

**ÁCIDOS HÚMICOS E OS MECANISMOS DE MITIGAÇÃO DO
EFEITO DO ESTRESSE SALINO EM PLÂNTULAS DE MILHO**

ALINE DA COSTA SOUZA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2019**

ÁCIDOS HÚMICOS E OS MECANISMOS DE MITIGAÇÃO DO EFEITO DO ESTRESSE SALINO EM PLÂNTULAS DE MILHO

ALINE DA COSTA SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S729

Souza, Aline da Costa.

Ácidos húmicos e os mecanismos de mitigação do efeito do estresse salino em plântulas de milho / Aline da Costa Souza. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

69 f.

Bibliografia: 54 - 66.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.
Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas.

1. Vermicomposto. 2. Substâncias húmicas. 3. Salinidade. 4. Catalase. 5. Balanço iônico .
I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

ÁCIDOS HÚMICOS E OS MECANISMOS DE MITIGAÇÃO DO EFEITO DO ESTRESSE SALINO EM PLÂNTULAS DE MILHO

ALINE DA COSTA SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal

Aprovada em 29 de março de 2019

Comissão Examinadora



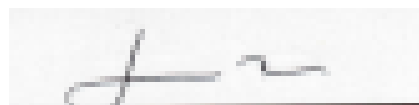
Prof. Daniel Basílio Zandonadi (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UFRJ



Prof. Fábio Lopes Olivares (PhD., Ciências do Solo) – UENF



Pesq. Natália de Oliveira Aguiar Canellas (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (PhD., Ciências do Solo) – UENF
(Orientador)

A Deus.

Aos meus avós, Adalto e Antônio (*In memoriam*);

A minha filha Isis.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA) e as entidades de fomento, CAPES, CNPq, FAPERJ pela oportunidade de realização do Mestrado;

Ao meu orientador Luciano Canellas e aos colaboradores Cleiton Soares, Natália Canellas e Fábio Olivares;

Ao meu vô Totôe (*In memoriam*) minha fonte de inspiração;

À minha filha Isis, gratidão por manter minha sanidade;

Aos meus amigos de laboratório, Silézio, Deyse, Luiz Eduardo, Rafael e Lívia, por me ajudar no meu crescimento pessoal e profissional;

Aos colegas do LBCT e da BIOMOL, em especial ao Cleiton e a Letícia por compartilharem seu conhecimento e experiência;

Aos amigos/família Leonardo, Jaídson, Fernanda, Jessica e Otto. Vocês são a família que eu escolhi e sou muito grata a vocês!

A todos aqueles que de forma indireta fizeram parte da minha história, toda minha gratidão.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 5 |
| 2.1. Adaptação das plantas ao estresse salino..... | 5 |
| 2.1.1. Ajustamento osmótico..... | 7 |
| 2.1.2. Indução de fitormônios..... | 9 |
| 2.1.3. Estresse Oxidativo e mecanismos de eliminação de Espécies reativas de oxigênio (EROs)..... | 10 |
| 2.1.4. Genes de resposta à salinidade..... | 11 |
| 2.2. Bioatividade das substâncias húmicas e mitigação do estresse salino ... | 13 |
| 2.2.1. Conceito de substâncias húmicas..... | 13 |
| 2.2.2. Bioatividade das substâncias húmicas..... | 14 |
| 2.2.3. SH e a redução dos danos causados pelo estresse salino..... | 16 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 3.1. Produção do vermicomposto..... | 21 |
| 3.2. Extração e isolamento dos ácidos do tipo húmico..... | 21 |
| 3.3. Análise dos AH..... | 22 |
| 3.4. Ensaio com plântulas..... | 22 |
| 3.5. Análises das plântulas..... | 24 |
| 3.5.1. Biomassa..... | 24 |
| 3.5.2. Determinação de Ca, K, Mg, Na, S e P na parte aérea..... | 24 |
| 3.5.3. Atividade da catalase (EC 1.11.1.6)..... | 24 |
| 3.5.4. Análise estatística..... | 25 |
| 4. RESULTADOS | 26 |
| 4.1. Caracterização dos AH..... | 26 |
| 4.2. Produção de massa fresca..... | 27 |
| 4.3. Teor de Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ e Mg ²⁺ totais na massa fresca da parte aérea..... | 29 |
| 4.4. Atividade da catalase (EC 1.11.1.6)..... | 32 |
| 4.5. Trabalhos publicados e indexados na base Web of Science (2000-2018) sob a ação das SH na mitigação do estresse salino..... | 34 |
| 5. DISCUSSÃO | 37 |
| 6. RESUMO E CONCLUSÃO | 42 |

| | |
|---------------------|----|
| 7. REFERÊNCIAS..... | 44 |
| 8. APÊNDICE..... | 57 |

RESUMO

SOUZA, Aline da Costa, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2019. Ácidos húmicos e os mecanismos de mitigação do efeito do estresse salino em plântulas de milho. Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas.

A salinidade é uma condição natural dos solos em regimes áridos e semiáridos nos quais a evapotranspiração potencial é, na maior parte do tempo, muito intensa, favorecendo o acúmulo de sais. Além disso, nas zonas litorâneas ou em áreas cultivadas com manejo equivocado da irrigação a salinidade é uma das principais causadoras da degradação dos solos e da quebra de produtividade. Os bioestimulantes vegetais foram definidos como materiais ou microrganismos que, quando aplicados em pequenas concentrações, podem promover a absorção de nutrientes, o crescimento das plantas e atenuar os danos de estresses bióticos e abióticos em plantas. Os ácidos húmicos têm sido um dos materiais mais utilizados na formulação dos bioestimulantes e já foi relatado o seu uso com sucesso na mitigação dos efeitos do estresse salino em diferentes tipos de plantas. O objetivo desse trabalho foi avaliar os possíveis mecanismos responsáveis pela mitigação dos danos proporcionados pelo estresse salino em plântulas de milho. Para tanto, foi realizado um levantamento nas bases indexadas *Web of Science* e *Google Scholar* dos artigos publicados a partir de 2000 com as palavras-chave “humic” e “salinity” e “salt stress”. A seguir, foi realizado um experimento dividido em duas fases. Na primeira, plântulas de milho com doze dias após a emergência foram crescidas em substrato areia:vermiculita

(2:1, v:v) e tratadas ou não (controle com solução nutritiva de Furlani com 25% da concentração) com ácidos do tipo húmicos isolados de vermicomposto na concentração de 3,5 mM C e solução salina composta por NaCl 60 mM. Após cinco dias de tratamento uma parte do experimento foi colhida para análise e outra parte foi novamente submetida aos tratamentos (controle, AH e NaCl) por mais 72 h. Ao final, as plantas foram colhidas e avaliados a biomassa, o teor de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} e a atividade das enzimas antioxidantes. Foi possível observar que os AH podem reduzir os danos produzidos pelo estresse salino em plântulas de milho pelo aumento na produção de biomassa, alteração no balaço iônico celular e pela promoção da atividade de enzimas antioxidantes. Outros mecanismos relacionados pela literatura na mitigação dos efeitos do estresse salino pelas substâncias húmicas incluem também a alteração no balanço hormonal, aumento na taxa fotossintética e conteúdo de clorofila e, ainda aumento da concentração de compostos osmoprotetores como prolina e açúcares solúveis. O uso de AH em baixas concentrações diretamente em plântulas de milho foi eficiente na redução dos danos provocados pela salinidade.

ABSTRACT

SOUZA, Aline da Costa, M.Sc., Universidade Estadual Do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro. March, 2019. Humic acids and mechanisms of mitigation of saline stress. Advisor: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas.

Salinity is a natural condition of soils in arid and semi-arid regimes in which potential evapotranspiration is very intense favoring salt accumulation. In addition, salinity is one of the main causes of soil degradation and productivity decline in coastal areas or in areas under irrigation. Plant biostimulants have been defined as any substance or microorganism applied to plants with the aim to enhance nutrition efficiency, abiotic stress tolerance and/or crop quality traits, regardless of its nutrients content. Humic acids have been one of the most used materials in the formulation of biostimulants. It was previously reported its use against salinity stress on different plants. The objective of this work was to evaluate the possible mechanisms responsible for mitigating the damages caused by saline stress in maize seedlings. It was performed a survey on the Web of Science and Google Scholar databases of articles published since 2000 with the keywords "humic" and "salinity" and "salt stress". Thereafter, an experiment was carried out divided into two phases. In the first one, maize seedlings with 12 days after emergence were grown on sand: vermiculite (2:1, v: v) substrate and treated or not (control with Furlani's nutrient solution with 25% of total concentration) with like humic acids isolated from vermicompost at the concentration of 3.5 mM C L⁻¹ of Furlani's solution) and saline solution composed by 60 mM NaCl L⁻¹ Furlani's solution. After five days of treatments one part of maize seedlings was harvested for analysis and

another part was submitted again to the treatments (HA and NaCl) for another 72 hours. At the end, the maize seedlings were harvested and biomass, Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ content and the activity of antioxidant enzymes were evaluated. It was possible to observe that HA can reduce the damage caused by saline stress in maize seedlings by increasing biomass production, changing cellular ionic balance and promoting the activity of antioxidant enzymes. Other mechanisms related by the scientific literature in mitigating the effects of saline stress by humic substances also include changes in hormonal balance, increase in photosynthetic rate and chlorophyll content, and an increase in the concentration of osmoprotective compounds such as proline and soluble sugars. The use of AH at low concentrations directly on maize seedlings was efficient in reducing damage caused by moderate salinity.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que uma grande parte dos solos da superfície da terra seja afetada por sais. De acordo com a FAO (1979), cerca de 20% das terras cultiváveis são consideradas salinas e mais da metade das áreas irrigadas está sob influência da salinização.

A salinidade natural, ou primária, corresponde à acumulação de sais solúveis no solo e lençol freático em período geológico devido à intemperização de minerais. Os principais sais solúveis encontrados nos solos salinos são cloretos, sulfatos e bicarbonatos de sódio (Na), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Esse fenômeno é favorecido em regiões áridas e semiáridas, dentro de zonas tropicais e temperadas. A baixa precipitação diminui a lixiviação de sais, enquanto as taxas elevadas de evapotranspiração favorecem o acúmulo de sais e superfície devido à ascensão da água por capilaridade (Ribeiro et al., 2016).

A salinidade secundária por sua vez, é uma consequência do manejo intenso e equivocado da irrigação e fertirrigação, irrigação com ausência ou drenagem irregular, lâmina insuficiente de água ou superirrigação, uso de água salina, uso indiscriminado de agroquímicos, ou mesmo a combinação destes fatores. O superpastejo, o desmatamento e a agricultura intensiva aceleram o processo de degradação e desestruturação do solo (De Lima et al., 2016).

O efeito acúmulo de sais pode provocar a destruição da estrutura do solo, a dispersão das argilas e coloides, promovendo a formação de estratos impermeáveis, decorrentes da precipitação de carbonatos e silicatos. A falta de

estrutura prejudica o desenvolvimento das raízes e as trocas gasosas e associações de água. Com o desenvolvimento pedológico, os solos afetados por sais desenvolveram estrutura típica colunar e somente plantas adaptadas a viver em elevada salinidade podem sobreviver (Ferreira et al., 2016).

As plantas respondem de maneiras diferentes aos mesmos níveis de salinidade, as mais tolerantes, plantas halófitas, conseguem extrair água com mais facilidade e ajustam-se osmoticamente em meio altamente salino. No entanto, a maioria das plantas cultivadas são glicofitas, menos tolerantes, e não se desenvolvem bem com concentrações de sais solúveis equivalentes a 40 mM de NaCl e condutividade acima de 4 dS m⁻¹ (Munns e Tester, 2008; Dias e Blanco, 2010).

| EFEITO DO ESTRESSE SALINO EM PLANTAS | | |
|--|---|--|
| Crescimento | Fisiologia | Biologia Molecular |
| <ul style="list-style-type: none"> • Inibição da germinação • Redução do crescimento • Envelhecimento precoce • Redução da produtividade | <ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da absorção de água • Mudanças na taxa de transpiração • Diminuição da fotossíntese • Diminuição da respiração • Toxicidade iônica | <ul style="list-style-type: none"> • Alteração na expressão gênica • Redução da atividade enzimática • Redução nas proteínas • Degradação de membranas |

Figura 1. Efeito geral do estresse salino no crescimento, na fisiologia e biologia molecular das plantas.

