fulvic acids promote resistance to salt stress in strawberry plants. The induction of salt stress in the seedlings was carried out in vitro, afterwards, as the plants were taken to the greenhouse and grown under stress to verify possible efficiency of the process. The activity of catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and the occurrence of lipid peroxidation was analyzed. The accumulation of chlorophylls and carotenoids, and the accumulation of macronutrients and micronutrients. In addition to the growth analysis of shoot length, root system, number of shoots and leaves, dry matter. The data were discovered on the test and when tested for regression analysis. In view of the results, it was possible to verify that the concentration of salt used in vitro was sufficient to cause stress in plants. There was a direct relationship between the increased needs for humic and fulvic acids and increased activity of the plant defense system in response to the planned salt during seedling growth in the greenhouse, suggesting that plants developed in vitro in the presence of acids to biotic stress more quickly. The acids also had a positive effect in increasing the chlorophyll content of the seedlings exposed to stress. We conclude that humic and fulvic acids can be used in vitro to produce strawberry seedlings that are more responsive to salinity stress. The gradual increase of both acids increases the response of plants to stress.

Keywords: Saline stress. Resistance inducers. Humic acids. Fulvic acids.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Descrição botânica do morangueiro.....	13
2.2	Micropropagação	14
2.3	Estresse salino	15
2.4	Utilização de indutores de resistência ao estresse salino	16
2.5	Ácidos orgânicos: ácidos fúlvicos e ácidos húmicos.....	17
3	MATERIAL E METODOS	20
3.1	Material vegetal e delineamento experimental	20
3.2	Indução de resistência ao estresse salino <i>in vitro</i>	21
3.3	Desenvolvimento das plantas em casa de vegetação	21
3.4	Peroxidação lipídica (MDA)	21
3.5	Superóxido Dismutase (SOD)	22
3.6	Catalase (CAT).....	22
3.7	Ascorbato Peroxidase (APX)	22
3.8	Análises fitotécnicas	22
3.9	Teor de clorofila	23
3.10	Acúmulo de nutrientes	23
3.11	Análise estatística.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1	Características fisiológicas e bioquímicas	24
4.2	Avaliações de crescimento e acúmulo de macro e micronutrientes	30
5	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	ANEXO.....	47

1 INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um dos frutos mais populares do Brasil, sendo a espécie de maior expressão comercial dentre as pequenas frutas, consumido *in natura* ou na forma de produtos manufaturados (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Espécie pertencente à família Rosaceae, é considerado um pseudofruto não climatérico perene, rasteira e herbácea (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011). Apresenta ampla distribuição geográfica, uma vez que possui alta capacidade adaptativa às condições do clima. É cultivado nas regiões Nordeste, Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil, podendo se destacar os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, como os maiores produtores nacionais (SOUSA *et al.*, 2014; CUNHA JUNIOR *et al.*, 2012).

Sua propagação acontece de forma vegetativa, geralmente através de estolhos que se originam na planta-mãe e enraízam em condições de fotoperíodo longo, temperatura elevada, formando novas plantas. Entretanto, quando propagado desta forma, a taxa de propagação de plantas portadoras de vírus é muito elevada (FULTON; MCGREW, 1970), reduzindo a qualidade das plantas clonadas.

Com isso, o cultivo *in vitro* é uma opção interessante para propagação do morangueiro, pois auxilia na produção em escala comercial de mudas de qualidade, em curto espaço de tempo e livres de pragas e doenças. A propagação *in vitro* consiste em técnicas baseadas na totipotência celular dos vegetais, em que pequenos fragmentos de tecido vegetal, podendo ser raiz, gemas, meristemas, folhas, denominados explantes. São cultivados em meio de cultura em condições totalmente assépticas, possibilitando a multiplicação em massa de indivíduos, a conservação de espécies e a produção de plantas isentas de microorganismos (SANTOS *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017). A micropropagação do morangueiro ocorre a partir do isolamento do meristema, onde há a total certeza da isenção de vírus (GARCÍA-GONZÁLES *et al.*, 2010).

Durante o processo de cultivo *in vitro*, os explantes são submetidos a condições específicas no microambiente em que estão sendo cultivados, onde os componentes do meio de cultura, a adição exógena de reguladores de crescimento, a umidade dentro dos frascos de cultivo, a luz e a temperatura, podem se tornar um fator limitante para seu ideal desenvolvimento, e podem auxiliar sua sobrevivência pós aclimatização (US-CAMAS *et al.*, 2014).

A salinidade é um dos principais estresses ambientais que afetam negativamente o crescimento e o metabolismo vegetal, além de ser um dos fatores responsáveis pelo decréscimo da produtividade (SILVA *et al.*, 2013). O uso de água com alta concentração de sais pode inibir

o crescimento das plantas em razão da redução do potencial osmótico da solução do solo, restringindo a disponibilidade de água e/ou pela acumulação excessiva de íons nos tecidos vegetais, podendo ocasionar toxicidade iônica, desequilíbrio nutricional, ou ambos (SOUZA; BEZZERRA; FARIAS, 2010).

Diante desse fato, observa-se estudos evidenciando a ação positiva do uso de biofertilizantes atenuando parcialmente os efeitos da salinidade da água na formação de mudas de frutíferas como a goiabeira (CAVALCANTE *et al.*, 2010), nim (NUNES *et al.*, 2012) e oiticica (DINIZ NETO *et al.*, 2014) devido a presença de substâncias húmicas, contidas nos insumos orgânicos, proporcionarem uma maior regulação osmótica entre a raiz e a solução do solo, além de diminuir a intensidade dos efeitos tóxicos dos sais ao crescimento das plantas (AYDIN; KANT; TURAN, 2012).

Nesse contexto, onde os trabalhos propõem estudar os efeitos maléficos do estresse salino, bem como procurar soluções para o cultivo de plantas nesse ambiente com estresse abiótico, muitos estudos são feitos em cultivo hidropônico ou em solo (REZENDE *et al.*, 2018). Lawlor (2013) acrescenta que o cultivo *in vitro* tem inúmeras vantagens como: controlar o ambiente com luminosidade, nutrição adequada, otimização de espaço, maior agilidade no resultado. Para Jain *et al.* (2001) o cultivo *in vitro* permite encurtar consideravelmente o tempo para selecionar as plantas que tiveram expressão das características desejáveis e, posteriormente, para a conclusão, e até a comprovação do resultado esperado o cultivo segue para o ambiente externo na fase de aclimação.

Dentre esses pontos positivos pode se ter mais ou menos pontos dependendo do objetivo do trabalho. No cultivo *in vitro*, o pesquisador consegue isolar o efeito, exemplificando, toma-se o estresse salino, ou seja, evita-se que haja mais fatores suspeitos na resposta final do experimento. Vale salientar que a maioria dos trabalhos com tolerância a salinidade foram executados *in vitro* (CLAYES *et al.*, 2014). Como agente indutor de salinidade em *in vitro* o NaCl tem sido o mais usual.

Diante do exposto, infere-se que a adição de substâncias orgânicas ao meio de cultivo auxilia na indução de resistência à salinidade *in vitro*, podendo diminuir a taxa de mortalidade dos clones de morangueiro, durante a fase de aclimatização.

Este trabalho objetiva avaliar a influência de diferentes doses de ácidos húmicos e fúlvicos na indução de resistência salinidade *in vitro* em morangueiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição botânica do morangueiro

O morangueiro, cultivado em diferentes regiões do mundo, é uma espécie pertencente à família Rosaceae, subfamília Rosoideae e à tribo Potentilleae. O gênero *Fragaria L.* compreende 19 ou mais espécies silvestres. É uma planta herbácea perene, cultivada anualmente. Seu crescimento ocorre em forma de uma espessa roseta, podendo ser rasteira ou atingir de 15 a 30 cm de altura. Possui caule curto, denominado coroa. É uma planta típica de climas frios, sendo as altas temperaturas o principal fator limitante da cultura. É sensível a variação do fotoperíodo. Quando as condições climáticas são adequadas, a planta emite estolões, que são caules finos e prostrados, com entrenós longos, que facilmente enraízam dando origem a plantas autônomas (SILVA; DIAS; MARO, 2007).

As folhas são do tipo compostas, que podem ser constituídas de três, quatro ou cinco folíolos, onde cada folíolo possui um pecíolo, que se une a um pecíolo principal, mais ou menos longo, inserido na coroa (VIDAL *et al.*, 2013). O sistema radicular é fasciculado, constituído por numerosas raízes superficiais. Possui flores com um número variável agrupadas em inflorescências do tipo cimeira, que podem ser brancas ou róseas. Nas atuais cultivares de morangueiro as flores são hermafroditas. Os pequenos pontos pretos e duros, conhecidos popularmente como sementes, são na verdade os frutos do morangueiro, denominados aquênios. Após a fecundação dos óvulos, ocorre o engrossamento do receptáculo da flor resultando na porção carnosa comestível (pseudofruto), devido a presença de auxinas produzida pelos embriões contidos em cada aquênio (SILVA; DIAS; MARO, 2007).

Por ser uma fruta com altíssimas qualidades nutritivas, o morango é um pseudofruto apreciado no mundo inteiro, sendo consumido tanto *in natura* quanto em produção processados. O morango tem propriedades nutracêuticas, é riquíssimo em flavonoides que funcionam como antioxidantes no sistema de defesa dos seres humano (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011).

No Brasil, é cultivado nas regiões Nordeste, Sul, sudeste e Centro Oeste, podendo se destacar os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais como os maiores produtores (SOUSA *et al.*, 2014; CUNHA JUNIOR *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2016).

O cultivo do morango por ser feito em diferentes maneiras: em canteiros diretamente no solo, em canteiros com emprego do *mulching* para proteger os frutos evitando o contato diretamente com o solo, em estufas, sistemas hidropônicos e semi-hidropônicos.

Dentre os principais gargalos na cultura do morangueiro estão o uso incorreto de defensivos agrícolas, resistência a doenças, contaminação de solos e fornecimento exagerado de insumo, bem como adaptação das cultivares a ambiente salino. Grande parte dos produtores cultivam a espécie diretamente no solo, realizando fertirrigações frequentes. Esse método é o mais empregado pela relação custo-benefício (FAGHERAZZI *et al.*, 2019). Como a cultura é exigente em K, ao longo dos anos o solo se torna um ambiente salino (ANTUNES, CARVALHO; SANTOS, 2011). A salinidade ocasiona vários efeitos negativos no desenvolvimento da cultura, reduzindo a produtividade, portanto, a busca por alternativas que mitiguem esses efeitos de salinidade se torna interessante e urgente para os suprimentos de alimentos (ZHU; GONG, 2014).

2.2 Micropropagação

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grandes aplicações na agricultura. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado (ROCHA, 2014), sendo um ambiente totalmente controlado, com riqueza de nutrientes e elevada umidade (SANTOS *et al.*, 2015).

Dentre as ferramentas biotecnológicas, a cultura de tecidos vegetais por meio da técnica de micropropagação, é uma opção viável para atender as necessidades de multiplicação em larga escala (AGGARWAL *et al.*, 2012). A cultura de tecidos é uma opção interessante para atingir esse objetivo, pois auxilia na produção em escala comercial de mudas de qualidade, em curto espaço de tempo e livre de pragas e de doenças, podendo resultar em ganhos genéticos rápidos e em maiores retornos às plantações, pelo aumento na produtividade (AGGARWAL *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2013).