As plantas tentam se adaptar à salinidade dos solos por mecanismos que procuram evitar a salinidade e tolerar o efeito da elevada concentração de sais, parte da estratégia adaptativa ao longo da evolução. O primeiro mecanismo tenta evitar a absorção de sais com redução da permeabilidade de raiz, diluição da concentração de sais pelo aumento da turgescência e flexibilização da parede celular, acumulação ativa e compartimentalização de íons no vacúolo. As bombas de prótons membrana têm seu papel crucial nesse mecanismo porque além de promover a extrusão de H⁺ e aumento do gradiente eletroquímico, promovem a ativação de transportadores secundários de íons (Dias e Blanco, 2010; Silveira et al., 2016).

O mecanismo de tolerância à salinidade pode ser resumido em: Percepção do estresse por proteínas sensoras, ativação da sinalização celular, alteração na expressão de genes resposta à salinidade, acúmulo de solutos compatíveis, síntese de proteínas contra o estresse, aumento do metabolismo oxidativo, ativação de mecanismos de homeostase iônica, ativação de transportadores e ajuste do balanço hormonal (Munns e Tester, 2008; Prisco e Filho 2010, Silveira et al., 2016).

É bem conhecido o fato de que plantas que crescem em solo com conteúdo elevado de matéria orgânica e água de qualidade crescem e se desenvolvem suportando ou resistindo melhor ao efeito de diferentes tipos de estresse abiótico. A maior parte da matéria orgânica do solo, água e nutrientes é formada pelas substâncias húmicas que em função dos grupos funcionais influenciam a raiz. As propriedades do solo como agregação, CTC, capacidade de retenção de água também influenciam o crescimento das plantas. Além disso, as substâncias húmicas têm sido utilizadas diretamente sobre as plantas, modificando a morfologia e fisiologia e bioquímica das plantas e o efeito descrito como bioestimulante (Canellas e Olivares, 2014).

Os bioestimulantes foram definidos como materiais que contêm uma ou mais substâncias ou microrganismos capazes de estimular a absorção e uso eficiente de nutrientes pelas plantas, aumentar a tolerância das plantas a estresses biótico e abiótico, aumentar a qualidade da cultura, quando aplicados em pequenas concentrações (Du Jardim, 2015).

O objetivo deste trabalho foi identificar os principais mecanismos envolvidos na mitigação da salinidade em plantas tratadas com SH. Para tanto, foi realizado na primeira parte uma revisão de literatura que procura descrever os principais mecanismos que envolvem as SH e a salinidade.

Plântulas de milho foram submetidas durante 5 dias aos tratamentos com estresse salino por NaCl 60 mM (salinidade moderada), ácidos do tipo húmicos (AH) isolados de vermicomposto 3,5 mM C e Controle (¼ solução nutritiva Furlani I força). Após esse período as plântulas foram novamente tratadas ou não (Controle) com NaCl e AH. Foram avaliados parâmetros de crescimento (massa fresca e seca de raiz e parte aérea), teor de (mg.g^{-1}) de sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), bem como as relações K^+/Na^+ $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ e atividade da enzima antioxidante catalase (EC 1.11.1.6). Foi

observado que a recuperação do estresse salino em plântulas tratadas com AH envolveu além do aumento de massa fresca, a ativação do sistema de proteção antioxidante da enzima catalase (CAT), bem como as relações K^+/Na^+ aumentadas na presença de HA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Adaptação das plantas ao estresse salino

Grandes extensões de terra em regimes áridos e semiáridos e locais costeiros sob influência das marés são naturalmente afetadas por sais. Além disso, o manejo intensivo e/ou equivocado da irrigação-fertirrigação pode contribuir para a acumulação de sais na superfície. De um modo geral, a maioria das plantas cultivadas, menos tolerantes à salinidade, começam a apresentar diminuição significativa de produtividade em solos com condutividade elétrica (CE) acima de 4 dS m^{-1} i.e., cerca de 40 mM de NaCl (Munns e Tester, 2008; Dias e Blanco, 2010).

O estresse salino é caracterizado por uma fase inicial conhecida como fase osmótica ou seca fisiológica, que afeta as relações hídricas solo-planta resultando na produção e acumulação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, promovem danos oxidativos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. A fase osmótica é rápida e inibe o crescimento de folhas jovens, ocorrem reduções rápidas e transitórias nas taxas de expansão foliar que são atribuídas às mudanças nas relações de água na célula. Devido à limitação de água, as plantas priorizam o uso da água em função, por exemplo, da formação e amadurecimento de grãos. Depois da fase inicial, a acumulação de Na^+ pode promover a toxicidade de íons e o desbalanço nutricional. A fase iônica é mais lenta, acelera a senescência das folhas maduras e afeta as propriedades e a estrutura das membranas. O aumento da concentração de Na^+ celular altera a

absorção de K^+ , reduz o crescimento e pode até levar à morte celular (Munns, 2002; Munns e Tester, 2008).

O estresse salino envolve, portanto, mudanças em processos fisiológicos, metabólicos e moleculares e seu efeito varia tanto com a concentração como com a duração da exposição aos sais. Algumas estratégias adaptativas são utilizadas pelas plantas para reduzir os danos causados pelo estresse salino. Entre estas estratégias Dias e Blanco, (2010), Prisco e Filho (2010) consideram:

- Acumulação ou exclusão seletiva de íons;
- Controle da entrada de íons pelas raízes e transporte para as folhas;
- Tolerância do tecido ao Na^+ ou Cl^- acumulado;
- Ajustamento osmótico;
- Indução da produção de hormônios;
- Aumento da atividade de enzimas antioxidantes.

Plantas adaptadas a ambientes salinos (halófitas) possuem mecanismos de acumulação de Na^+ nos vacúolos, enquanto que, as que não acumulam sais (glicófitas) apresentam diminuição significativa no crescimento da parte aérea como consequência direta da inibição de processos relacionados à fotossíntese (Dias e Blanco, 2010; Munns e Tester, 2008; Pedrotti et al., 2015; Bindumadhava et al., 2016).

Os primeiros mecanismos de alívio do estresse são a tentativa de exclusão e compartimentalização de Na^+ . O influxo de Na^+ nas células das raízes é um processo passivo, mediado por canais iônicos e sistemas de transporte uniporte. Outros transportadores também podem ser utilizados pelo Na^+ como, por exemplo, os transportadores de potássio de alta afinidade (HKT). O excesso de Na^+ causa toxicidade nas células vegetais e resulta no desequilíbrio iônico (Munns e Tester, 2008; Silveira et al., 2016).

O Na^+ absorvido pelas plantas pode ser excluído das células ou transferido para a região metabólica inativa, o vacúolo. O antiporte vacuolar Na^+/H^+ é responsável pela translocação do Na^+ para o vacúolo, reduzindo a concentração de Na^+ no citoplasma. Uma possibilidade para a retranslocação de Na^+ é o acoplamento de gradientes inversos de H^+ criados por H^+ -ATPases, o antiporte Na^+/H^+ utiliza esses gradientes trocando H^+ externo pelo Na^+ interno. A exclusão de Na^+ das células foi associado principalmente à atividade dos

antiportadores Na^+/H^+ . (Gaxiola et al., 1999; Munns e Tester, 2008; Liang et al., 2013).

O excesso de Na^+ intracelular reduz a concentração do K^+ citosólico. Em ambientes com alta concentração de Na^+ , a manutenção das altas relações de K^+/Na^+ no citosol é uma condição essencial para a manutenção da turgescência celular e da homeostase celular. Para tanto, as células vegetais empregam o transporte ativo primário (H^+ -ATPases), associado ao transporte ativo secundário, realizado por carreadores em sistemas de co-transporte para manter uma elevada relação citosólica de K^+/Na^+ (Maathuis et al., 1999; Silveira et al., 2016).

A presença de K^+ e Ca^{2+} diminui o influxo de Na^+ nas células vegetais, logo, a manutenção de maiores razões de K^+ e Ca^{2+} para Na^+ , particularmente em tecidos jovens e em expansão, são características importantes da tolerância das plantas ao sal (Wei et al., 2003). O Na^+ induz a inibição do crescimento das brotações em função da redução de cálcio e desequilíbrio nutricional. A manutenção relação aumentada de K^+/Na^+ na parte aérea é importante, devido à menor capacidade de armazenamento de sódio e maior exigência de K^+ e solutos orgânicos compatíveis (Glenn et al., 1999).

2.1.1. Ajustamento osmótico

A síntese de solutos compatíveis é um mecanismo adaptativo que visa o alívio do estresse por meio de ajustamento osmótico, além da proteção de estruturas subcelulares e redução dos danos oxidativos (Wang et al., 2003; Munns e Tester, 2008). Os compostos osmoticamente ativos mais comumente reportados são a prolina, glicina-betaína, manitol e trehalose (Wang et al., 20003).

A prolina atua como um osmólito e está associada à estabilização de proteínas e enzimas antioxidantes, eliminação direta de EROS, sinalização celular e balanço da homeostase intracelular de maneira semelhante a tampão redox alterando as relações NADP/NADPH e GSH/GSSG (Liang et al, 2013).

A glicina betaína possui o papel fisiológico relacionado a osmorregulação do citosol e compartimentos celulares. O acúmulo de glicina betaina sob condições de estresse está relacionado à proteção de proteínas e na estabilização de membranas. O manitol e a trealose, auxiliam na homeostase osmótica por se acumularem preferencialmente no citosol e organelas, fazendo

contraponto aos íons salinos que se acumulam preferencialmente nos vacúolos (Silveira et al., 2016).

Em períodos curtos de exposição ao estresse salino foi possível observar a redução da condutividade hidráulica das raízes, já em períodos prolongados há uma recuperação parcial dessa condutividade que pode ser atribuída ao acúmulo de solutos compatíveis dentro das raízes das plantas (Calvo-Polanco et al., 2014).

As aquaporinas também têm um papel importante na regulação da condutividade hidráulica da raiz. Aquaporinas são proteínas canal de membrana que facilitam o transporte de água e outras pequenas moléculas não carregadas através das membranas celulares ao longo do gradiente de concentração (Calvo-Polanco et al., 2014).

O NaCl é um inibidor do transporte de água radicular mediado pela aquaporina. No entanto, a regulação da condutividade sob estresse salino tem se mostrado diretamente correlacionada com a expressão de alguns genes que induzem às aquaporinas, bem como com eventos de fosforilação de proteínas e desfosforilação (Calvo-Polanco et al., 2014).

O déficit hídrico ocasionado pelo excesso de sais em solução reduz imediatamente a expansão celular e causa o fechamento estomático. Os mecanismos de ajustamento osmótico permitem a redução do potencial osmótico e aumento no potencial de turgescência, facilitando a absorção de água e a manutenção do crescimento celular (Munns e Tester, 2008; Silveira et al., 2016)

O fechamento estomático minimiza a perda de água pela transpiração, evitando a desidratação das membranas celulares, no entanto, também limita a disponibilidade de CO₂ para as reações de carboxilação. Sendo assim, é possível observar que durante o estresse salino há a redução da taxa fotossintética, do conteúdo de clorofila e a área foliar, como estratégias de tolerância ao estresse (Esteves e Suzuki, 2008).

O K⁺ é um componente essencial para o ajustamento osmótico, atua na abertura e fechamento estomático, auxilia na ascensão capilar de NO₃⁻ e na ativação de enzimas antioxidantes. Esse íon se encontra preferencialmente no citosol e pode atingir elevadas concentrações nas células, não se liga quimicamente a nenhuma biomolécula e causa antagonismo com os íons Na⁺ (Silveira et al., 2016).

As bombas de H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP) atuam na proteção celular pela extrusão de prótons e a hiperpolarização da membrana plasmática levando a absorção de K⁺ através de canais de potássio que conduzem a abertura estomática. A estimulação da extrusão de prótons pela H⁺-ATPase e a ativação dos canais de K⁺ são componentes importantes de resposta ao estresse salino (Russel et al., 2006).

2.1.2. Indução de fitormônios

Os hormônios vegetais são fundamentais para sinalização e resposta das plantas ao estresse salino. O ABA é o principal hormônio relacionado às repostas aos diferentes estresses (entre eles o salino), após a percepção do sinal do estresse ele inicia uma cascata de sinalização conhecida como via dependente do ABA e posterior indução de genes de resposta ao estresse salino (Munns e Tester, 2008). O papel fisiológico deste hormônio durante o estresse é associado ao equilíbrio hídrico e à tolerância à desidratação celular. O balanço hídrico é realizado por alteração no fluxo de íons nas células guarda, na regulação estomática e na tolerância pela indução de genes que codificam proteínas de tolerância à desidratação (Esteves e Suzuki, 2008).

O ABA possui um papel antagônico relacionado às auxinas, ele inibe a iniciação e crescimento da raiz lateral, logo, a repressão do crescimento da raiz durante o estresse salino pode ser superada pelo aumento dos níveis de auxina, retomando o equilíbrio entre a repressão pelo ABA e a promoção do crescimento pela auxina (Zhao et al., 2014). Outros hormônios também foram relacionados à resposta ao estresse salino, entre eles, o etileno, as giberelinas (GB), citocininas, ácido salicílico (AS) e brassinosteroides (BR) (Munns e Tester, 2008). O etileno induz a abscisão como forma de dessalinização, uma vez que folhas mais velhas possuem quantidades consideráveis de sal (Silveira et al, 2010). As giberelinas (GA) são substâncias reguladoras de crescimento, responsáveis pela alongação, e controla a hidrólise de reservas (Munns e Tester, 2008; Bindumadhava et al., 2016).

2.1.3. Estresse Oxidativo e mecanismos de eliminação de Espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção de ·EROs tais como, superóxido($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) pode lesionar membranas, ácidos nucleicos e proteínas. Algumas substâncias podem atuar como antioxidantes retardando ou até evitando os danos causados pelo estresse oxidativo (Prisco e Filho, 2010). As respostas antioxidantes não enzimáticas incluem a produção de ascorbato, glutathiona (GSH), flavonoides, alcaloides, compostos fenólicos, cisteína, hidroquinonas, manitol, aminoácidos não proteicos, tocoferol e carotenoides (Gratão et al., 2005). Contudo, a principal atividade celular antioxidante é exercida por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX), glutathiona redutase (GR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR). Esses sistemas antioxidantes de modo geral podem remover, neutralizar ou eliminar radicais livres e seus intermediários e estão presentes no apoplasto, cloroplasto, citoplasma, mitocôndrias e nos peroxissomos (Prisco e Filho, 2010).

O ascorbato reduzido (ASA) é um substrato importante para redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular. A APX utiliza o ascorbato como doador de elétrons para reduzir uma molécula de H_2O_2 a H_2O e O_2 , com a formação de duas moléculas do MDHA. O MDHA é um radical instável e pode ser rapidamente desprotonado para produzir ascorbato e ácido deidroascórbico (DHA). O ascorbato atua na manutenção do tocoferol (vitamina E), um antioxidante solúvel em lipídio que interage com as EROs e inibe as reações de peroxidação de lipídios no interior dos diferentes sistemas de membranas celulares (Silveira et al., 2016).

A glutathiona reduzida (GSH) está relacionada à regulação da absorção de enxofre na raiz, em reações no redox e na expressão de genes de defesa. As enzimas SODs são responsáveis pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 e O_2 . A SOD atua em todos os locais onde ocorra a produção de EROS, durante a proteção oxidativa ocorre a produção imediata do H_2O_2 , que é removido pela ação de diferentes peroxidases (Silveira et al., 2016).

As peroxidases APXs estão amplamente distribuídas dentro da célula vegetal e as CATs são localizadas nos peroxissomos. As APXs utilizam o ASA como doador de elétrons para reduzir o H_2O_2 para H_2O e O_2 . O papel da APX na

proteção oxidativa ocorre associado à ação das enzimas GR, MDHAR e DHAR, que compõem o ciclo do ascorbato-glutationa. As enzimas CAT catalisam a redução do H_2O_2 para H_2O e O_2 , protegendo a célula dos danos oxidativos ocasionados pelo excesso do H_2O_2 . Durante a fotorrespiração a catalase é essencial para a remoção do H_2O_2 gerado no peroxissomo (Munns e Tester, 2008; Silveira et al., 2013).

2.1.4. Genes de resposta à salinidade

A aplicação de métodos da biologia molecular no estudo dos mecanismos de resistência das culturas à salinidade tem um papel importante na busca de variedades mais resistentes. Uma série de genes tem sido bem estudada há e sua superexpressão em plantas cultivadas poderia aumentar a resistência. Entretanto, a tolerância à salinidade não é um mecanismo simples e não existe um único gene capaz de conferir essa habilidade.

A tolerância aos diferentes tipos de estresse é mediada por fatores de transcrição (FTs), reguladores que controlam a expressão dos genes em resposta aos estresses. Um único FT pode controlar a expressão de muitos genes por intermédio de ligações específicas do FT ao elemento de ação cis nos respectivos genes, esse sistema regulatório de transcrição é chamado de regulon (Nakashima et al., 2009).

Dois genes principais são relacionados aos sistemas de antiporte Na^+/H^+ , que atuam na exclusão do Na^+ citosólico, os excessivamente sensíveis a sal (SOS) no plasmalema e o Na^+/H^+ antiporter (NHX) no tonoplasto, foram capazes de aumentar a tolerância ao estresse salino em plantas transgênicas (Mahajan e Tuteja, 2005; Silveira et al., 2016).

Os genes SOS codificam uma proteína de ligação relacionada à sinalização por Ca^{2+} em resposta ao estresse salino. Proteínas de calcerina tipo B (CBL) detectam o sinal de Ca^{2+} e participam da transdução do sinal que inicia as atividades da via SOS e seus genes relacionados. As proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) estão envolvidas na medição de cálcio e transduções de sinal em resposta a estresses abióticos em plantas (Ahanger et al., 2016).

Os eventos de sinalização nas plantas incluem o aumento do fluxo de Ca^{2+} no citosol, a ativação de proteínas quinases ativadas por mitogênos

(MAPKs) e a fosforilação de proteínas (Baxter et al., 2014). As MAPKs estão envolvidas em processos de biossíntese da parede celular, crescimento e diferenciação celular e na cascata de sinalização durante o estresse. A ativação induzida por percepção de estímulo de MAPK desencadeia fosforilação e ativação de FTs, de modo a obter uma resposta específica ao estresse salino (Ahanger et al., 2016).

O gene que codifica a proteína NHX1 foi inicialmente identificado em plantas de *Arabidopsis*. A proteína NHX1 está localizada no tonoplasto, ela realiza um transporte ativo secundário, utilizando a energia do gradiente eletroquímico gerado pelas H⁺-ATPases. Atua como antiporte Na⁺/H⁺ acoplando a exclusão do próton, a favor do gradiente de concentração, com a inclusão do Na⁺ no vacúolo, contra um gradiente eletroquímico (Mahajan e Tuteja 2005; Silveira et al., 2016).

O gene mutante de *Arabidopsis* AHA4 também é ativado em função do gradiente eletroquímico gerado pela H⁺-ATPases sob condição de estresse. A ATPase Vacuolar (V-ATPase) acidifica os compartimentos intracelulares e contribui para o gradiente eletroquímico H⁺ capaz de conduzir o transporte secundário de íons e metabólitos pelo tonoplasto (Ratajczak, 2000). O AHA4 controla o fluxo de Na⁺ através da endoderme, a mutação resultou em plantas com sensibilidade muito maior ao estresse salino (Vivart et al., 2001).

A tolerância ao estresse salino também foi relatada em plantas transgênicas de arroz com a superexpressão do gene bZIP71 que atua na modulação da via de resposta dependente de ABA. A família de bZIP consiste em proteínas com um domínio de ligação rico em resíduos de aminoácidos adjacente a domínios de fecho de leucina. Em *Arabidopsis* os FT bZIP se ligam aos elementos responsivos ao ABA (ABRE) e atuam como fatores de resposta ao ABA (Liu et al., 2014).

Algumas proteínas quinases relacionadas com serina/treoninas quinases (SnRK2) ativadas por ABA respondem a regiões de regulons bZip, elemento de ligação responsivo a ABA/FTs (AREB/ABF). São responsáveis por mediar a regulação da abertura estomática. Em *Arabidopsis*, nove dos 10 SnRK2 são ativados por hiperosmolaridade e cinco dos nove SnRK2 são ativados pelo ABA (Nakashima et al., 2009). A hipersensibilidade ao sal foi observada também em plantas jovens e germinação quando superexpressaram ABF (3 e 4), indicando a

possível participação dos mesmos em resposta à salinidade em estádios de desenvolvimento específicos (Wang et al., 2003).

Por sua vez, os regulons domínios NAC-(*no apical meristem* (NAM), *cupy-shaped cotyledon* (CUC)) respondem a desidratação e alta salinidade, pela ativação do gene responsivo à desidratação (ERD1) (Nakashima et al., 2009). NAC (NAM-CUC2) atuam na resposta à salinidade, conferindo maior tolerância ao estresse devido à regulação positiva de genes que codificam enzimas como a peroxidase, a ornitina amino transferase e Na^+/H^+ . Sua transcrição é aumentada na presença de ABA (Khan et al., 2013).

O ERD foi identificado como um elemento de ação cis da via independente de ABA, responsivo à seca e salinidade em *Arabidopsis*. Os elementos responsivos à desidratação (DREB), são componentes importantes de vias não dependentes de ABA indução da expressão a seca e salinidade. Em plantas de arroz a superexpressão de DREB1A resultou em melhora da tolerância ao estresse com alta salinidade (Yamaguchi-Shinozaki; Shinozaki, 2006; Nakashima et al., 2009).

2.2. Bioatividade das substâncias húmicas e mitigação do estresse salino

2.2.1. Conceito de substâncias húmicas

Plantas que crescem em solos com conteúdo elevado de matéria orgânica de qualidade são menos sujeitas aos diferentes tipos de estresse, são mais saudáveis e podem apresentar alto rendimento com produção de alimentos de qualidade superior (Pettit, 2007). O manejo do solo visando à conservação/aumento da matéria orgânica é a base e o princípio dos processos de produção agroecológicos (Altieri, 2002).

A maior parte da matéria orgânica do solo é constituída pelas substâncias húmicas (SH) que, operacionalmente, podem ser classificadas em ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) e huminas (Stevenson, 1994). O aumento relativo de AH foi proposto como indicador da qualidade da matéria orgânica do solo (Piccolo, 2012).

Evidências experimentais (Piccolo, 2001; 2002) demonstraram que a matéria orgânica humificada mais do que uma suposta natureza macropolimérica de massa molecular elevada deve ser considerada como uma associação

supramolecular não covalente e complexa de moléculas heterogêneas produzidas ou que sobreviveram à degradação microbiana das plantas e animais (Piccolo et al., 2018). Essas moléculas são mantidas juntas por forças dispersivas fracas, ligações de hidrogênio e ligações eletrostáticas intermoleculares mediadas por pontes metálicas.