Devido a crescente procura por mudas sadias de morangueiro, há uma necessidade de melhoria das mudas, tanto em qualidade, como em quantidade, para a qual a micropropagação pode ser uma alternativa viável para promover a propagação vegetativa. Essa propagação começaria pela obtenção de plantas com elevado estado sanitário e estabilidade genética, e prosseguiria com a preparação da planta-mãe, com o isolamento, a multiplicação, o enraizamento e aclimação (SANTOS *et al.*, 2015).

As fases da micropropagação incluem a seleção e o condicionamento das plantas matrizes, a desinfestação dos explantes e o cultivo em condições assépticas, a multiplicação dos

propágulos em sucessivos subcultivos, o enraizamento das plantas multiplicadas e a subsequente aclimatização em ambiente *ex vitro* (MURASHIGE, 1974).

O estabelecimento *in vitro* é a etapa determinante no processo de micropropagação, principalmente se a fonte do material vegetal for advinda do campo, em função de altas taxas de contaminação (ALFENAS, 2004). Envolve a determinação do tipo de explante, a assepsia, e o meio de cultivo que vai permitir a melhor adaptação das plantas às condições laboratoriais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

Após o estabelecimento *in vitro*, a fase posterior, denominada de multiplicação, objetiva produzir o maior número possível de plantas, no menor espaço de tempo, mantendo as características da planta matriz (OLIVEIRA *et al.*, 2014). O emprego de reguladores de crescimento das classes das citocininas são indispensáveis nessa fase, para a quebra da dominância apical e para a indução da proliferação de gemas axilares (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Quando se obtém o número desejado de plantas, a partir da fase de multiplicação, os cultivos são submetidos a tratamentos com auxinas, de modo a proporcionar o alongamento e o enraizamento das plantas, sendo considerada mais uma fase da micropropagação. Vários estudos relatam a utilização de auxinas sintéticas adicionadas ao meio de cultivo para proporcionar aumento no número e no comprimento de raízes (ROSSATO *et al.*, 2015) e no alongamento das plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A última etapa da micropropagação, considerada uma fase crítica do processo, é a aclimatização, na qual ocorre a transferência das plantas para condições externas ao laboratório (*ex vitro*), o que pode ser limitante para algumas espécies (SILVEIRA *et al.*, 2013).

O sucesso da aclimatização implica em alto grau de sobrevivência das plântulas, e está muitas vezes na dependência da etapa de pré-acondicionamento *in vitro*. Já a fase de enraizamento é influenciada pelas modificações na constituição do meio, a fim de estimular o estabelecimento das microestacas e seu enraizamento (DEBERGH, 1991). Drew (1987) observou que, reduzindo a concentração mineral do meio, houve aumento na iniciação radicular de brotos de *Caryca papaya*.

2.3 Estresse salino

Do ponto de vista fisiológico, estresse é a condição causada por fatores que tendem a alterar um equilíbrio. Nesse sentido, o conceito de estresse é atribuído àquela condição de estresse suave e estimulante que ativa o metabolismo celular e incrementa a atividade fisiológica da planta. É um fator positivo que impulsiona o crescimento vegetal. Por outro lado,

o estresse é gerado por qualquer condição desfavorável, seja pela intensidade ou duração, que afeta negativamente o metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal. Os mecanismos de tolerância, por sua vez, envolvem alta atividade metabólica sob estresse moderado, e baixa sob estresse severo - permitem a planta suportar o estresse (LICHTENTHALER, 2004).

As respostas ao estresse salino variam amplamente, dependendo do genótipo da planta. Enquanto algumas espécies apresentam elevada tolerância à salinidade, outras são altamente suscetíveis. As plantas podem ser classificadas como halófitas, aquelas que se desenvolvem naturalmente em ambientes com elevadas concentrações salinas (tipicamente Na⁺ e Cl⁻) e, glicófitas, as que não são capazes de se desenvolver em ambientes com elevadas concentrações salinas. A maioria das glicófitas apresenta redução no crescimento quando a salinidade supera 10 mM, enquanto as halófitas crescem em ambientes nos quais a concentração salina varia de 50 a 500 mM (ORCUTT; NILSEN, 2000).

Akladious e Mohamed (2018), quando trabalharam com nitrato de cálcio e ácido húmico em pimenta sob estresse salino, observaram que dos tratamentos combinados com doses de nitrato de cálcio e ácido húmico, promoveram maior crescimento das plantas, melhorias no sistema antioxidante e maior atividade do aparelho fotossintético. Forouzi, Ghasemnezhad e Nasrabad (2020), em seu estudo da resposta fitoquímica de *Stevia* a microrganismos promotores de crescimento sob estresse salino, verificou que aumentaram a atividade enzimática e eliminaram radicais livres, os acúmulos e fenóis e flavonoides.

2.4 Utilização de indutores de resistência ao estresse salino

O aumento da incidência de estresse abiótico afeta negativamente o crescimento de plantas, reduzindo a produtividade. Buscas globais por técnicas que minimizem esses danos são crescentes, especialmente pela crescente demanda para o aumento da produção dos alimentos (ETESAMI *et al.*, 2018).

Na literatura, existem diversos trabalhos com indutores de resistência aos diferentes tipos de estresse abiótico. Dentre as propostas destacam-se o uso de bactérias, ácidos orgânicos e nutrientes silício. Os benefícios da utilização de bactérias benéficas como indutoras de resistência são demonstrados por diversos autores como Etesami *et al.* (2018), Farh *et al.* (2017), Andrade *et al.* (2019) e Bacilio, Moreno e Bashan (2016).

Os trabalhos comprovaram o efeito positivo ao crescimento das plantas, podendo ainda minimizar os malefícios causados pelo estresse salino. Yasmeen *et al.* (2020) trabalharam com rizobactérias formadoras de biofilme em girassol, para tolerância de estresse salino, e foi

evidenciada a tolerância das plantas ao sal. Nos tratamentos com adição de rizobactérias, as mesmas reduziram o estresse oxidativo, regulação na atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (GPX).

Zhu *et al.* (2014) e Rezende *et al.* (2018) trabalharam com silício para indução de resistência ao estresse salino, e observaram a mitigação dos efeitos negativos do estresse nas plantas. Zhu *et al.* (2020) ainda estudaram o uso de silício na resistência de pepino ao estresse salino, e verificaram que o nutriente tenta reverter o balanço hormonal para os níveis de controle, além disso, o silício regula os níveis de prolina e citocinina, por meio de enzimas que controlam a expressão gênica, e que a prolina atua como regulador no metabolismo de citocinina em curto espaço de tempo.

Liu *et al.* (2019) e Canellas *et al.* (2015), trabalharam com substâncias húmicas no combate ao estresse salino. Os trabalhos demonstram que esses compostos têm diversos efeitos benéficos, como: auxiliam no crescimento radicular, são fortes ligantes de íons metálicos como Fe e Cu, atuam no desenvolvimento e crescimento da planta por apresentarem semelhança ao efeito auxínico. Os autores concluíram que o uso dessas substâncias húmicas foi eficiente ao combate do estresse salino. Saidimoradi *et al.* (2019) realizou um trabalho intitulado mitigação ao estresse salino por aplicação de ácido húmico, e observaram que, com a aplicação dos ácidos, foi capaz de mitigar os efeitos negativos de salinidade em plantas de morango.

Segundo Lawlor (2013), e diante dos estudos encontrados na literatura, realizar testes de resistência *in vitro* torna-se uma alternativa viável, pois se tem controle do local e baixa variabilidade. Khalid *et al.* (2016) relatam que os testes *in vitro* são referência no estudo de resistência, pois oferecem melhores perspectivas durante a fase de melhoramento, onde os percalços de limitação ambiental podem ser solucionados com este sistema.

2.5 Ácidos orgânicos: ácidos fúlvicos e ácidos húmicos

A composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos. Plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas e requerem meios nutritivos compostos por minerais, vitaminas e fontes de energia. Os meios de cultura podem ser modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se esteja trabalhando (TORRES *et al.*, 2001).

Com o avanço da tecnologia, a ciência busca ferramentas que torne a produção dos alimentos sustentável. Nesse contexto, tornar a cadeia de produção sustentável, surge como alternativa a utilização das substâncias húmicas (SB).

As SH são formadas através de ligações químicas e biológicas, podendo ainda, serem proveniente de metabolismo microbiano e representam a maior parte de carbono da Terra. As substâncias húmicas são divididas em: humina, ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF). A extração de SH pode ser feita de várias maneiras, as mais comuns são: Turfa, leonardita, compostagem, lodo de esgoto, solo. Baldotto *et al.* (2011) verificaram que ácidos mais estáveis como o solo possuem alta atividade de argila, e saturação de base elevada influenciaram positivamente no crescimento radicular de *Arabidopsis thaliana*. Adani *et al.* (1998) comparou fontes comerciais de turfa e leonardita em tomateiro e verificou que, com a aplicação do produto comercial com turfa, estimulou maior crescimento radicular, em contrapartida o produto com leonardita aumentou o crescimento de parte radicular e aérea e na nutrição do tomate. Esses resultados expressos pelo pesquisador inferem que as fontes das SH influenciam positivamente no crescimento e nutrição das plantas.

A utilização dos ácidos orgânicos em plantas é bem conhecida (NARDI *et al.*, 2002), destacando a promoção do crescimento caulinar (CANELLAS *et al.*, 2015), auxílio na atividade da enzima H^+ -ATPase, favorecendo o crescimento de raízes (AGUIAR *et al.*, 2013) e aumento de absorção de nutrientes pelos vegetais (ONWOSI *et al.*, 2017).

Os ácidos húmicos exercem grandes funções no conjunto relacionado ao crescimento da planta, sendo comprovado que ácidos húmicos auxiliam na emissão de raízes laterais, ou seja, em condições de estresses, as plantas tendem a multiplicar para a busca de água, principalmente, ou seja, os ácidos húmicos podem ajudar na formação de raízes enquanto a planta não precisa gastar energia para tal função (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014).

Dentre os efeitos positivos da utilização dos ácidos húmicos, pode-se destacar maior tolerância ao estresse salino em espécies como *Chrysanthemum indicum* (MAZHAR *et al.*, 2012), pistache (*Pistacia vera*) (MOGHADDAM; SOLEIMANI, 2012) e *Phaseolus vulgaris* (AYDIN; KANT; TURAN, 2012).

Em alguns trabalhos (CANELLAS *et al.*, 2002; TREVISAN *et al.*, 2010; BALDOTTO *et al.*, 2011) são encontrados os efeitos positivos do crescimento radicular pela ação dos AH. Esse fato é resultado da interação da bioatividade das substâncias húmicas, onde elas podem ter efeitos semelhantes às auxinas sobre as plantas, e ativam a H^+ ATPase, que promove um aumento no gradiente de H^+ , acidificando o apoplasto, que ocasiona o rompimento das ligações da membrana das células, logo, aumenta a elasticidade favorecendo o crescimento radicular das plantas (CANELLAS; SANTOS, 2005).

De acordo com os resultados de Borcioni, Mógor e Pinto (2016) quando trabalhou com a aplicação de AF na produtividade de alface americana, encontrou que a aplicação de

diferentes doses de AF promoveu o crescimento das mudas, especialmente no sistema radicular e na emissão de raízes de menor diâmetro. Frasca (2019) quando trabalhou com bioestimulante, ácidos fúlvicos e micronutrientes, verificou que o emprego do Micro + Ac. fúlvicos obteve incrementos em maior acúmulo de biomassa, em relação aos outros tratamentos. Com esses trabalhos, nota-se que os AF contribuem tanto para incremento de crescimento radicular, como também em maior acúmulo de biomassa das plantas.

Para fins de comparação entre AH e AF, de acordo com alguns trabalhos na literatura os AH são mais eficientes no crescimento radicular do que os AF. Silva *et al.* (2011) sugerem que os AH têm maior bioatividade comparados com outros materiais húmicos. Esses AH ativaram a rota de sinalização utilizada pelas auxinas e atuaram como regulador vegetal (DOBBSS *et al.*, 2009), sendo que essa bioatividade é de natureza química. Os AF são compostos menores e têm a acidez mais alta que os AH, que têm maior hidroboficidade e massa aparente. Essa hidroboficidade, faz com que as moléculas se liguem facilmente e protejam contra a degradação bioquímica.

Puglisi *et al.* (2013) relatam que, além dos efeitos na morfologia e fisiologia, os AH alteram a dinâmica microbiana da rizosfera, pois estimulam a exsudação de ácidos orgânicos e de açúcares pelas raízes.

Como elucidado acima, as SH promovem um melhor desenvolvimento nas plantas como: crescimento das plantas (principalmente na parte radicular), aumento na biomassa, melhor equilíbrio nutricional, aumento da atividade do aparelho fotossintético, alterações na parte bioquímica das plantas. Por esses motivos, torna-se necessário a investigação da aplicação dessas SH, a fim de mitigar os efeitos de salinidade que são antagônicos à sua ação, podendo minimizar ou até mesmo desencadear resistência aos efeitos negativos do estresse salino.

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Material vegetal e delineamento experimental

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal pertencente ao Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA. As plantas foram obtidas por meio do cultivo *in vitro* de explantes de morangueiro, cultivar jônica, crescidos em meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) acrescidos de 1 mg L⁻¹ de BAP. As plantas permaneceram em sala de crescimento com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz por 60 dias. Após esse período foram transferidas para os tratamentos a fim de indução de resistência ao estresse salino através de ácidos orgânicos.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizados, sendo composto pelos ácidos orgânicos Húmico e Fúlvico, nas concentrações de 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ e 15 mg L⁻¹ e os tratamentos adicionais zero (comparação de padrão) e a testemunha absoluta (apenas com NaCl) (TABELA 1). Com exceção do tratamento adicional zero, nos demais houve a adição de 37,5 mMol L⁻¹ de NaCl no meio de cultivo, conforme verificado em pré-testes com a cultivar. Os ácidos orgânicos foram doados pelo Departamento de Solos da UFLA, e ambos foram extraídos de rocha Leonardita. De acordo com a Tabela 1, pode ser verificado o tratamento, a identificação e a concentração por mg L⁻¹ de AH e AF.

Tabela 1- Tratamentos utilizados no trabalho, descrição dos tratamentos e a concentração de substâncias húmicas. Lavras, 2020.

Tratamento	Descrição do tratamento
T1	Padrão (sem sal)
T2*	Com sal
T3	Sal + 5 mg L ⁻¹ de AH
T4	Sal + 10 mg L ⁻¹ de AH
T5	Sal + 15 mg L ⁻¹ de AH
T6	Sal + 5 mg L ⁻¹ de AF
T7	Sal + 10 mg L ⁻¹ de AF
T8	Sal + 15 mg L ⁻¹ de AF

*O tratamento 2 (T2) é a testemunha absoluta, contendo somente o NaCl, estabelecido como a dose 0 de AH e 0 de AF.

Fonte: Da autora (2020).

3.2 Indução de resistência ao estresse salino *in vitro*

Para a indução de resistência, as plântulas foram submetidas aos tratamentos durante 60 dias. Foram distribuídos 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) contendo as diferentes fontes e concentrações de SHs, e os tratamentos adicionais em tubos de ensaio. O meio de cultura foi autoclavado a 120 °C, por 20 minutos e pressão de 1,5 atm. A adição dos diferentes compostos ao meio de cultivo ocorreu no momento que antecede a aferição de pH, sendo este mensurado em 5,7. Após inoculação dos explantes, estes foram mantidos em sala de crescimento com lâmpadas brancas frias, proporcionando 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 16 horas de luz a temperatura constante de 25 °C.

3.3 Desenvolvimento das plantas em casa de vegetação

As plantas foram cultivadas em vasos de quatro litros contendo solo de textura argilosa (ANEXO 1), pelo período de 45 dias. A cada sete dias foram repetidas as aplicações de 37,5 mMol L^{-1} de NaCl em todos os tratamentos, com exceção de T1. O sal foi diluído em 100ml de água destilada e acrescentado aos vasos. A irrigação das plantas foi realizada uma vez por dia, conforme necessidade.

3.4 Peroxidação lipídica (MDA)

A quantificação de peroxidação lipídica foi realizada pelo método TBARS (Ácido tiobarbitúrico) (BUEGE; AUST, 1978). Foram macerados 200 mg de massa fresca em N líquido com PVPP e 1500 μL de Ácido Tricloroacético 0,1%. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos, a 4 °C e foi coletado o sobrenadante. Uma alíquota do sobrenadante de 125 μL foi pipetada em eppendorf contendo 250 μL do meio de reação: Ácido tiobarbitúrico 0,5% e Ácido tricloroacético 10%. As amostras foram levadas ao banho-maria a 95 °C por 30 min. Foi paralisar a reação por resfriamento rápido em gelo e realizada a leitura em espectrofotômetro a 532 e a 600 nm. Os cálculos foram realizados utilizando a Equação 1.

$$[\text{MDA}] = (A_{532} - A_{600}) / (\xi * b) \quad (1)$$

em que:

ξ = coeficiente de extinção molar = 155 $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

b = comprimento ótico = 1

3.5 Superóxido Dismutase (SOD)

Para a avaliação da atividade de superóxido dismutase, utilizou-se a metodologia descrita por Giannopolitis e Ries (1977). A cada 100 μL do extrato enzimático foi adicionado 1,9 mL do meio de incubação: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NB 75 μM e riboflavina 2 μM . As amostras foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W (o controle será mantido no escuro e sem a adição do extrato). Após 10 minutos, foram lidas em 560 nm e o cálculo da atividade enzimática será feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com o extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / A_{560} \text{ controle sem enzima}$.

3.6 Catalase (CAT)

Utilizou-se uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático onde será adicionado 950 μL de meio de incubação contendo: 500 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 μL de peróxido de hidrogênio 12,5 Mm, incubados a 28 °C (HAVIR; MCHALE, 1987) para determinar a atividade da catalase. A cada 15 segundos, durante três minutos, serão avaliados o decaimento da absorbância, a 240 nm, pelo consumo do peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar será de 36 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.7 Ascorbato Peroxidase (APX)

Utilizou-se uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático onde será adicionado 950 μL de meio de incubação contendo: 500 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 μL de ácido ascórbico 10 Mm e 50 μL de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981) para determinar a atividade da enzima APX. A cada 15 segundos, durante três minutos, será avaliada a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm onde será determinado o coeficiente de extinção molar 2,8 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.8 Análises fitotécnicas

Após 45 dias de cultivo das plantas em casa de vegetação foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento da parte aérea (cm); número de brotos; comprimento de raiz (cm); número de folhas; matéria seca (g).

Para a análise da matéria seca, as plantas foram submetidas à estufa de renovação de ar forçada por 48 horas a 40 °C e pesadas em balança de precisão para estimativa de matéria seca.

3.9 Teor de clorofila

Para a determinação do teor de clorofila, a extração foi realizada conforme a metodologia descrita por Engel e Poggiane (1991), utilizando 0,50 g de matéria fresca homogeneizada em 5 mL de acetona 80%, seguida da leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 470, 645 e 652 nm, para clorofila a, b e carotenoides, respectivamente.

3.10 Acúmulo de nutrientes

Após a avaliação fitotécnica, foram separadas a parte aérea e a parte radicular das plantas analisadas, devidamente identificadas e submetidas a secagem em estufa de aeração forçada a 60 °C até atingir massa constante. Posteriormente, o material foi levado ao Laboratório de Fertilidade do Solo da UFLA, vinculado ao Departamento de Ciência do Solo, para análise do conteúdo nutricional da parte aérea e radicular. Com os resultados de teor nutricional e massa seca dos tratamentos, foram feitos os cálculos para a determinação do acúmulo de nutriente por tratamento avaliado, segundo metodologia Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

3.11 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância, e, quando significativos, foi feita a regressão polinomial para avaliar os efeitos das doses substâncias húmicas sendo realizadas as análises de variância (ANAVA) análise estatística foi realizada por meio do *software* SISVAR (FERREIRA, 2011).

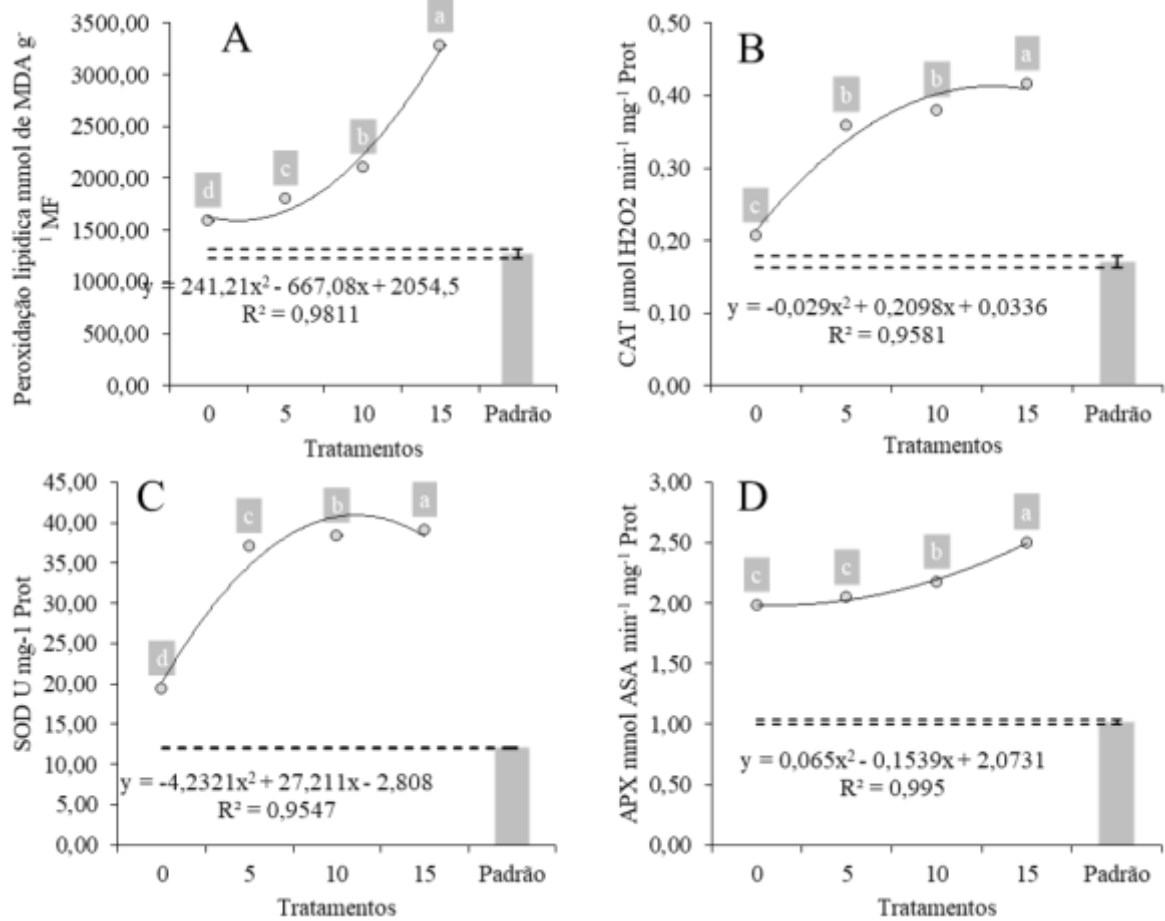
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características fisiológicas e bioquímicas

Com base nos resultados das análises enzimáticas apresentados nas Figuras 1 e 2, pode-se observar que a concentração de sal utilizada foi suficiente para causar estresse nos morangueiros. A peroxidação lipídica analisada nas plantas cultivadas apenas no meio MS foi significativamente inferior aos demais cultivos, assim como a ocorrência da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutathione peroxidase (APX).