Nesse contexto, o processo de humificação pode então ser descrito de acordo com Piccolo et al. (2018) como a segregação progressiva na solução do solo de compostos hidrofóbicos pouco solúveis derivados da transformação biótica e abiótica das biomoléculas liberadas de células. Esses componentes hidrofóbicos tais como compostos alquílicos e aromáticos são adsorvidos na superfície dos minerais (óxidos, oxihidróxidos de ferro e alumínio e silicatos de alumínio) por forças fracas de natureza dispersiva.

A afinidade mútua de compostos hidrofóbicos preexistentes no solo dirige a adsorção progressiva dos compostos de carbono recentemente adicionados no solo em múltiplas camadas de natureza hidrofóbica. Esse arranjo permite a estabilização de compostos lábeis de carbono no domínio hidrofóbico da matéria orgânica do solo previamente humificada (Spaccini et al., 2002).

A definição clássica de AH e AF foi então revista e, de acordo com Piccolo (2012), os AF devem ser considerados como associações de pequenas moléculas hidrofílicas que contêm uma densidade de grupos funcionais ácidos tão elevada que mantêm o arranjo solúvel em qualquer valor de pH. Já os AH foram considerados como associações de compostos predominantemente hidrofóbicos (cadeias polimetilênicas, ácidos graxos, fenóis, esteroides) estabilizados a pH neutro por forças dispersivas fracas (van der Waals, ligações $\pi \rightarrow \pi$, CH- π e pontes metálicas). A conformação cresce progressivamente de tamanho com a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares com a diminuição do pH até um valor no qual a estrutura floccula (Piccolo, 2012).

2.2.2. Bioatividade das substâncias húmicas

Em solos tropicais altamente intemperizados as SH assumem papel fundamental nos processos eletroquímicos, influenciando as principais propriedades incluindo agregação, mobilidade e transporte de nutrientes, capacidade de troca de cátions, poder tampão, capacidade de retenção de água e sequestro de carbono (Dobbss et al. 2008). O condicionamento das propriedades

do solo pode ser considerado como um efeito indireto das SH no crescimento das plantas, uma vez que modifica o seu ambiente de crescimento. Já o uso de SH solúvel diretamente sobre as plantas em baixas concentrações pode promover alterações na morfologia, fisiologia, bioquímica e na expressão de genes das plantas em um efeito denominado genericamente de bioatividade das SH (Canellas e Olivares, 2014).

A aplicação direta de SH para estimular o crescimento das plantas não é recente (Bottomley, 1917), mas o interesse tem crescido muito nos últimos anos por uma série de motivos diferentes, tais como o aumento do custo dos insumos químicos e a possibilidade de uso em processos de intensificação ecológica da produção. A separação dos efeitos das SH sobre as plantas em efeitos indiretos e diretos é arbitrária uma vez que, por exemplo, a aplicação de AH pode aumentar significativamente a rizodeposição (Canellas e Olivares, 2017) e a produção de exsudatos (Canellas et al., 2019) que, por sua vez, alteram o comportamento da rizosfera, modificando tanto o ambiente eletroquímico como o comportamento da biota.

Existe uma série de revisões bibliográficas compilando os efeitos das SH em diferentes plantas e discutindo seus diferentes mecanismos de ação (Vaughan e Malcolm, 1985; Nardi et al., 2002; Chen et al., 2004; Nardi et al., 2009; Trevisan et al., 2010; Zandonadi et al., 2013; Berbara e García, 2014; Canellas e Olivares, 2014; Rose et al 2014; Canellas et al., 2015; Nardi et al. 2016; Nardi et al., 2017; Roomi et al., 2018; Olaetxea et al., 2018). Brevemente, é possível resumir a consequência do estímulo húmico em aumento médio geral de cerca de 20% na massa seca da parte aérea e de raízes em diferentes plântulas tratadas com SH (Rose et al., 2014). Essa estimulação no crescimento foi atribuída à interferência no processo de absorção e assimilação de nutrientes, resultando na maior eficiência de uso de nutrientes, bem como na promoção do metabolismo primário (carbono e nitrogênio) e secundário das plantas (Nardi et al., 2017). O uso de concentrações muito baixas de SH na estimulação das plantas favorece a interpretação de que o principal mecanismo de ação das SH é uma possível ação de regulação do balanço hormonal das plantas seja modulando a produção dos hormônios ou emulando o efeito dos mesmos (Nardi et al., 2002).

As SH modificam, portanto, o balanço hormonal das plantas e podem apresentar efeito análogo ao dos fitormônios como giberelinas (GA), citocininas

(CK), etileno, ácido abicísico (ABA), brassinoesteroides, ácidos jasmônicos (JA), giberelinas e, principalmente, as auxinas (Nardi et al., 2016). As auxinas estão envolvidas na expansão celular, formação de raízes laterais e adventícias, indução de atividade de transportadores primários como a H⁺-ATPase de MP (Taiz e Zeiger 2002). As H⁺-ATPase de MP estão diretamente envolvidas na energização de transportadores secundários fundamentais para a absorção de macro e micronutrientes e no aumento da plasticidade da parede celular que possibilita o processo de crescimento e divisão celular (Hager, 2003).

Os AH podem aumentar a atividade das H⁺-ATPases de MP, bem como das ATPases e pirofosfatases de vacúolo, modulando o ambiente eletroquímico celular (Zandonadi et al., 2007). Esse efeito é tão marcante para o desenvolvimento celular que o bombeamento de prótons pode ser usado como marcador da bioatividade dos AH (Zandonadi et al., 2016).

2.2.3. SH e a redução dos danos causados pelo estresse salino

O uso de bioestimulantes à base de SH tem atraído a atenção especialmente pelo seu efeito de atenuação e mitigação dos efeitos de estresses bióticos e abióticos (du Jardim, 2015). O estresse pode ser definido como qualquer fator ou processo que interrompa a homeostase modificando o funcionamento normal das plantas (Shao et al., 2008). Alguns estudos têm demonstrado que as SH podem aumentar a resistência das plantas aos estresses abióticos (Berbara e García, 2014; García et al., 2012, 2014, 2016; Aguiar et al., 2016).

Esse efeito pode ser atribuído à capacidade das SH em alterar o metabolismo primário e secundário das plantas aumentando a concentração de metabólitos diretamente envolvidos no combate ao estresse, tais como prolina, compostos fenólicos e açúcares (Aguiar et al., 2018). Além disso, foi observado que o uso de SH afetou significativamente a expressão de genes que produzem enzimas e transportadores diretamente envolvidos na resposta contra estresses bióticos e abióticos (Trevisan et al, 2011; Jannin et al., 2012). Também já foi identificada a capacidade das SH de estimular a atividade de enzimas antioxidantes (Cordeiro et al., 2011), que têm um papel relevante no controle dos danos celulares provocados pelo acúmulo de radicais livres produzidos em reação

ao calor, frio, seca, salinidade, metais pesados, luz UV, ou seja, da maioria dos agentes de estresse abióticos em plantas.

García et al. (2012; 2014) sugeriram um papel ativo das SH na regulação da acumulação e no metabolismo de EROs e mostraram que a aplicação de SH isoladas de vermicomposto promoveu um aumento na concentração de H_2O_2 e O_2 em zonas específicas das raízes de arroz acompanhado do aumento da atividade das enzimas antioxidantes nessas mesmas zonas radiculares (García et al., 2016).

Também é muito conhecido a relação estreita entre as EROs e os fitormônios como, auxinas, NO e ABA. A modulação destes hormônios está envolvida na atenuação de danos de estresses abióticos em plantas promovidas pela aplicação de SH (Nardi et al., 2009). Mudanças nos níveis ou na atividade hormonal em plantas tratadas com SH foram observadas incluindo, ácido indol acético (AIA) (Trevisan et al., 2011 Canellas et al., 2011;) NO (Zandonadi et al., 2010; Mora et al., 2012, 2014a), etileno e ABA (Mora et al., 2012, 2014a), bem como citocininas na parte aérea (Mora et al., 2010, 2014b).

O ABA é o hormônio mais frequentemente associado a repostas das plantas aos diferentes tipos de estresses. Após a percepção do sinal do estresse, inicia-se uma cascata de sinalização conhecida como via dependente do ABA e posterior indução de genes de resposta ao estresse, tais como os elementos cis responsivos a ABA (ABRE). Outros hormônios também já foram relacionados à resposta ao estresse salino, entre eles, as giberelinas e as citocininas (Munns e Tester, 2008).

A emulação de efeitos do AIA, citocinina e GA e respectiva estimulação no crescimento vegetal com a aplicação de concentrações muito baixas de HS foi descrita por Musculo et al. (1993). As HS podem também alterar a distribuição dos hormônios entre as raízes e a parte aérea principalmente de GA e citocinina (Mora et al., 2010). A resposta ao estresse osmótico mediada pela sinalização por ABA induzida por AH foi demonstrada por Olaetxea et al. (2015), a redução da condutividade hidráulica das raízes promovida por concentrações muito baixas de AH foi dependente da via de sinalização por ABA, que também induziu a síntese e a atividade de canais transportadores de água. O aumento da parte aérea observado com o tratamento das plantas com AH foi diretamente relacionado com

o aumento encontrado no nível de ABA nas raízes, bem como com o aumento na condutividade hidráulica das raízes.

A redução do crescimento das folhas é um dos primeiros sintomas da salinidade e está relacionada com processos de inibição da fotossíntese. A promoção da eficiência fotossintética em condições de salinidade nas plantas foi previamente relacionada com a manutenção da abertura estomática e com reparações nos danos causados pela toxicidade de íons nos cloroplastos (Munns e Tester, 2008). O aumento na taxa líquida de fotossíntese e da condutância estomática em plantas tratadas com AH foi relatado em milho (Canellas et al., 2015); cana-de-açúcar (Aguiar et al., 2016) e feijão preto (da Piedade Melo et al., 2017).

Alguns trabalhos relacionaram o aumento no conteúdo de clorofila com a concentração de AH utilizada (Ertani et al., 2011; Fun et al., 2014; Bettoni et al., 2016). Porém, particularmente nos relatos de Canellas et al. (2015), Aguiar et al., (2016) e da Piedade Melo et al., (2017) não foram observadas mudanças significativas no conteúdo de pigmentos fotossintéticos avaliados indiretamente pela medida da unidade SPAD. Russel et al. (2006), demonstraram um mecanismo de regulação de abertura estomática induzido por AH de modo similar ao acionado por AIA. A máxima abertura estomática em resposta aos AH foi semelhante à encontrada por AIA e, em ambos os casos, envolvendo a ativação do mecanismo relacionado com a fosfolipase A2. Além disso, é importante ressaltar o aumento da atividade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) em plantas tratadas com AH em condições de salinidade (Estringü et al., 2016). A promoção da atividade da Rubisco por AH foi previamente observada por Ertani et al. (2011), que também verificaram aumento no conteúdo de clorofila, glicose e frutose sugerindo um papel positivo dos AH sobre os processos fotossintéticos.

As EROS, tais como, H_2O_2 , O_2^- e OH^- atacam lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em peroxidação de lipídios, desnaturação proteica e mutações no DNA, respectivamente (Yu e Rengel, 1999). Durante o estresse salino ocorre a produção e acúmulo de EROS em organelas como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Enzimas antioxidantes são sintetizadas SOD, CAT, GPX e utilizadas para minimizar a concentração de EROS (Zakikhani et al., 2012).

O efeito das HS sobre a indução da atividade da catalase foi mostrada por Cordeiro et al. (2011). Durante a recuperação do estresse hídrico Aguiar et al. (2016) mostraram a atividade aumentada de SOD, CAT e APX em plantas tratadas com HA. A regulação osmótica também pode ser atingida pelo aumento da concentração de solutos orgânicos compatíveis, tais como, aminoácidos (prolina, glicina betaína), açúcares (trehalose, melobiolose), compostos aromáticos, entre outros que atuaram como tampão redox auxiliando na mitigação do efeito das EROS. Por exemplo, o ascorbato atua como osmoprotetor, funcionando como um sumidouro da radical hidroxila e como tampão redox, assumindo um papel importante na proteção da fotossíntese em *Arabidopsis* submetida ao estresse salino (Huang et al. 2005). Os níveis de ácido ascórbico e intermediários precursores da vitamina C em plântulas de cana-de-açúcar tratadas com AH isolados de vermicomposto foram significativamente elevados em relação ao controle (Aguiar et al., 2018).

O aumento na absorção de macro e micronutriente é o efeito das SH nas plantas mais frequentemente reportado em condições de salinidade. De acordo com Nardi et al. (2009), o efeito das HS na nutrição das plantas é, também, resultado da influência dessas substâncias na síntese e na funcionalidade de proteínas transmembranares, especialmente sobre as bombas de prótons da membrana plasmática, que constroem o gradiente eletroquímico transmembranar, modulando o transporte primário de íons e gerando energia para os transportadores secundários. O gradiente gerado energiza, portanto, o transporte ativo secundário realizado pelos carreadores via simporte ou antiporte.

As primeiras evidências da estimulação das bombas de prótons por SH foram providenciadas por Maggioni et al., (1987), Nardi et al. (1991), Pinton et al., (1992), Varanini et al. (1993) e Pinton et al. (1997). Canellas et al. (2002) demonstraram que o aumento da atividade da H⁺-ATPase de MP foi associada à indução da sua síntese mediada por HÁ, o que mais tarde foi confirmado por Quaggiotti et al. (2004).

Ramos et al. (2015) observaram que o estímulo nas bombas de prótons membranares responsáveis pelo efluxo de H⁺ foi acompanhado, na mesma zona de crescimento radicular, pelo influxo de Ca²⁺. O aumento de Ca²⁺ (mensageiro secundário) no citoplasma sinaliza a ativação de fosforilação mediada pela proteína quinase dependente de cálcio (CDPK), que por sua vez, teve atividade

aumentada pelos AH, assim como dos canais carreadores de Ca^{2+} dependentes de voltagem (OsCPK7 e OsCPK17). O trabalho de Ramos e colaboradores (2015) é uma evidência sólida do envolvimento de AH na sinalização celular, uma vez que o pulso citosólico de cálcio $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{citosólico}}$ foi previamente relacionado à resposta a vários tipos de estresse incluindo a salinidade. Além disso, o antiporter H^+/Na^+ é ativado em resposta ao acúmulo de Na^+ , bem como o balanço de K^+/Na^+ como mostrado por Bacilio et al. (2016). A indução da expressão dos canais de transporte não específicos de K^+ por AH foi mostrado por Khaleda et al. (2017), evidenciando o papel dos AH no mecanismo de detoxificação de Na^+ .

Os trabalhos publicados e indexados na base *Web of Science* (2000-2018), relacionando o controle de danos da salinidade pelas SH (Tabela 1), relacionaram o acúmulo de biomassa e biodisponibilidade de nutrientes; aumento na germinação de sementes; indução e aumento da atividade de enzimas antioxidantes; acúmulo de solutos compatíveis; no aumento do teor de clorofila; aumento na taxa fotossintética; uso eficiente de água e alteração das relações de K^+/Na^+ (Demir, et al., 1999; Khaled e Fawy, 2011; Osman e Raddy, 2012; Jarosova et al., 2014; Feleafel e Mirdad, 2014; Rady et al., 2016; Esringü et al., 2016; Dinler, Gunduzer, e Tekinay, 2016; Matuszak-Slamani et al., 2017; Bacilio et al., 2016; 2017; Hemida et al., 2017; Merwad, 2017; Akladious e Mohamed, 2018; Yildiztekin, Tuna, e Kaya, 2018; Benazzouk, Djazouli, e Lutts, 2018, Taha e Osman, 2018, Kaya et al., 2018; Desoky, Merwad, e Rady, 2018).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção do vermicomposto

Os ácidos do tipo húmicos foram isolados do vermicomposto produzido com torta de filtro da usina Coagro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (RJ). A torta foi colocada em cilindros de concreto com capacidade para 150 L e a umidade foi mantida entre 60-70% com adição de água semanalmente, seguida de mistura do composto. Depois de aproximadamente um mês, foram introduzidas as minhocas (*Eisenia foetida*) na proporção de 5 kg por m³ de resíduo. Ao final do processo de vermicompostagem (4 meses) as minhocas foram retiradas e o composto foi armazenado em recipientes.

3.2. Extração e isolamento dos ácidos do tipo húmico

Os AH foram extraídos com NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 4 horas, seguido da separação por centrifugação (15 min, 5 000 g). Após a separação os AH foram isolados mediante a floculação do extrato alcalino realizada com o abaixamento do pH até 2,0 com a adição de HCl 6 mol L⁻¹. Os AH precipitados foram então separados por centrifugação (15 min, 5000 g) e lavados com água destilada. Após a adição da água o sistema foi agitado manualmente de forma vigorosa e submetido à centrifugação (5 mim, 5000 g). O procedimento de lavagem foi repetido várias vezes até teste negativo para a presença de cloreto realizado com nitrato de prata. Após o procedimento de lavagem os AH foram titulados até pH

7,0 com KOH 0,01 mol L⁻¹. A seguir os AH foram colocados em membranas de diálise com tamanho de exclusão de 1000 Da e submetidos à diálise contra água destilada até o equilíbrio da condutividade elétrica (CE) do sistema, o que durou aproximadamente uma semana. Após a diálise os AH foram congelados e secos por liofilização e analisados.

3.3. Análise dos AH

Foi realizada a análise da quantidade de carbono e nitrogênio presente nos AH com auxílio de um analisador elementar EuroVector modo dual (C-N) que utiliza o método de combustão seca. A natureza química dos AH foi acessada utilizando a técnica de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear com Polarização Cruzada e Rotação no Ângulo Mágico (CP-MAS ¹³C NMR). O espectro foi obtido no equipamento Bruker-400 equipado com sonda para amostras sólidas nas seguintes condições experimentais: sequência de pulsos utilizada: CP/MAS; frequência de observação: 75,4 MHz para o ¹³C; largura espectral de 50 kHz; tempo de aquisição 50 ms; pulso de 5 ms (90 °); intervalo entre pulsos: de 4 s; tempo de contato de 1 ms; núcleo desacoplado na aquisição: ¹H; modo desacoplador: “gated”; e número de transientes: 10.000. As áreas dos sinais de RMN foram integradas utilizando-se o software do espectrômetro Bruker (Topspin) e hexametilbenzeno (HMB) (δmetilas = 17,3 ppm) como referência secundária. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e os espectros integrados nas seguintes regiões: C alquílico (0–50 ppm), C mono ou dioxigenado ou C de peptídeos (50–110 ppm), C aromáticos e olefinas (110–150 ppm), C aromático substituído por heteroátomo (150–165 ppm) e C em grupamentos carboxílicos, cetonas, amidas ou éteres (165–200 ppm).

3.4. Ensaio com plântulas

Foi realizado um experimento em casa de vegetação no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes/RJ. Neste experimento foram utilizadas plântulas de milho (*Zea mays* L.vr. DKB 7815). As sementes foram previamente desinfetadas por 5 minutos com solução de NaClO 0,5% (v/v), lavadas até remoção completa do NaClO e germinadas em substrato areia/vermiculita 2:1. Após 12 dias da emergência (DAE) foi realizado o desbaste permanecendo duas plântulas de tamanho

homogêneo por vaso. As plântulas foram então tratadas ou não (controle) durante 5 dias com uma suspensão de AH na concentração de 3,5 mM C a pH 5,7 ou uma solução de cloreto de sódio (NaCl) na concentração de 60 mM, sendo o pH também ajustado a 5,8 com HCl e NaOH diluídos. Tanto a suspensão de AH como a solução de NaCl foram preparadas utilizando-se a solução nutritiva de Furlani com 25% da força iônica total (Furlani ¼ I). Foram adicionados 150mL da suspensão de AH 150 mL da solução de NaCl e 150 mL da solução nutritiva por dia. Após 5 dias uma parte das plântulas foi colhida para análise e outra parte foi novamente submetida aos tratamentos por 72 h. O controle (solução nutritiva de Furlani ¼ I) foi submetido ou não ao tratamento com AH ou NaCl; as plântulas previamente tratadas com AH foram submetidas ou não à solução de NaCl; as plântulas previamente submetidas ao estresse salino (NaCl 60 mM) foram tratadas ou não com AH. Uma representação esquemática do desenho experimental pode ser observada na Figura 2. Na segunda semana de experimento a força I da solução nutritiva foi aumentada (½ I).

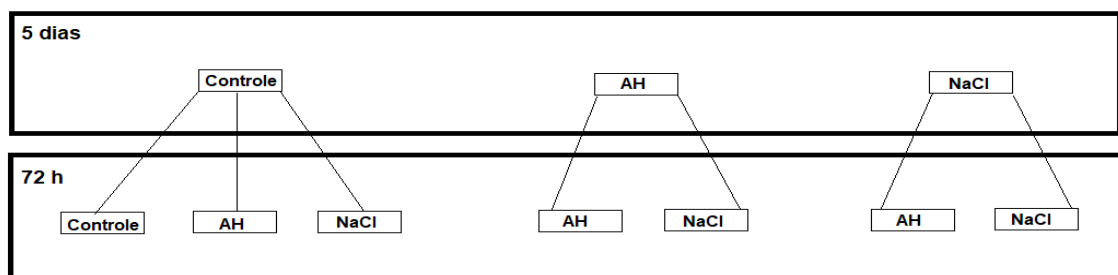


Figura 2. Esquema experimental utilizado para avaliação do efeito AH na mitigação dos efeitos do estresse salino em plântulas de milho. Os tratamentos foram conduzidos em triplicata e os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente.

A solução nutritiva de Furlani é composta pelos seguintes nutrientes (mg/litro): Ca = 151; K = 141; Mg = 17; Cl = 33; S = 54; Fe = 3,6; Mn = 0,5; B = 0,3; Zn = 0,13; Cu = 0,04; Mo = 0,08, na forma destes sais: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4 , KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. O ferro foi adicionado na forma de Fe-EDTA, preparado com Na-EDTA e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O pH das soluções foi ajustado para $5,7 \pm 0,2$ com NaOH ou HCl diluídos.

A condutividade elétrica e o pH das soluções de crescimento foram monitorados diariamente por meio de condutivímetro (CE dS m⁻¹) e potenciômetro equipado com eletrodo combinado de vidro e calomelano.

3.5. Análises das plântulas

3.5.1. Biomassa

A massa fresca de raiz e parte aérea (folhas e caule) foram obtidas pela pesagem em balança analítica *HR-202i AeD Instruments UK*. A massa seca de raiz e da parte aérea (folhas e caule) foram obtidas após secagem do material vegetal em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 70°C até a massa seca atingir estabilidade e posterior determinação em balança analítica.

3.5.2. Determinação de Ca, K, Mg, Na, S e P na parte aérea

A digestão do material vegetal foi realizada a partir de 0,400 g (peso seco) de amostra triturada. As amostras foram colocadas em tubos de teflon (X-press), nos quais foram adicionados 8 mL de ácido nítrico concentrado (HNO₃) e 4 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) concentrado. Os extratos foram mantidos em repouso *overnight* em temperatura ambiente e em seguida, levados ao Microondas, modelo *Mars X-press* (CEM), por 40 minutos (15min -Ramp e 25min -Hold) à temperatura de 175 °C e potência de 1600W, seguindo o método 3052 da *Environmental Protection Agency*. Após o resfriamento (30 min), o extrato final foi filtrado em papel Whatman n. 40 e aferido a um volume final de 30 ml com HNO₃ 0,5 N em balão volumétrico. A determinação de Ca, K, Mg, Na, S e P foi realizada por espectrometria de emissão atômica com plasma no equipamento *Optical Emission Spectrometer 720ES Varian®; EUA*. A digestão e análise foram realizadas em triplicata.