Os resultados gerais das análises enzimáticas mostram que a concentração crescente de ácido húmico (FIGURA 1) e de ácido fúlvico (FIGURA 2) promoveram maior atividade das enzimas antioxidantes. Nas plantas cultivadas nas concentrações de 15 mg L⁻¹ ocorreu maior atividade das enzimas antioxidantes e maior peroxidação lipídica, indicando concentrações mais altas, podem promover formação de mudas desenvolvidas *in vitro* mais tolerantes a salinidade.

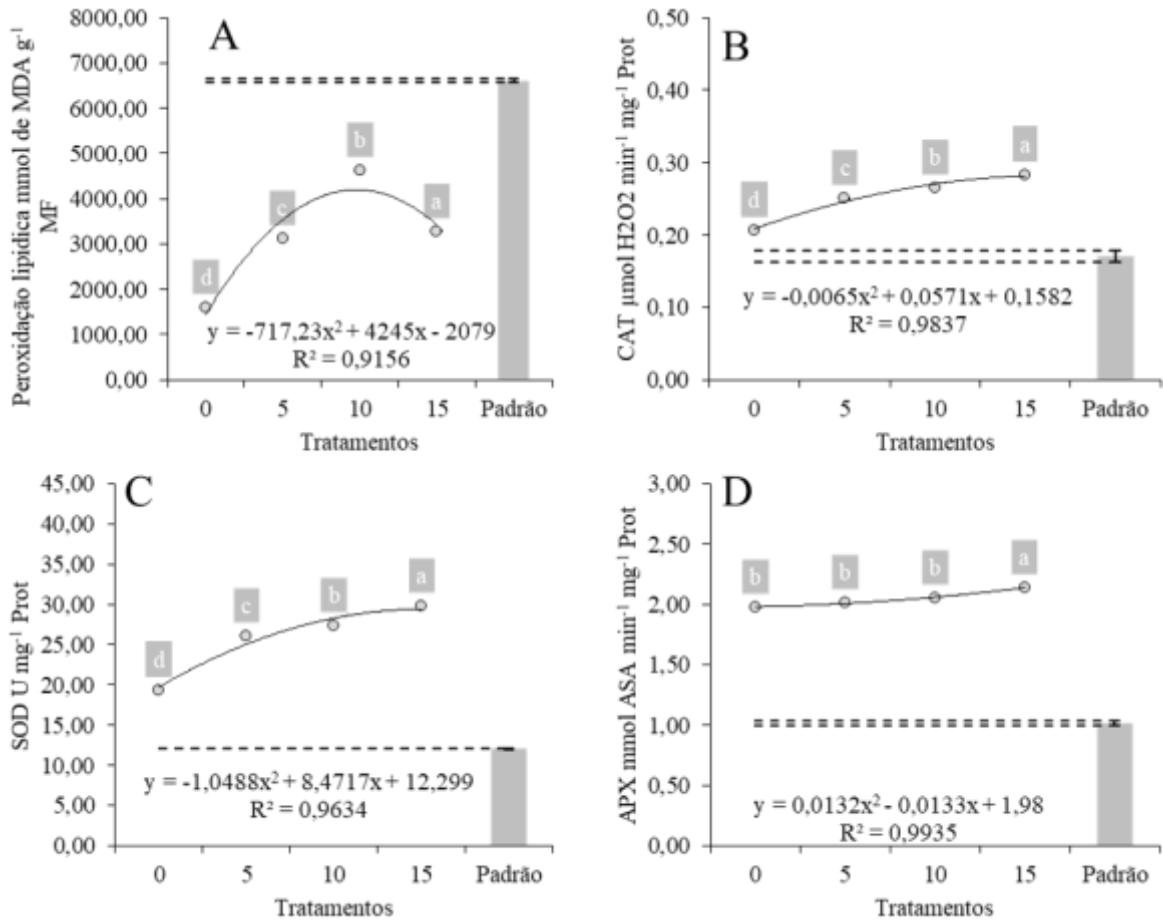
Figura 1 - Quantificação de enzimas em plantas de morangueiro sob estresse salino cultivadas em diferentes doses de ácido húmico. UFLA, Lavras-MG, 2020.



*As letras maiúsculas representam a enzima. A: Peroxidação lipídica, B: Catalase, C: Superóxido Dismutase, D: Ascorbato Peroxidase.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 2 - Quantificação de enzimas em plantas de morangueiro sob estresse salino cultivadas em diferentes doses de ácido fúlvico. UFLA, Lavras-MG, 2020



*As letras maiúsculas representam a enzima. A: Peroxidação lipídica, B: Catalase, C: Superóxido Dismutase, D: Ascorbato Peroxidase.

Fonte: Da autora (2020).

Quando a planta está em um ambiente desfavorável, em situação de estresse, ocorre a formação de radicais livres a partir do metabolismo do oxigênio. Nesse sentido, o sistema de defesa vegetal começa a atuar para minimizar os danos causados por esses radicais livres, através do sistema de defesa enzimático e não enzimático (TAIZ; ZEIGER, 2017). As enzimas SOD, CAT, e APX são fundamentais no processo de desintoxicação e estão altamente relacionadas a tolerância ao estresse salino (SOFO *et al.*, 2015).

A SOD é a primeira enzima a ser acionada pelo sistema de defesa e atua na dismutação do radical do superóxido em peróxido de hidrogênio. Com o aumento na concentração de superóxido no conteúdo celular, inicia-se a produção massiva de SOD e a conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio. A SOD é relevante na retirada de superóxido do conteúdo celular e ao estresse abiótico (OLIVEIRA, 2006). Zhang *et al.* (2014), em estudos com cultivares de algodão contrastantes em relação a tolerância à salinidade, observaram que o

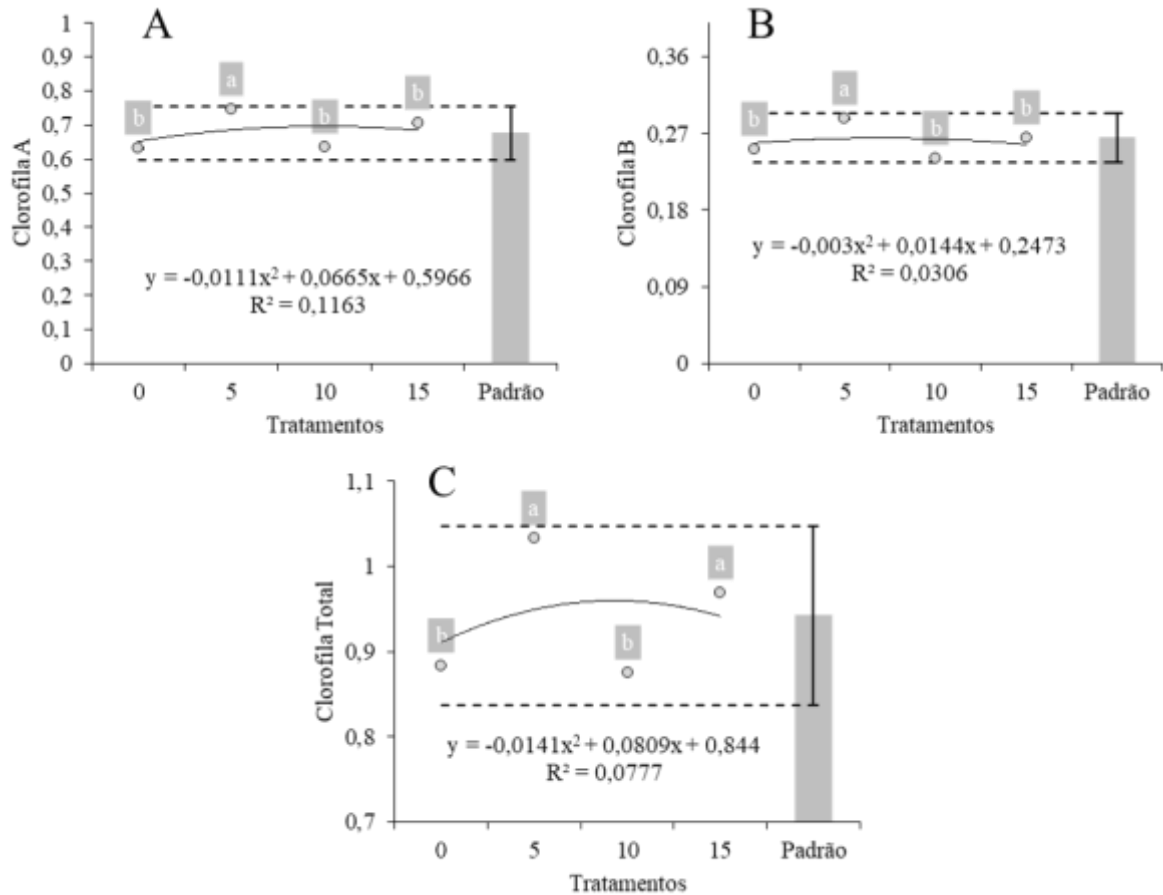
cultivar mais tolerante apresentava maior atividade da SOD do que o cultivar mais sensível, tanto em folha quanto em raiz.

Logo após a formação do peróxido de hidrogênio subproduto da reação da SOD, a atividade da CAT e da APX se intensificam. A CAT é a principal enzima que atua na conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, sendo que a eficiência do processo de retirada do H_2O_2 na célula é aumentada na presença da APX. A CAT e APX são enzimas de extrema importância na desintoxicação da célula, e responsáveis por manter o equilíbrio de peróxido de hidrogênio intracelular (BHATT; TRIPATHI, 2011).

Colaborando com os resultados desse trabalho, Aguiar (2015), estudando a mitigação de estresse hídrico em cana-de-açúcar, verificaram que as plantas tratadas com ácido húmico e bactérias diazotróficas endofíticas tiveram aumento na atividade das enzimas antioxidantes comparadas com as plantas controle. Assim como Schiavon *et al.* (2010) observaram que ácidos húmicos afetam o sistema de defesa de plantas de milho. Em morangueiro, Saidimoradi *et al.* (2019) observaram que o uso de ácido húmico mitiga os efeitos do estresse salino, assim como verificaram que a baixa atividade do sistema antioxidante influencia no processo de mitigação, mas não promove resistência a salinidade.

A partir das análises bioquímicas, foi observado que os ácidos húmico e fúlvico auxiliaram as plantas no acúmulo de clorofilas. A concentração de 5 mg L^{-1} de ácido húmico propiciou às plantas maior acúmulo de clorofila *a* e *b*, diferenciando-se dos demais tratamentos e apresentando valores médios superiores ao padrão (FIGURA 3). Para clorofila total, as concentrações de 5 mg L^{-1} ml e 15 mg L^{-1} apresentaram os maiores valores médios, diferindo das demais (FIGURA 3).