3.5.3. Atividade da catalase (EC 1.11.1.6)

O material vegetal fresco foi macerado em N₂ líquido em gral de porcelana. Após a obtenção de um pó fino, foi acrescentado tampão de extração em aproximadamente 0,200g de material vegetal. O tampão foi composto de fosfato de potássio (100 mM), EDTA (1 mM), Ditioneitol (3 mM; DTT) e

Polivinilpolipirrolidona (PVPP) (4%) com pH ajustado para 7,5. O homogenato foi centrifugado a $6.800 \times g$ por 25 min a 4°C . O sobrenadante foi recolhido e parte do extrato foi conservado a -80°C . A atividade da CAT foi determinada como descrita por Kraus et al. (1995). O ensaio foi realizado a 25°C em meio de reação contendo $1950 \mu\text{L}$ de tampão de determinação (100 mM, pH 7,5), $150 \mu\text{L}$ de tampão de extração e $750 \mu\text{L}$ H_2O_2 (50 mM) preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada com a adição de $150 \mu\text{L}$ do extrato enzimático, a atividade avaliada pela degradação do H_2O_2 e estimada pela diminuição da absorbância em 240 nm no espectrofotômetro *Shimadzu UV Mini 1240 Uv-vis* durante três min em comparação com a prova em branco sem adição de amostra. Os resultados foram apresentados em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g ptn}^{-1}$. A quantidade de proteínas foi determinada nos extratos pelo método de Bradford, (1976), o volume foi adaptado para leitura no espectrofotômetro *Hidex Chameleon Multi Label detection* Platform com absorbância de 595 nm pelo programa MikroWin 2000.

3.5.4. Análise estatística

Os experimentos em casa de vegetação foram padronizados e analisados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados coletados durante o experimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelos programas GraphPad Prism 6.07, e Action Stat. O teste de variáveis múltiplas, Fisher (LSD; $P > 0,05$) foi usado para comparar as diferenças entre as médias.

RESULTADOS

4.1. Caracterização dos AH

Os AH isolados do vermicomposto produzidos com a torta de filtro de cana-de-açúcar apresentaram baixo conteúdo de carbono (460 g C kg^{-1}) e conteúdo elevado de nitrogênio (57 g N Kg^{-1}) em comparação com AH isolados de fontes pedogênicas (Rice e MacCarthy, 1991). A natureza química dos AH foi analisada por ressonância magnética nuclear no estado sólido e o espectro pode ser observado na Figura 3.

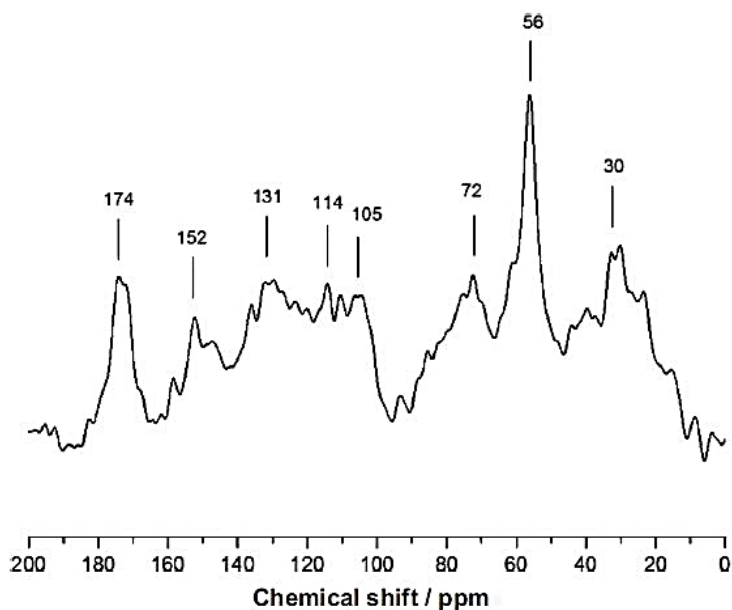


Figura 3. Espectro CP-MAS ^{13}C RMN dos AH utilizados nesse estudo.

O espectro apresentou um sinal intenso em 30 ppm típico de deslocamento químico de grupos CH₃ e CH₂ em longas cadeias alquílicas. O sinal mais intenso do espectro apareceu em 56 ppm e pode ser atribuído à presença de grupos metoxílicos derivados de estruturas lignínicas. O deslocamento químico em 72 ppm é típico de grupos O-C alquílicos em SH. Os sinais alargados com centro em 120 e 152 ppm são devidos à presença de C aromático não substituído ou substituído, respectivamente. Finalmente, o sinal intenso em 174 ppm pode ser atribuído à presença de grupos COOH. As atribuições foram baseadas nos trabalhos de Spacinnii e Piccolo (2009) e a característica química geral dos AH isolados do vermicomposto é típica de material húmico de bioatividade elevada (Canellas et al., 2012; Aguiar et al., 2013).

4.2. Produção de massa fresca

A massa fresca da parte aérea e das raízes das plântulas de milho é mostrada nas Figuras 4A e 5A. Foi possível observar um aumento significativo (LSD; $P < 0,05$) na massa fresca da parte aérea nas plântulas submetidas ao tratamento com AH em relação ao controle. A pré-exposição à salinidade moderada (NaCl 60 mM) também resultou em aumento significativo (LSD; $P < 0,05$) na massa fresca da parte aérea em relação ao controle. No entanto, esse aumento foi menor (cerca de 16%) do que o observado no tratamento com AH em comparação com o controle. As plântulas no tratamento controle que foram posteriormente submetidas ao tratamento adicional por 72 h com AH e NaCl não aumentaram a massa fresca da parte aérea (Fig. 4 B) em comparação com o controle. Todavia, foi possível observar que as plântulas pré-tratadas com AH que receberam, posteriormente, a solução de NaCl apresentaram um aumento significativo (LSD; $P < 0,05$) na massa fresca da parte aérea de cerca de 48% comparado ao seu controle (AH) (Fig. 4 C). Já a contínua exposição ao estresse salino reduziu em 18% a massa fresca da parte aérea (Fig. 4 D), indicando a efetividade do tratamento.

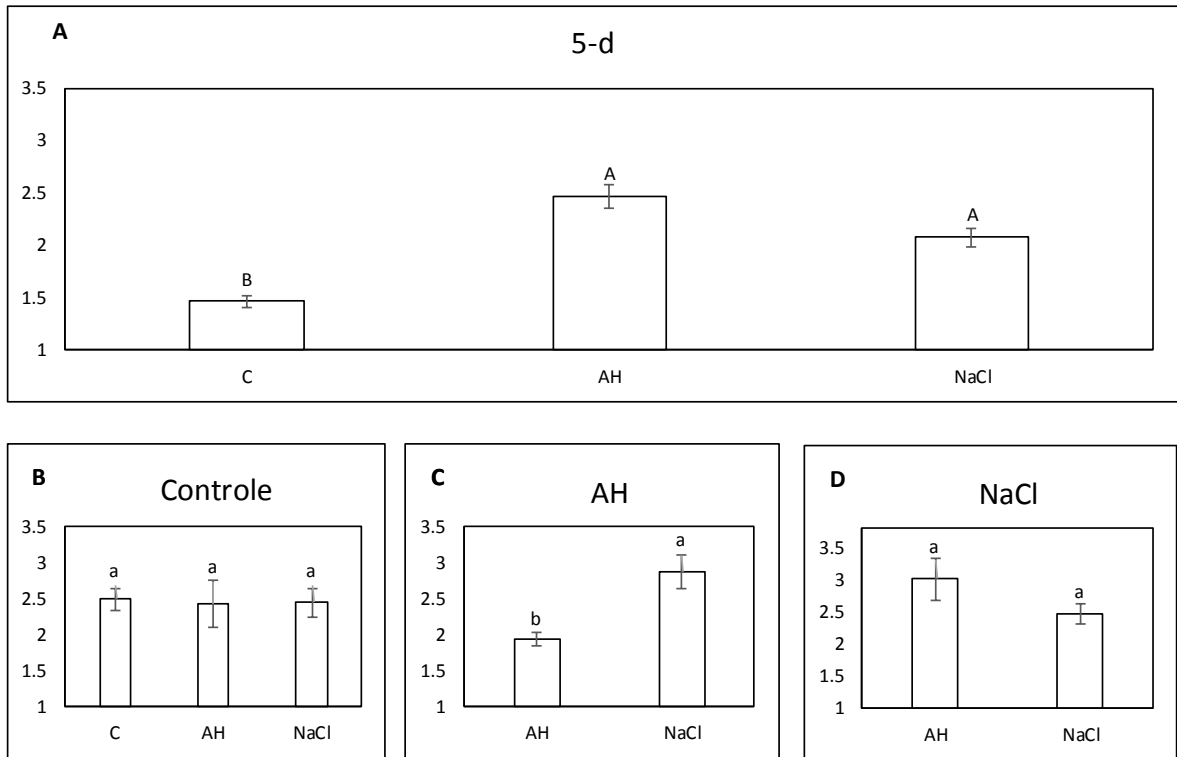


Figura 4. A: Massa fresca (g) da parte aérea de plântulas de milho 12 dias após a emergência previamente tratadas ou não (Controle) durante 5 dias com ácidos do tipo húmicos (AH, 3,5 mM C) ou cloreto de sódio (NaCl 60 mM). Após 5 dias as plântulas foram novamente submetidas aos tratamentos por 72 h. B: controle, sem tratamento prévio; C: Plântulas previamente tratadas com AH; D: plântulas previamente submetidas ao estresse com solução de NaCl. As barras representam o desvio padrão (SD) entorno da média e as letras diferentes representam diferença significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).

O efeito do pré-tratamento ou não (controle) com AH e NaCl sobre a massa fresca de raízes das plântulas de milho pode ser observado na Figura 5A. O pré-tratamento com AH proporcionou um aumento significativo (LSD; $P < 0,05$) na massa fresca das raízes de cerca de 40% em relação às plântulas controle. A pré-exposição à salinidade (NaCl) resultou em um aumento de 28% na massa fresca das raízes (Figura 5 A). Porém, esse aumento não foi significativo. As plântulas controle que foram posteriormente expostas por 72 h à solução de NaCl apresentaram redução da massa fresca de raízes de cerca de 14% (Figura 5 B). No pré-tratamento com AH (Figura 5 C) foi observado que a adição da solução de NaCl produziu uma redução significativa (LSD; $P < 0,05$) de cerca de 38% na massa fresca de raízes. Não foi observado efeito da exposição contínua à

salinidade moderada sobre a massa fresca das raízes (Figura 5 D). Os dados de massa seca se encontram no apêndice, figura 8 e 9.

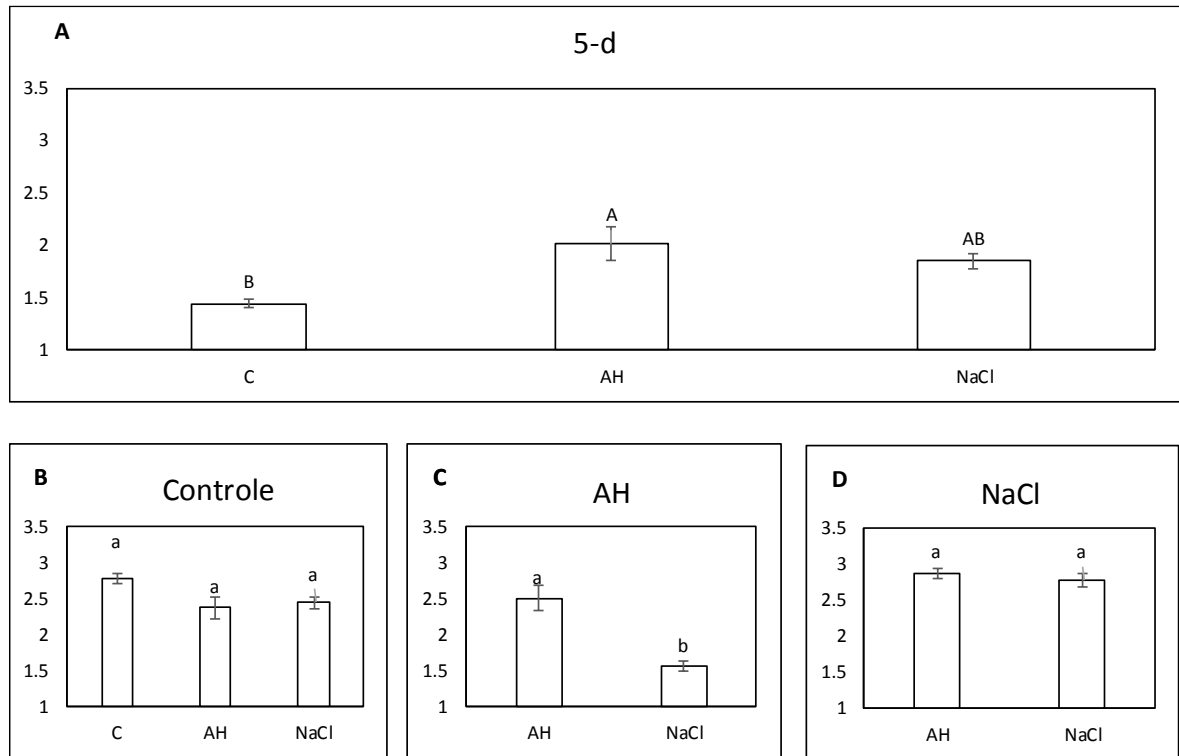


Figura 5. A: Massa fresca (g) das raízes de plântulas de milho aos 12 dias após a emergência previamente tratadas ou não (Controle) durante 5 dias com ácidos do tipo húmicos (AH, 3,5 mM C) ou cloreto de sódio (NaCl 60 mM). Após 5 dias as plântulas foram novamente submetidas aos tratamentos por 72 h. **B:** controle, sem tratamento prévio; **C:** plântulas previamente tratadas com AH; **D:** plântulas previamente submetidas ao estresse com solução de NaCl. As barras representam o desvio padrão (SD) entorno da média e as letras diferentes representam diferença significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).

4.3. Teor de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} totais na massa fresca da parte aérea

O teor de sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) totais (mg g^{-1}), assim como as relações K^+/Na^+ , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ da parte aérea das plântulas de milho pré-tratadas ou não (controle) com AH ou NaCl é mostrado na Tabela 2. Foi possível, como esperado, observar o aumento significativo (LSD; $P < 0,05$) no teor de Na^+ nas plântulas previamente expostas à solução de NaCl superior a 900% em relação ao controle. As plântulas do tratamento controle que foram submetidas à solução de NaCl por 72 h também apresentaram acúmulo de Na^+ nas folhas, ou seja, teor 594% maior em

comparação com o controle. Após o pré-tratamento com AH seguido da exposição da solução de NaCl o teor de Na⁺ foi 512% maior comparado ao controle. No pré-tratamento com NaCl não foram observadas diferenças significativas (Tabela 2).

O teor de K⁺ nas plântulas não apresentou variação ou diferença significativa na primeira fase do experimento (Tabela 2). As plântulas controle que foram posteriormente expostas por 72 h à solução de NaCl apresentaram um aumento significativo (LSD; $P < 0.05$) no teor de K⁺ de 34% a 44% maior que o AH e controle, respectivamente. No pré-tratamento com AH, no qual foi adicionado posteriormente a solução de NaCl, o teor de K⁺ foi 58% superior (LSD; $P < 0.05$). O pré-tratamento com NaCl quando submetido à suspensão de AH também apresentou um aumento significativo no teor de K⁺, porém, de 19% em relação ao controle.

Tabela 2. Teor de (mg.g^{-1}) sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) totais e relação K⁺/Na⁺ na massa fresca da parte aérea de plântulas de milho aos 12 dias após a emergência previamente tratadas ou não (controle) durante 5 dias com ácidos do tipo húmicos (AH concentração de 3,5 mM C) ou cloreto de sódio (NaCl 60 mM). Após cinco dias de tratamento as plântulas foram novamente submetidas aos tratamentos por 72 h de acordo com o esquema experimental mostrado no material e métodos (Figura 2). O teor foi apresentado em médias seguidas pelo desvio padrão (SD) entorno da média e as letras diferentes representam diferença significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$)

| Trat. | Na ⁺ | K ⁺ | K ⁺ /Na ⁺ |
|---------------------------|--------------------|----------------|---------------------------------|
| | mg.g ⁻¹ | | |
| 5d | | | |
| Controle | 1.18 ± 0.06 b | 18.05 ± 0.17 a | 14.73 ± 0.28 b |
| AH | 0.88 ± 0.03 b | 17.63 ± 0.55 a | 19.65 ± 0.37 a |
| NaCl | 10.89 ± 0.17 a | 18.36 ± 0.63 a | 1.70 ± 0.01 c |
| 5d + 72hs Controle | | | |
| Controle | 0.87 ± 0.03 b | 13.53 ± 0.43 b | 14.41 ± 0.34 b |
| AH | 0.87 ± 0.15 b | 14.54 ± 0.26 b | 21.27 ± 0.36 a |
| NaCl | 5.17 ± 0.22 a | 19.53 ± 0.62 a | 4.11 ± 0.01 c |
| 5d + 72hs AH | | | |
| AH | 1.02 ± 0.08 b | 14.08 ± 0.16 b | 3.95 ± 0.04 a |
| NaCl | 5.23 ± 0.17 a | 22.34 ± 0.49 a | 1.74 ± 0.02 b |
| 5d + 72hs NaCl | | | |
| AH | 9.29 ± 0.17 a | 17.00 ± 0.36 a | 1.74 ± 0.02 a |
| NaCl | 9.85 ± 0.21 a | 14.24 ± 0.31 b | 1.46 ± 0.02 b |

Em todos os tratamentos com AH foram observados aumentos significativos na relação K^+/Na^+ (Tabela 2). Na primeira fase do experimento após cinco dias de tratamento, foi verificado o aumento da relação K^+/Na^+ de 11 vezes nas plantas tratadas com AH em comparação com as plantas submetidas à solução de NaCl e 33% maior que no controle. A relação K^+/Na^+ também aumentou na segunda fase do experimento nos tratamentos com AH. As plântulas controle que foram expostas à suspensão de AH apresentaram um aumento de 47% na relação K^+/Na^+ comparado com o controle e cinco vezes maior quando comparada com as plântulas submetidas à salinidade. Plântulas pré-tratadas com HA e submetidas ao estresse salino apresentaram uma relação K^+/Na^+ sete vezes maior que as plântulas controle (NaCl). Já as plântulas pré-tratadas com NaCl apresentaram relação K^+/Na^+ 17% maior quando submetidas à suspensão de AH por 72 h.

Foi possível observar o aumento significativo no teor de Ca^{2+} nas plântulas tratadas com AH na primeira fase do experimento. Esse aumento foi 27% maior em comparação com o valor encontrado nas plântulas submetidas à salinidade (Tabela 3). Na primeira fase do experimento não foram encontradas mudanças significativas no teor de Mg^{2+} . As plântulas no tratamento controle que foram posteriormente expostas por 72 h à solução de NaCl apresentaram aumento significativo (LSD; $P < 0.05$) de 7,5% no teor de Mg^{2+} . Não foi observada diferença significativa nos pré-tratamentos com AH com ou sem adição de NaCl (LSD; $P < 0,05$). No pré-tratamento com NaCl e depois submetido por 72 h à suspensão de AH foi observado um pequeno (3%), porém significativo aumento no teor de Mg^{2+} em comparação com o controle (Tabela 3).

Os pré-tratamentos apresentaram diferença significativa entre si (LSD; $P < 0.05$) nas relações Ca^{2+}/Na^+ , Na^+/Ca^{2+} e Mg^{2+} . O tratamento das plântulas com AH resultou em aumento na relação Ca^{2+}/Na^+ 34% superior ao controle e 15 vezes ao tratamento com NaCl. As plântulas no controle posteriormente expostas por 72h à suspensão de AH apresentaram uma relação de Ca^{2+}/Na^+ semelhante às plântulas não tratadas (controle) enquanto a adição de NaCl reduziu essa relação em no mínimo 6 vezes. No tratamento com AH posteriormente submetidos à solução de NaCl por 72h, a relação Ca^{2+}/Na^+ foi 5 vezes menor. No pré-tratamento com NaCl submetido à suspensão de AH ou não por 72 h não foi encontrada nenhuma variação.

Tabela 3. Teor de (mg.g^{-1}) cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) totais, relação $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ e relação $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ da parte aérea de plântulas de milho 12 dias após a emergência previamente tratadas ou não (controle) durante 5 dias com ácidos do tipo húmicos (AH concentração de 3,5 mM C) ou cloreto de sódio (NaCl 60 mM). Após 5 dias nos pré-tratamentos as plântulas foram novamente submetidas aos tratamentos por 72 h. O controle, sem tratamento prévio; Plântulas previamente tratadas com AH; Plântulas previamente induzidas ao estresse com solução de NaCl. Teor apresentado em médias seguidas pelo desvio padrão (SD) entorno da média e as letras diferentes representam diferença significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$)

| Trat. | Na^+ | Ca^{2+} | $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ | Mg^{2+} | $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ |
|---------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|---|
| | mg.g^{-1} | | | | |
| 5d | | | | | |
| Controle | 1.18 ± 0.06 b | 1.76 ± 0.04 ab | 1.49 ± 0.11 b | 2.13 ± 0.09 a | 0.305 ± 0.02 b |
| AH | 0.88 ± 0.03 b | 2.01 ± 0.06 a | 2.28 ± 0.11 a | 2.33 ± 0.15 a | 0.203 ± 0.00 c |
| NaCl | 10.89 ± 0.17 a | 1.58 ± 0.05 b | 0.15 ± 0.00 c | 2.17 ± 0.03 a | 2.904 ± 0.00 a |
| 5d + 72hs Controle | | | | | |
| Controle | 0.87 ± 0.03 b | 2.28 ± 0.04 a | 2.60 ± 0.11 a | 2.39 ± 0.00 ab | 0.187 ± 0.00 b |
| AH | 0.87 ± 0.15 b | 2.203 ± 0.07 a | 2.99 ± 0.14 a | 2.26 ± 0.00 b | 0.196 ± 0.03 b |
| NaCl | 5.17 ± 0.22 a | 2.11 ± 0.07 a | 0.42 ± 0.00 b | 2.43 ± 0.05 a | 1.122 ± 0.04 a |
| 5d + 72hs AH | | | | | |
| AH | 1.02 ± 0.08 b | 2.23 ± 0.08 a | 2.12 ± 0.00 a | 2.40 ± 0.04 a | 0.222 ± 0.01 b |
| NaCl | 5.23 ± 0.17 a | 2.19 ± 0.02 a | 0.40 ± 0.06 b | 2.51 ± 0.02 a | 1.113 ± 0.04 a |
| 5d + 72hs NaCl | | | | | |
| AH | 9.29 ± 0.17 a | 1.45 ± 0.01 a | 0.14 ± 0.00 a | 2.37 ± 0.00 b | 2.656 ± 0.07 a |
| NaCl | 9.85 ± 0.21 a | 1.40 ± 0.01 a | 0.15 ± 0.00 a | 2.30 ± 0.01 a | 2.427 ± 0.04 a |

4.4. Atividade da catalase (EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase na parte aérea e raízes das plântulas de milho pré-tratadas ou não pode ser observada nas Figuras 6A e 7A. Não houve diferença significativa (LSD; $P < 0.05$) na atividade da enzima tanto na parte aérea como nas raízes aos cinco dias de tratamento. Na segunda fase do experimento foi observado aumento na atividade da catalase nas plântulas tratadas com AH em relação ao controle. Curiosamente as plântulas controle posteriormente expostas à salinidade apresentaram uma redução significativa na atividade da catalase em comparação tanto com o controle como nas plântulas tratadas com AH (Figura 6 B). A adição da solução salina nas plântulas tratadas com AH não alterou a atividade da catalase (Figura 6 C). No entanto, a adição da suspensão

de AH nas plântulas submetidas continuamente ao estresse salino resultou em aumento na atividade da catalase comparada com o controle (Figura 6 D).