Figura 3 - Teor de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila *t* em plantas de morangueiro sob estresse salino cultivadas em diferentes doses de ácido húmico. UFLA, Lavras-MG, 2020

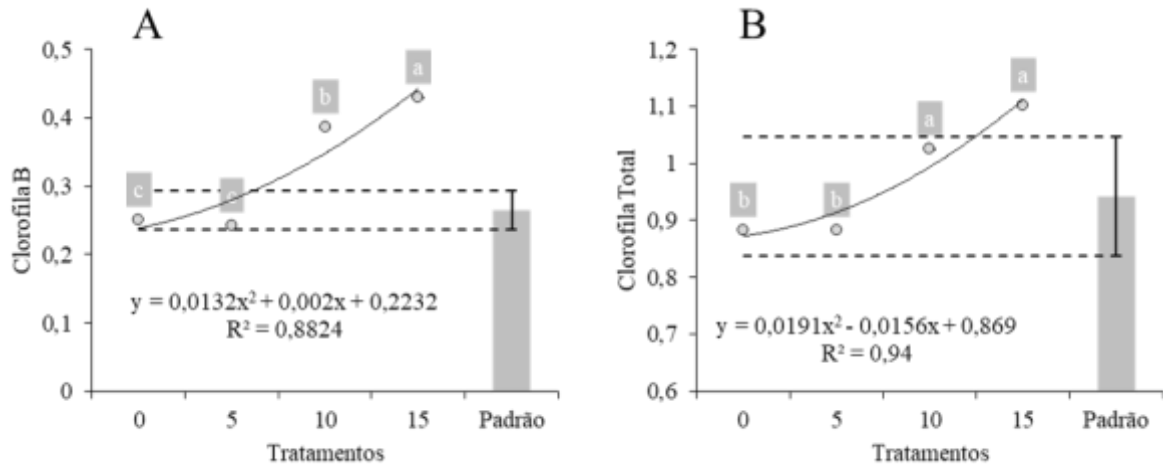


*Letras maiúsculas representam os teores de clorofila, A: clorofila *a*, B: clorofila *b*, C: clorofila *t* com diferentes doses de ácido húmico.

Fonte: Da autora (2020).

Em relação ao uso do ácido fúlvico, a concentração de 15 mg L⁻¹ propiciou às plantas acúmulo superior de clorofila *a* e *b*, em relação aos demais tratamentos e ao padrão (FIGURA 4). Houve diferenças estatísticas para acúmulo de total de clorofilas ao utilizar as concentrações de ácidos fúlvicos e para carotenoides em ambos os ácidos estudados.

Figura 4 - Teor de clorofila *b* e clorofila *t* em plantas de morangueiro sob estresse salino cultivadas em diferentes doses de ácido fúlvico. UFLA, Lavras-MG, 2020.



*: Letras maiúsculas representam os teores de clorofila *b*, B e clorofila *t* com diferentes doses de ácido fúlvico.

Fonte: Da autora (2020).

As plantas que cresceram na presença de ácido húmico e de ácido fúlvico apresentaram resposta mais rápida ao estresse, o que possivelmente propiciou atividade metabólica favorável à síntese e ao acúmulo de clorofila. Em estudos em que o ácido húmico foi aplicado em plantas em situação salina, como em abacaxizeiro (MENDES *et al.*, 2011), algodoeiro (HANAFY AHMED *et al.*, 2013) e morangueiro (SAIDIMORADI *et al.*, 2019) foram verificados o aumento na síntese de clorofilas.

Hanafy Ahmed *et al.* (2013) sugeriram que o ácido auxilia na estabilidade de membrana e, consequentemente, no maior desempenho de absorção de nutrientes que apresentam relação direta com a síntese de clorofila. Assim como Haghghi *et al.* (2012), observaram que ácidos húmicos promovem o aumento do metabolismo de nitrogênio, ocasionando maior absorção de nitrato para as plantas, e, consequentemente, maior produção de proteínas que aceleraram a atividade do aparelho fotossintético e positivamente aumentam os teores de clorofila totais.

Comparando os ácidos utilizados, observa-se que as plantas desenvolvidas na presença do ácido fúlvico apresentaram maior acúmulo de clorofilas, especialmente de clorofila *a*. Os ácidos húmicos possuem maior bioatividade comparado com outros materiais (SILVA *et al.*, 2011) associando-se com maior facilidade aos componentes sólidos do solo. Os ácidos fúlvicos são compostos menores, além disso, são menos hidrofóbicos que os ácidos húmicos. A fração das substâncias húmicas que permanece solúvel representa os ácidos fúlvicos, que são compostos por moléculas de massa molecular aparente mais baixa que a dos ácidos húmicos e com maior conteúdo de grupos funcionais ácidos (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014). Essa

característica pode ter conferido maior disponibilidade tanto do próprio ácido as plantas, quanto dos nutrientes presentes no meio de cultura, gerando mudas mais responsivas ao estresse salino.

4.2 Avaliações de crescimento e acúmulo de macro e micronutrientes

A duração do experimento em casa de vegetação foi de 45 dias, o que pode ter resultado na falta de expressão visual e morfométricas do estresse. Na Tabela 2 encontram-se as análises de crescimento vegetal. Não foi observado diferença significativa para os parâmetros de crescimento analisados, tanto para os ácidos húmicos e fúlvicos.

Ao passarem por qualquer tipo de estresse, as plantas desencadeiam alterações em sua fisiologia que ocasionam mudanças na estabilidade de suas proteínas no RNA, no transporte iônico, acoplamento de reações entre outros (TAIZ; ZIEGER, 2017). A partir dessas perturbações primárias, ocorrem sinalizações para respostas ao estresse, podendo então ocorrer um ou mais mecanismos sensores de estresse (TAIZ; ZIEGER, 2017). Os resultados do trabalho, mostram que as plantas responderam ao sensor biofísico, ou seja, esse sensor é responsável pela mudança na atividade enzimática. Como discutido anteriormente, as plantas apresentaram uma elevação na produção de enzimas a fim de diminuir o estresse ocasionada pelo NaCl.

Tabela 2 - Análise de crescimento do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento do sistema radicular (CSR), número de brotos (NB) e número de folhas (NF) em plantas de morangueiro cultivadas sob estresse salino com diferentes concentrações de substâncias húmicas. UFLA, Lavras-MG, 2020.

Tratamentos	CPA	CPR	NF	NB
	----cm----			
0 mg L-1 de ácido húmico	6,75	32,60	22,2	1,58
5 mg L-1 de ácido húmico	6,09	30,80	22,7	2,50
10 mg L-1 de ácido húmico	6,57	31,3	17,7	1,25
15 mg L-1 de ácido húmico	7,07	30,70	15,1	0,91
Teste F	ns	ns	ns	ns
CV (%)	15,9	14,2	39,3	74,7
Modelo linear	ns	ns	ns	ns
Modelo quadrático	ns	ns	ns	ns
r^2	87,5	77,0	93,4	66,1
0 mg L-1 de ácido fúlvico	6,75	32,60	22,6	1,58
5 mg L-1 de ácido fúlvico	7,62	32,70	20,6	1,58
10 mg L-1 de ácido fúlvico	6,26	32,50	19,2	1,25
15 mg L-1 e ácido fúlvico	6,84	31,30	17,2	1,74
Teste F	ns	ns	ns	ns
CV (%)	18,39	9,21	27,8	82,6
Modelo linear	ns	ns	ns	ns
Modelo quadrático	ns	ns	ns	ns
r^2	8,5	97,8	99,6	48,3

Fonte: Da autora (2020).

Tabela 3 - Variáveis de matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), e matéria seca total (MST) em plantas de morangueiro sob estresse salino cultivadas em diferentes meios com substâncias húmicas. UFLA, Lavras-MG, 2020.

Tratamentos	MSR	MSPA	MST
	(%)		
0 mg L-1 de ácido húmico	16,02	22,04	19,55
5 mg L-1 de ácido húmico	13,38	23,58	18,56
10 mg L-1 de ácido húmico	13,84	24,16	19,06
15 mg L-1 de ácido húmico	13,54	24,74	18,97
Teste F	ns	ns	ns
CV (%)	18,9	12,44	9,59
modelo linear	ns	ns	ns
modelo quadrático	ns	ns	ns
R ²	83,8	99,9	55,48
0 mg L-1 de ácido fúlvico	16,02	23,04	19,55
5 mg L-1 de ácido fúlvico	14,15	24,32	19,45
10 mg L-1 de ácido fúlvico	14,42	24,74	19,42
15 mg L-1 e ácido fúlvico	13,9	22,66	18,31
Teste F	ns	ns	ns
CV (%)	18,9	8,3	9,21
modelo linear	ns	ns	ns
modelo quadrático	ns	**	ns
R ²	84,2	95,4	93,5

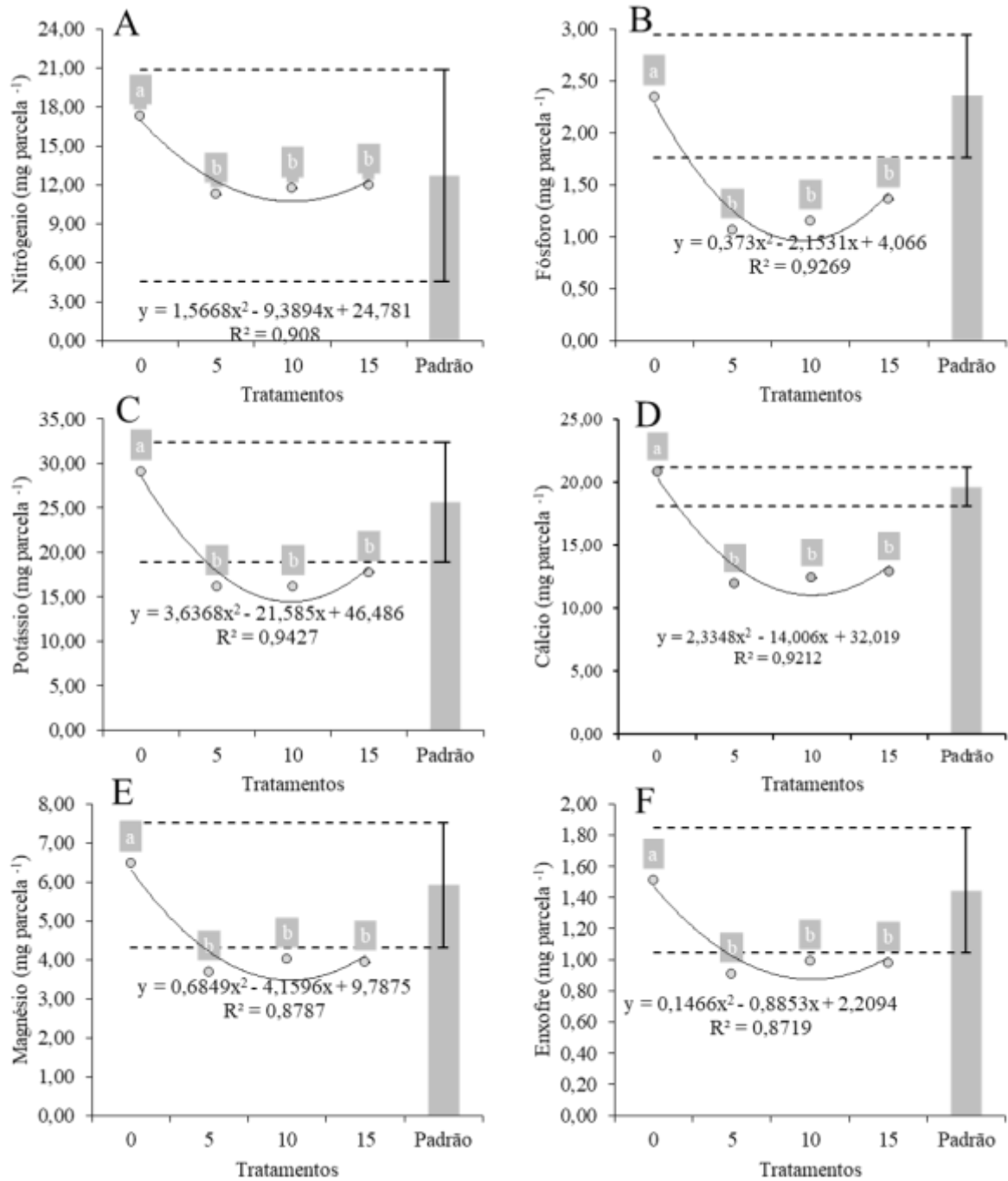
Fonte: Da autora (2020).

Os acúmulos totais de macronutrientes foram significativos ao teste F nas plantas de morangueiro, tanto para ácidos húmicos apresentados na Figura 5, quanto para ácidos fúlvicos, (FIGURA 6). As testemunhas padrão apresentaram maior acúmulo de nutrientes em todas as situações analisadas.

O acúmulo dos macronutrientes avaliados nas plantas cultivadas com ácidos húmicos foi maior na testemunha cultivada apenas sob condição de sal. O acúmulo de nutrientes foi menor nos tratamentos com ácido húmico também em relação a testemunha padrão. Somente o nitrogênio não diferiu da testemunha padrão (FIGURA 5).

Para o acúmulo de fósforo, potássio e cálcio, foi observado que a curva de regressão começa a decair a partir da menor concentração do ácido, conforme ocorre o aumento nas concentrações, ocorre o aumento no acúmulo dos nutrientes. O mesmo comportamento ocorre para magnésio e enxofre (FIGURA 5).

Figura 5 - Acúmulo de macronutrientes em plantas de morangueiro sob estresse salino cultivadas em diferentes doses de ácido húmico. UFLA, Lavras-MG, 2020



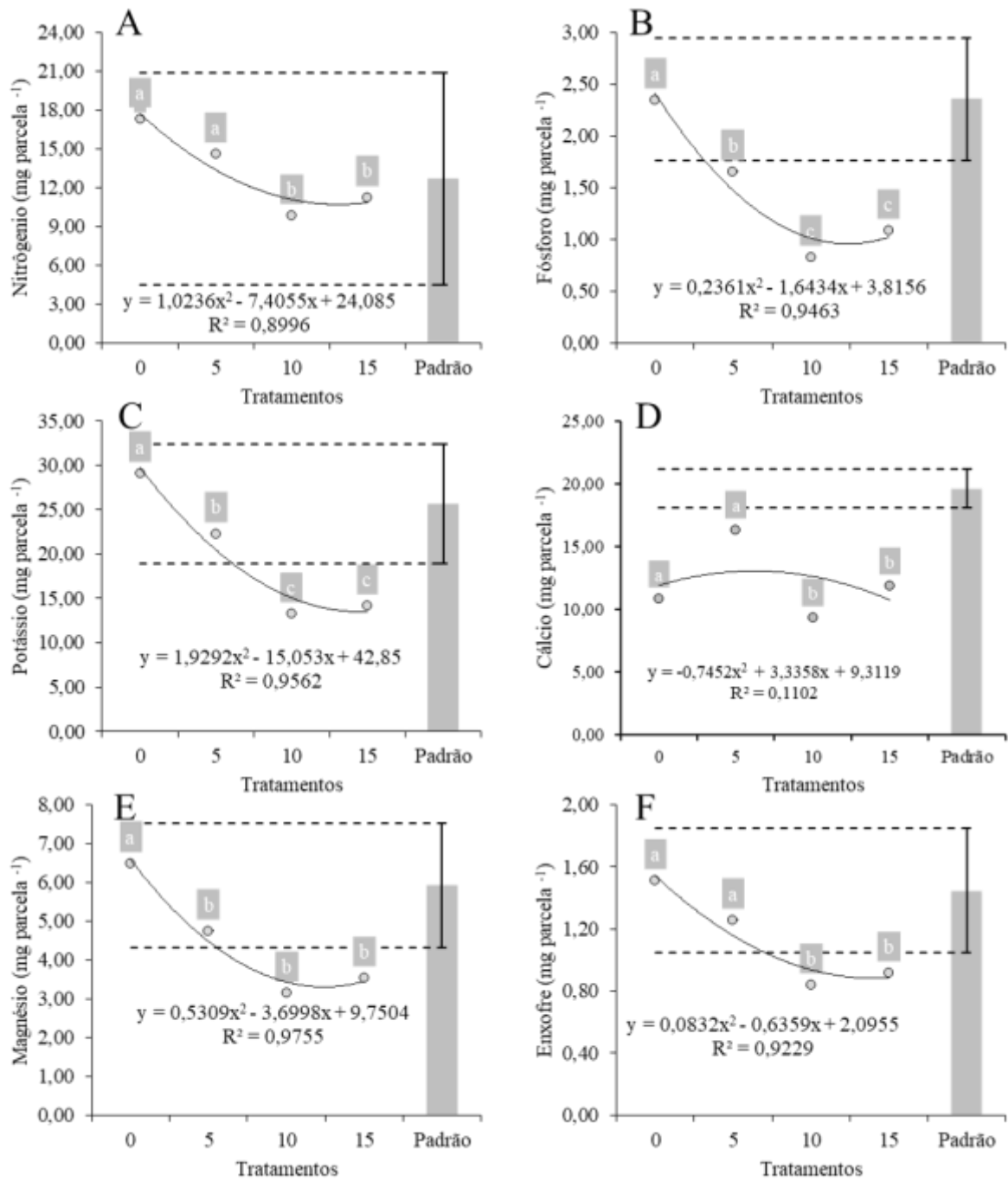
*As letras maiúsculas representam acúmulo total de nutrientes por parcela. A: Nitrogênio, B: Fósforo, C: Potássio, D: Cálcio, E: Magnésio, F: Enxofre.

Fonte: Da autora (2020).

Nas plantas desenvolvidas na presença de ácido fúlvico, o acúmulo de nitrogênio não diferiu da testemunha padrão. Entre as concentrações, o tratamento com 5 mg L⁻¹ e as plantas crescidas apenas nas condições de salinidade (0 mg L⁻¹) propiciaram maior acúmulo do macronutriente. Para fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre observou-se um

comportamento semelhante na curva na regressão. O maior acúmulo dos nutrientes aconteceu nas concentrações mais baixas de ácido fúlvico, houve uma redução no acúmulo na concentração intermediária e, posteriormente, aumento na maior concentração (FIGURA 6).

Figura 6 - Acúmulo de macronutrientes em plantas de morangueiro sob estresse salino cultivadas em diferentes doses de ácido fúlvico. UFLA, Lavras-MG, 2020.



*As letras maiúsculas representam acúmulo total de nutrientes por parcela. A: Nitrogênio, B: Fósforo, C: Potássio, D: Cálcio, E: Magnésio, F: Enxofre.

Fonte: Da autora (2020).

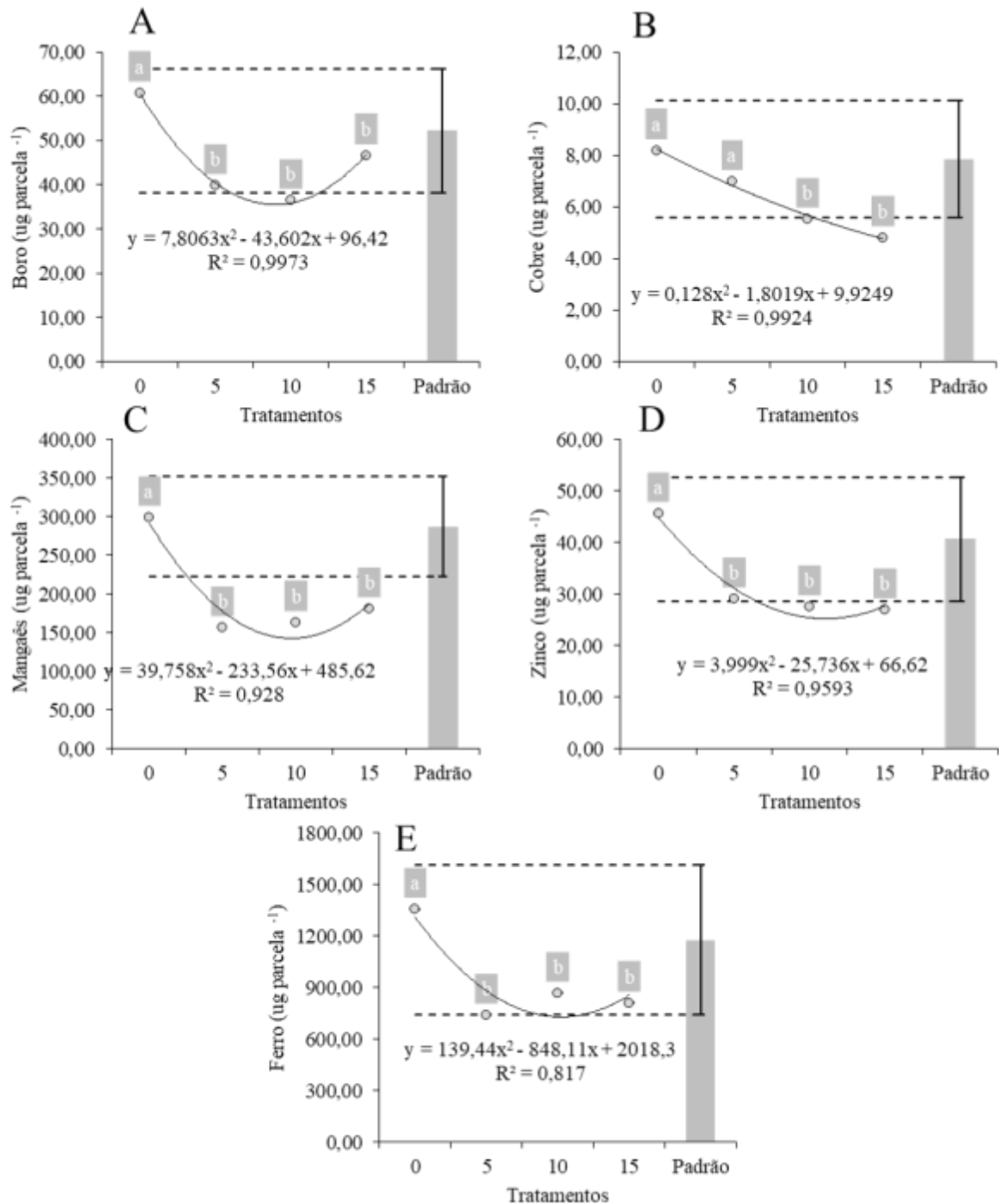
Quanto ao acúmulo de nitrogênio, Baldotto e Baldotto (2014) sugerem que os ácidos orgânicos em geral, principalmente o ácido húmico, aumentam a atividade da enzima H⁺-ATase, componente da membrana plasmática. Essa enzima tem caráter altamente permeável, podendo aumentar a entrada de íons bem como sua saída. As concentrações dos ácidos orgânicos utilizadas no presente trabalho podem ter aumentado a atividade enzimática da H⁺-ATase, conseqüentemente, a saída de íons de N, P, K, Ca, Mg e S, diminuindo o acúmulo destes nutrientes comparadas às plantas cultivadas apenas com sal e a testemunha padrão. Além disso, os resultados observados nas análises bioquímicas, comprovaram a atividade metabólica no combate ao estresse salino, nesse sentido, os nutrientes possivelmente foram utilizados primeiramente em rotas metabólicas que auxiliam o sistema de defesa.

Alguns autores trazem que a origem do produto utilizado influencia no maior ou menor acúmulo de nutrientes. Estudo realizado por Pereira *et al.* (2010) constaram que concentrações de ácido húmico comercial em detrimento ao ácido húmico puro, são mais eficazes no acúmulo de macronutrientes. Os autores observaram que ao utilizarem ácido húmico puro, não eram observadas diferenças no acúmulo de macronutrientes.

Em relação ao acúmulo de micronutrientes os resultados se assemelham aos encontrados para macronutrientes, para ambos os ácidos (FIGURAS 7 e 8).

O acúmulo de boro e manganês foi maior nas plantas cultivadas apenas com sal em relação as concentrações do ácido húmico. Para acúmulo de boro as plantas cultivadas apenas com sal não diferiram da testemunha padrão. As plantas que foram cultivadas na presença dos ácidos apresentaram acúmulo de manganês inferior a testemunha padrão. O mesmo comportamento foi observado no acúmulo de cobre, zinco e ferro (FIGURA 7).

Figura 7 - Acúmulo de micronutrientes em plantas de morangueiro sob estresse salino cultivadas em diferentes doses de ácido húmico. UFLA, Lavras-MG, 2020.



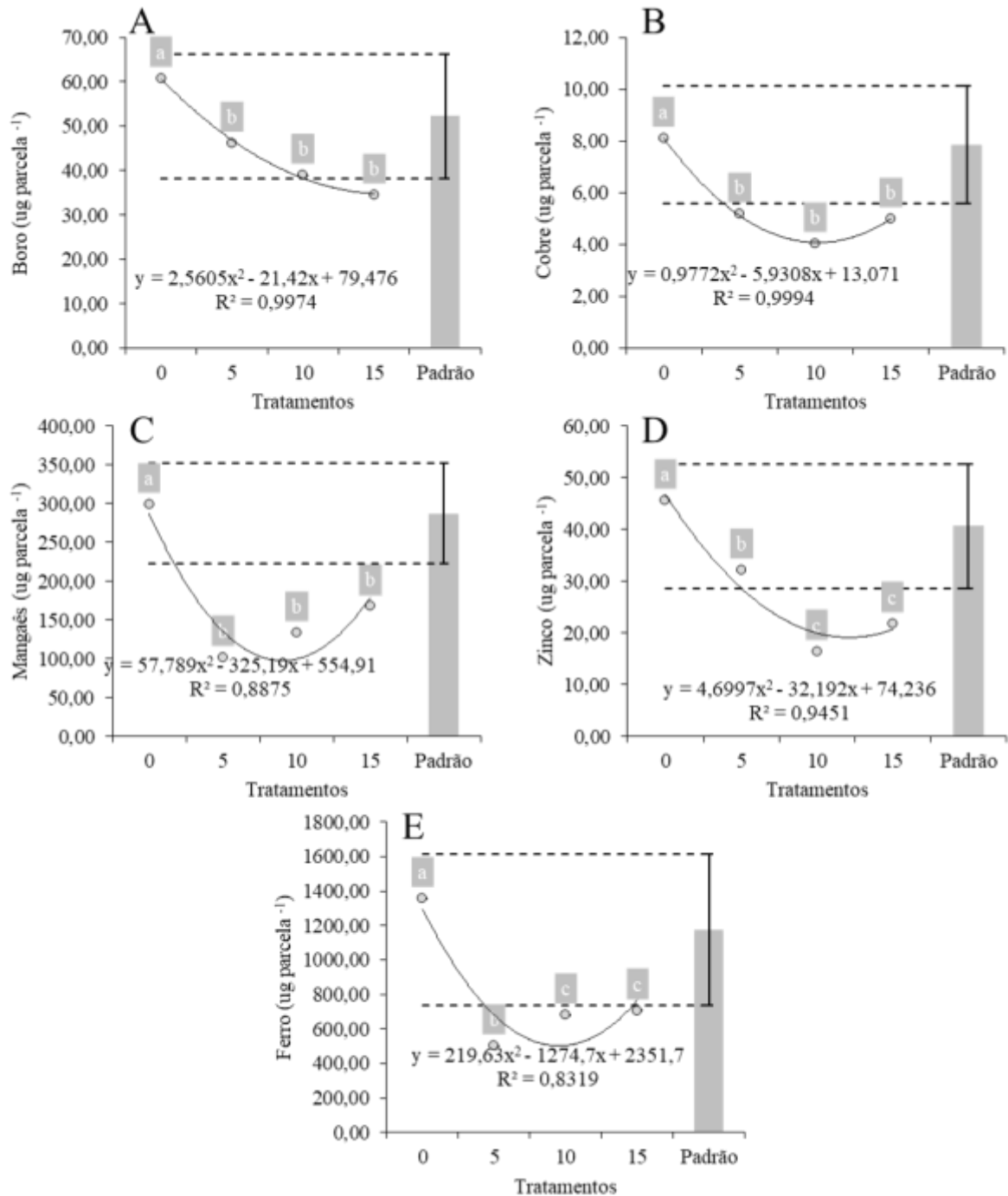
*As letras maiúsculas representam acúmulo total de nutrientes por parcela. A: Boro, B: Cobre, C: Manganês, D: Zinco, E: Ferro.

Fonte: Da autora (2020).

O acúmulo de micronutrientes em relação as doses de ácidos fúlvicos foram significativos pelo Teste F. Foi observado que, conforme aumentou as concentrações de ácidos fúlvicos, menor foi o acúmulo de boro e ferro. Para o manganês, cobre e zinco o menor acúmulo

ocorreu na concentração intermediária do produto. Para todos os micronutrientes o acúmulo foi maior na menor concentração do ácido (FIGURA 8).

Figura 8 - Acúmulo de micronutrientes em plantas de morangueiro sob estresse salino cultivadas em diferentes doses de ácido fúlvico. UFLA, Lavras-MG, 2020.



*As letras maiúsculas representam acúmulo total de nutrientes. A: Boro, B: Cobre, C: Manganês, D: Zinco, E: Ferro

Fonte: Da autora (2020).

Em resumo, diante dos resultados apresentados, pode-se afirmar que a concentração de sal utilizada *in vitro* foi suficiente para ocasionar estresse nas plantas. Observou-se uma relação direta entre o aumento das concentrações de ácidos húmicos e fúlvicos e aumento da atividade do sistema de defesa vegetal em resposta ao sal aplicado durante o crescimento das mudas em casa de vegetação, sugerindo que plantas desenvolvidas *in vitro*, na presença dos ácidos, respondem ao estresse biótico de forma mais rápida. Os ácidos também propiciaram um efeito positivo no aumento do teor de clorofila das mudas expostas ao estresse.

5 CONCLUSÃO

Os ácidos húmicos e fúlvicos podem ser utilizados *in vitro* para produzir mudas de morangueiros mais responsivas ao estresse por salinidade. O aumento gradativo das concentrações de ambos os ácidos aumenta a resposta das plantas à situação de estresse.

REFERÊNCIAS

- ADANI, F.; GENEVINI, P.; ZACCHEO, P.; ZOCCHI, G. The effect of comercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, [s.l.], v. 21, p. 561-575, 1998.
- AGGARWAL, D. *et al.* Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v. 48, n. 5, p. 521-529, jul. 2012.
- AGUIAR, N. O.; OLIVARES, F. L.; NOVOTNY, E. H.; DOBBSS, L. B.; BALMORI, D. M.; SANTOS-JÚNIOR, L. G.; CHAGAS, J. G.; FAÇANHA, A. R.; CANELLAS, L. P. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 362, p. 161-174, 2013.
- AGUIAR, N. de O. **Perfil metabólico de cana-de-açúcar tratada com bioinoculante à base de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas**. 2015. 124 p. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologias Agropecuárias) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2015. Disponível em:
- AKLADIOUS, S. A.; MOHAMED, H. I. Ameliorative effects of calcium nitrate and humic acid on the growth, yield component and biochemical attribute of pepper (*Capsicum annum*) plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 236, p. 244–250, dec. 2018.
- ALBUQUERQUE, M. M. S. *et al.* In vitro establishment of *Comanthera curralensis*, “sempre viva” native of Chapada Diamantina – Bahia. **Ciência Rural**, [online], Santa Maria, v. 46, n. 6, p. 991-995, jun. 2016.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2004.
- ANDRADE, F. M. *et al.* Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 223-225, n. April, p. 120-128, 2019.
- ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. **A cultura do morango**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2011, 52 p. (Coleção Plantar, 68).
- 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**, [s.l.], v. 7, n. 7, p. 1073-1086, 2012.
- AYDIN, A.; KANT, C.; TURAN, M. Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Rev. Ciênc. Agron.**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 127-134, jan./mar. 2016.
- BACILIO, M.; MORENO, M.; BASHAN, Y. Mitigation of negative effects of progressive soil salinity gradients by application of humic acids and inoculation with *Pseudomonas stutzeri* in a salt-tolerant and a salt-susceptible pepper. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 107, p. 394-404, 2016.

BALDOTTO, M. A.; MUNIZ, R. C.; BALDOTTO, L.; DOBBSS, L. B Root growth of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. treated with humic acids isolated from typical soils of Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 58, p. 504-511, 2011.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A Adventitious rooting on the Brazilian red-cloak and sanchezia after application of indole-butyric And humic acids. **Horticultura Brasileira**, [s.l.], v. 32, p. 426-431, 2014.

BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v.29, p. 850-859, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975011000991>. Acesso em: 25 out. 2019.

BORCIONI, E.; MÓGOR, A. F.; PINTO, F. Aplicação de ácido fúlvico em mudas influenciando o crescimento radicular e produtividade de alface americana1. **Revista Ciência Agrônômica**, [s.l.], v. 47, n. 3, p. 509-515, 2016.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods and Enzimology**, [s.l.], v. 52, p. 302-310, 1978.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. de A. **Humosfera**: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes, UENF, 2005. 348 p.

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

CANELLAS, L. P. *et al.* Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 196, p. 15-27, 2015.

CAVALCANTE, L. F.; VIEIRA, M. S.; SANTOS, A. F.; OLIVEIRA, W. M.; NASCIMENTO, J. A. M. Água salina e esterco bovino líquido na formação de mudas de goiabeira cultivar Paluma. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 251-261, 2010.

CLAYES, H. *et al.* What is stress?: dose-response effects in commonly used in vitro stress assays. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 165, n. 1, p. 519-517, 2014.

CUNHA JUNIOR, L. C.; JACOMINO, A. P.; OGASSAVARA, F. O.; TREVISAN, M. J.; PARISI, M. C. M. Armazenamento refrigerado de morango submetido a altas concentrações de CO₂. **Horticultura Brasileira**, [s.l.], v. 30, p. 688-694, 2012.

DEBERGH, P. C. Acclimatization techniques of plants from in vitro. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v. 289, p. 291-300, 1991.

DIAS, N. S.; BLANCO, F. F.; SOUZA, E. R.; FERREIRA, J. F. S.; SOUSA NETO, O. N.; QUEIROZ, I. S. R. Efeitos dos sais na planta e tolerância das culturas à salinidade. *In*: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F.; GOMES FILHO, E. (Eds.). **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2016. p. 149-162.

DINIZ NETO, M. A.; SILVA, I. de F. da; CAVALCANTE, L. F.; DINIZ, B. L. M. T.; SILVA, J. C. A. da; SILVA, E. C. da. Mudanças de oiticica irrigadas com águas salinas no solo com biofertilizante bovino e potássio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s.l.], v.18, p.10-18, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662014000100002>. Acesso em: 25 set. 2019.

DOBBSS, L. B.; BALDOTTO, M. A.; CANELLAS, L. P.; RUMJANEK, V. M. Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de Latossolos brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 33, p. 51-63, 2009.

DREW, R. A. The effects of medium composition and cultural conditions on in vitro root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, [s.l.], n. 62, p. 551-556, 1987.

ENGEL, V. L.; 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**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 156, p. 225-46, 2018.

FAGHERAZZI, A. F. *et al.* Desempenho produtivo e qualitativo de morangueiros submetidos a dois tipos de mulching. **Revista da 14ª Jornada de Pós-Graduação e 102 Revista Científica Rural**, Bagé-RS, v. 21, n. 3, 2019.

FARH, M. E. A. *et al.* Aluminium resistant, plant growth promoting bacteria induce overexpression of Aluminium stress related genes in *Arabidopsis thaliana* and increase the ginseng tolerance against Aluminium stress. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 200, p. 45-52, 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FOROUZI, A.; GHASEMNEZHAD, A.; NASRABAD, R. G. Phytochemical response of *Stevia* plant to growth promoting microorganisms under salinity stress. **South African Journal of Botany**, [s.l.], p. 1-10, 2020.

FULTON, J. P.; MCGREW, J. R. Introduction. *In*: FRAZIER, N. W. (Ed.). **Virus diseases of small fruits and grapevine**. Berkeley: University of California-Division of Agricultural Sciences, 1970. p. 1-4.

GARCÍA-GONZÁLES, R.; QUIROZ, K.; CARRASCO, B.; CALIGARI, P. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. **Cien. Inv. Agr.**, [s.l.], v. 37, n. 3, p. 5-30, 2010.

GIANNOPOLITIS, C.; RIES, S. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 59, p. 309-314, 1977.

HANAFY AHMED, A. H.; DARWISH, E.; HAMODA, S. A. F.; ALOBAIDY, M.G. Effect of putrescine and humic acid on growth, yield and chemical composition of cotton plants grown under saline soil conditions. **Amer. Eura. J. Agri. Environ. Sci.**, [s.l.], v. 13, n. 4, 479-497, 2013.

HAVIR, E.; MCHALE, N. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, v. 84, p. 450–455, 1987. henypropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Chemistry and Ecology**, [s.l.], v. 36, p. 662-669.

JAIN, M. *et al.* Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cells lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 5, p. 463-468, Feb. 2001.

KHALID, A.; AFTAB, F. Effect of exogenous application of 24-epibrassinolide on growth, protein contents, and antioxidant enzyme activities of in vitro-grown *Solanum tuberosum* L. under salt stress. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, [s.l.], v. 52, n. 1, p. 81-91, 2016.

LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 64, Issue 1, January 2013, p. 83-108, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers326>. Acesso em: 15 ago. 2019.

LICHTENTHALER, H. K. El estrés y la medida del estrés en plantas. *In*: REIGOSA, M. J.; PEDRO, N.; SÁNCHEZ, A. (Eds.). **La Ecofisiología Vegetal – Una ciencia de síntesis**: Madrid. Thomson. 2004. Cap. 2. p. 59-111.

LIU, M. *et al.* Maize (*Zea mays*) growth and nutrient uptake following integrated improvement of vermicompost and humic acid fertilizer on coastal saline soil. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 142, p. 147-154, April 2019.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 31 p.

MAZHAR, A. A. M.; SHEDEED, S. I.; ABDEL-AZIZ, N. G.; MAHGOUB, M. H. Growth. Flowering and chemical constituents of *Chrysanthemum indicum* L. Plant in response to diferente levels of humic acid and salinity. **Journal os Applied Sciences Research.**, [s.l.], v. 8, n. 7, p. 3697-3706, 2012.

MENDES, B. S. DA S. *et al.* Mecanismo fisiológicos e bioquímicos do abacaxi ornamental sob estresse salino. **Revista Caatinga**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 71-77, 2011.

- MOGHADDAM, A. R.; SOLEIMANI, A. Compensatory effects of humic acid on physiological characteristics of pistachio seedlings under salinity stress. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v. 940, p. 253–255, 1 dez. 2012.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, n. 25, n.1, p. 135-166, feb. 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiol. Plant.**, [s.l.], v. 15, p. 473–497, 1962. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific NARDI S, PIZZEGHELLO D, MUSCOLO. A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 34, p. 1527-1536, 2002.
- NARDI S, PIZZEGHELLO D, MUSCOLO. A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 34, p. 1527-1536, 2002.
- NUNES, J. C.; CAVALCANTE, L. F.; LIMA NETO, A. J.; REBEQUI, A. M.; DINIZ, B. L. M. T.; GHEYI, H. R. Comportamento de mudas de nim à salinidade da água em solo não salino com biofertilizante. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.16, n.11, p.1152-1158, 2012.
- OLIVEIRA, L. S. *et al.* Multiplicação e alongamento in vitro de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n.1, p. 235-247, jan./mar. 2016.
- OLIVEIRA, M. L. *et al.* Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 37-45, mar. 2014.
- OLIVEIRA, R. P. de; SCIVITTARO, W. B.; WREGGE, M. S.; UENO, B.; CASTRO, L. A. S. de. **Otimização da produção nacional de mudas de morangueiro**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 28 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 162).
- ORCUTT, D. M.; NILSEN, E. T. **Physiology of Plants Under Stress**. New York: John Wiley & Sons, 2000.
- PUGLISI, E.; PASCAZIO, S.; SUCIU, N.; CATTANI, I.; FAIT, G.; SPACCINI, R.; CRECCHIO, C.; PICCOLO, A.; TREVISAN, M. Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. **Journal of Geochemical Exploration**, [s.l.], v. 129, p. 82-94, 2013.
- REZENDE, R. A. L. S.; RODRIGUES, F. A.; SOARES, J. D. R.; SILVEIRA, H. R. de O.; PASQUAL, M; DIAS, G. de M. G. Salt stress and exogenous silicon influence physiological and anatomical features of in vitro-grown cape gooseberry. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 1-9, 18 abr. 2018. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6818656>. Acesso em: 14 set. 2019.

RIBEIRO, J. M. *et al.* Uso da rapadura como meio nutritivo in vitro de bananeira cv. Maçã. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 5, p. 722-725, set./out. 2013.

ROCHA, J. F. da. **Indução de calos em explantes foliares de *Cissus verticillata* (L.) NICOLSON & C. E. Jarvis**. 2014. 41 p. Tese (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2014.

ROSSATO, M. *et al.* Multiplication and in vitro rooting of *Campomanesia adamantium* Camb. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 70-77, nov. 2015.

SAIDIMORADI D., N. Ghaderi T. Javadi Salinity stress mitigation by humic acid application in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 256, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108594>. Acesso em: 14 set. 2018.

SANTOS, E. M. *et al.* Effect of irrigation depths on leaf physical characteristics of micropropagated Torch Ginver. **Irriga**, Botucatu, v. 20, n. 4, p. 630-637, dez. 2015.

SCHIAVON, M.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; FRANCIOSO, O.; NARDI, S. High molecular size humic substances enhance. **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 36, p. 662-669, 2010.

SILVA, A. C.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; AGUIAR, N. O.; FRADE, D.; REZENDE, C. E.; PERES, L. E. P. Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 35, p. 1609-1617, 2011.

SILVA, A. F.; DIAS, M. S. C.; MARO, L. A. C. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**, [s.l.], v. 28, n. 236, p. 7-13, 2007.

SILVA, A.C.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; DOBBSS, L.N.; AGUIAR, N.O.; FRADE, D.O.R.; REZENDE, C.E.; PERES, L.P.E. Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 35, n. 5, 2013.

SILVA, L. A.; SALES, J. F.; NEVES, J. M. G.; SANTOS, H. O.; SILVA, G. P. Radiographic image analysis in achenes of *Anacardium othonianum* Rizz (anacardiaceae) submitted to drying. **Acta Scientiarum**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 235-244, 2017.

SILVEIRA, D. G. *et al.* Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização in vitro e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 3, p. 544-553, jul./set. 2013.

SOFO, A.; SCOPA, A.; NUZZACI, M.; VITTI, A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 6, p. 13561-13578, 2015.

SOUSA, G. G.; AZEVEDO, B. M.; ALBUQUERQUE, A. H. P.; MESQUITA, J. B. R.; VIANA, T. V. A. Estresse salino em plantas de feijão-caupi em solo com fertilizantes orgânicos. **Revista Agro@mbiente** [on-line], v. 8, n. 3, p. 359-367, 2014.

SOUZA, A. B. O.; BEZZERRA, M. A.; FARIAS, F. C. Germinação e desenvolvimento inicial de clones de cajueiro comum sob irrigação com água salina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 4, p. 390-394, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meios de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2001. 19 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 24).

TREVISAN, S.; PIZZEGHELLO, D.; RUPERTI, B.; FRANCIOSO, O.; SASSI, A.; PALME, K.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. **Plant Biology**, [s.l.], v. 12, p. 604- 614, 2010.

US-CAMAS, R.; SOLIS, G. R.; DUARTE-AKE, F.; DE-LA-PENA, C. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Dordrecht, v. 118, n. 2, p. 187-201, apr. 2014.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 64-70, jan./mar. 2013.

YASMEEN, T. *et al.* Biofilm forming rhizobacteria enhance growth and salt tolerance in sunflower plants by stimulating antioxidant enzymes activity. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 156, n. July, p. 242-256, 2020.

ZHANG, H.; LIU, Y.; WEN, F.; YAO, D.; WANG, L.; GUO, J.; NI, L.; ZHANG, A.; TAN, M.; JIANG, M. A novel rice C2H2-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice. **Journal of Experimental Botany**, England v. 65, n. 20, p. 5795-5809, 1 nov. 2014.

ZHU, Y. *et al.* Silicon confers cucumber resistance to salinity stress through regulation of proline and cytokinins. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 156, p. 209-220, September, 2020.

ZHU, Y.; GONG, H. Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. **Agronomy for Sustainable Development**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 455-472, 2014. Disponível em: Acesso em: https://www.researchgate.net/journal/1774-0746_Agronomy_for_Sustainable_Development. Acesso em: 7 out. 2019.

ANEXO

Tabela de análise de solo para o cultivo do morango em casa de vegetação.

Identifi- cação	ph	K mg/dm ³	P mg/dm ³	Ca	Mg	Al	H+ Al cmolc/dm ³	SB	t	T	V %	m %	MO dag/kg	Prem mg/L	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
Solo Morango	5,3	47,72	0,64	0,98	0,16	0,13	2,32	1,26	1,39	3,58	35,26	9,35	1,39	14,16	0,48	25,16	3,6	1,46	0,01	44,68

Fonte: Da autora (2020).