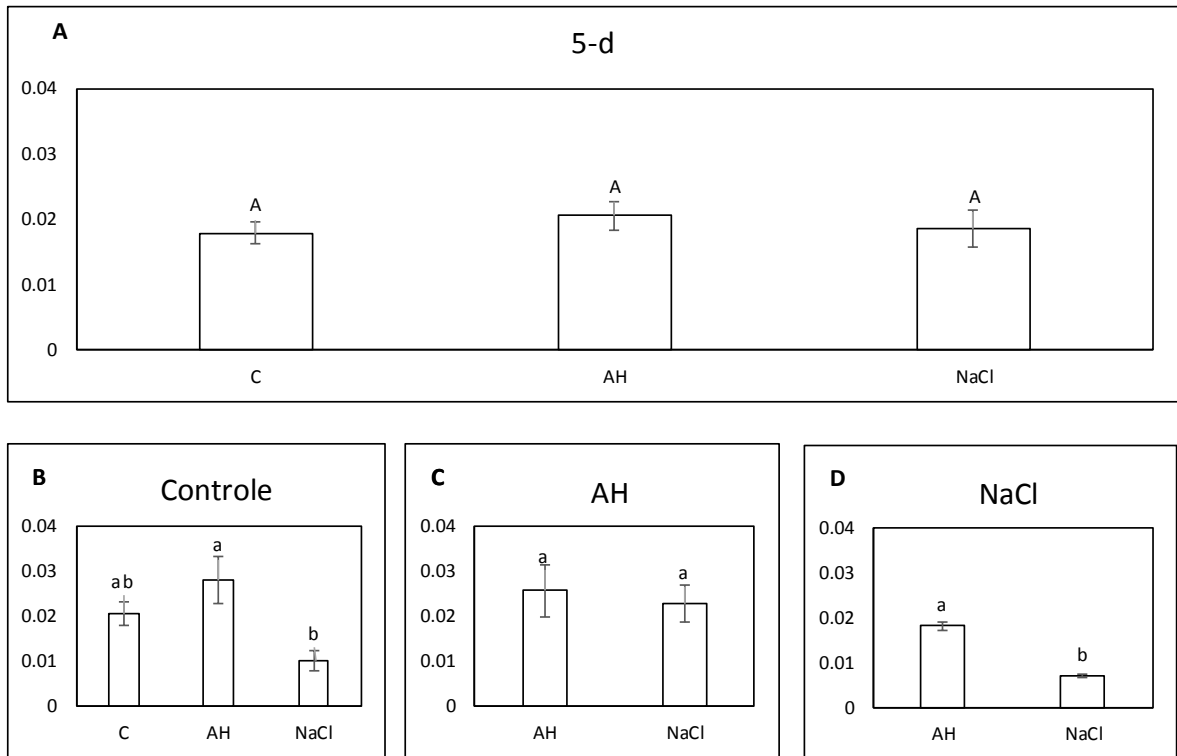


Figura 6. A: Atividade total da catalase (EC 1.11.1.6) em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g ptn}^{-1}$ da parte aérea de plântulas de milho 12 dias após a emergência previamente tratadas ou não (Control) durante 5 dias com ácidos húmicos (HA 3,5 mM C) ou Cloreto de Sódio (NaCl 60 mM). Após 5 dias as plântulas foram novamente submetidas aos tratamentos por 72 h. B: controle, sem tratamento prévio; C: Plântulas previamente tratadas com HA; D: plântulas previamente induzidas ao estresse com solução de NaCl. As barras representam o desvio padrão (SD) entorno da média e as letras diferentes representam diferença significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).

A atividade da catalase no extrato obtido das raízes de plântulas controle posteriormente tratadas com AH e com NaCl foi menor em comparação com o controle, porém as diferenças não foram consideradas significativas pelo teste de médias empregado. Nas plântulas continuamente expostas à salinidade e submetidas à suspensão de AH por 72 h apresentaram um aumento na atividade da catalase em relação ao controle (NaCl) de cerca de 100%, porém, novamente, este aumento não foi significativo (LSD, $P < 0,05$).

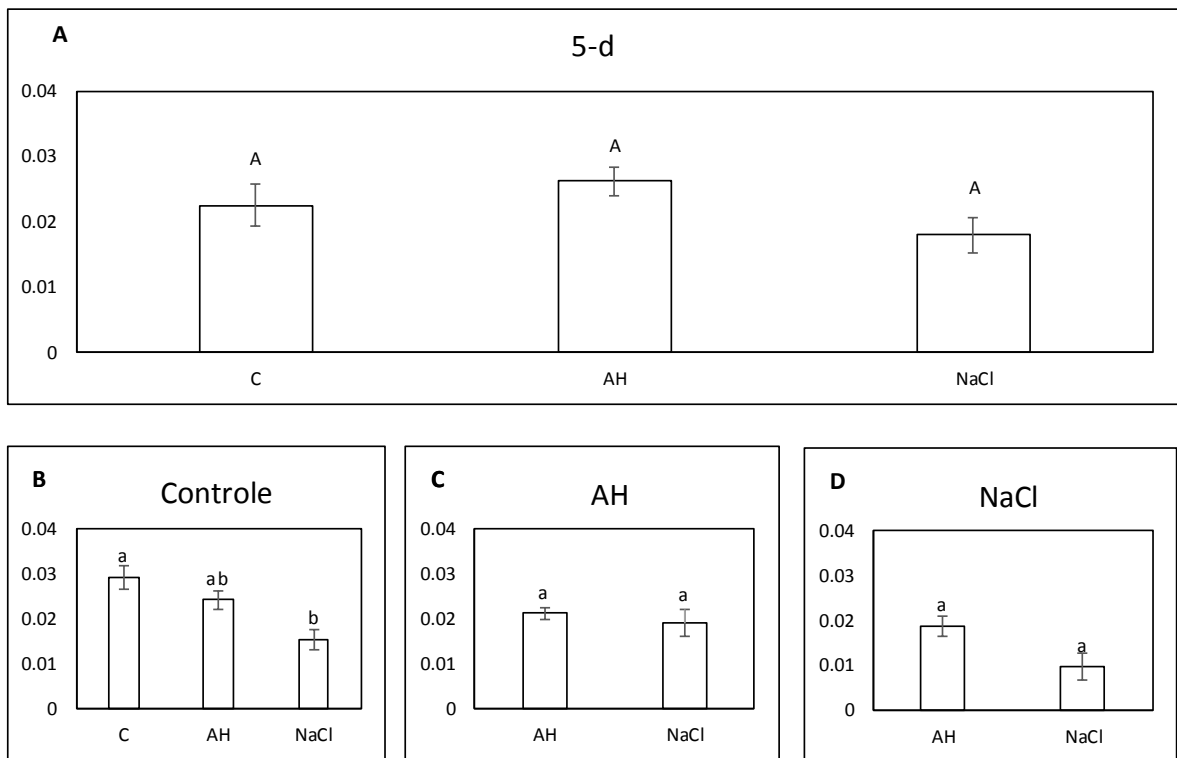


Figura 7. A: Atividade total da catalase (EC 1.11.1.6) em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g ptn}^{-1}$ nas raízes de plântulas de milho 12 dias após a emergência previamente tratadas ou não (Controle) durante 5 dias com ácidos do tipo húmicos (AH 3,5 mM C) ou cloreto de sódio (NaCl 60 mM). Após 5 dias as plântulas foram novamente submetidas aos tratamentos por 72 h. B: controle, sem tratamento prévio; C: Plântulas previamente tratadas com HA; D: plântulas previamente induzidas ao estresse com solução de NaCl. As barras representam o desvio padrão (SD) entorno da média e as letras diferentes representam diferença significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).

4.5. Trabalhos publicados e indexados na base Web of Science (2000-2018) sob a ação das SH na mitigação do estresse salino

Tabela 1. Principais Trabalhos publicados e indexados na base Web of Science (2000-2018) sob a ação das SH na mitigação do estresse salino

| Planta/Local | Estresse salino | Substâncias húmicas | Principais resultados do uso de SH na mitigação do estresse salino | Referências |
|--|--|--|--|---------------------------|
| Feijão/Egito | Solos salinos CE: 3,0 e 5,0 ± 0,2 dS m ⁻¹) | Humato de potássio (KH) (65% de AH) | Aumento da absorção de N, P, K, Prolina, açúcares, flavonoides e fenóis. Redução de Cl e Na. | Taha & Osman, 2018 |
| Gramma do sudão/Egito | NaCl (3.01, 6.12 e 12.33 dS m ⁻¹) | SH (0,1 g.kg ⁻¹) | Aumento de 20% no crescimento das plantas; no teor de clorofila; conteúdo de K; atividade enzimática de CAT e SOD, prolina, açúcares, ácido ascórbico e hormônio vegetais. | Desoky et al., 2018 |
| Porta enxertos de amendoa/Irã | NaCl (0, 60, 120 e 180 mM) | AH (2,5; 5 e 7 kg.ha ⁻¹) | Aumento da atividade enzimática de SOD e CAT; proteínas solúveis e redução do vazamento de eletrólitos. | Hatami et al., 2018 |
| Tomate/Belgica | NaCl (150mM) | Vermicomposto líquido (678 mg L ⁻¹ de HA) | Manteve o conteúdo de água; aumento do conteúdo de K e redução do potencial osmótico e Na nas folhas. | Benazzouk et al., 2018 |
| Pimenta/Egito | NaCl (100mM) | AH (0;750;1500 mg/kg) | Aumento dos parâmetros de crescimento; RWC; pigmentos fotossintéticos; conteúdo mineral; teores de antioxidantes não enzimáticos. | Akladious & Mohamed, 2018 |
| Pimenta/Turquia | NaCl (100mM) | AH (0.5;1;1.5 g L ⁻¹) | Aumento da matéria seca e prolina; redução do conteúdo de sal, atividade enzimática. | Yildiztekin et al., 2018 |
| Diferentes espécies de Halófitas/Paquistão | NaCl (0;100;300 e 500 mM) | AH (250 e 500 mg L ⁻¹) | Aumento da germinação. | Abbasi et al., 2017 |
| Gramma do Sudão/Egito | NaCl (3,01; 6,12 e 12,33 dS m ⁻¹) | AH; AF; AH+AF (5 kg ha ⁻¹) | Aumento de massa fresca, seca, teor de clorofila e absorção de N, P, K. | Merwad, 2017 |
| Pimenta/México | Solo salino (EC 4,25;4,97 dS m ⁻¹) | KH (65% AH; 1000 mg L ⁻¹) | Aumento da germinação in vitro. | Bacilio et al., 2017 |
| Feijão/Austrália | Salinidade (EC = 6,35-6,42 dS m ⁻¹) | KH (0,5 g kg ⁻¹) | Melhora das propriedades físicas e químicas do solo; aumento do crescimento e produtividade das plantas; absorção nutrientes minerais (N, P, K e Ca), osmoprotetores; ácido ascórbico, glutatona; TOC; atividade de SOD, CAT e GPOX. | Hemida et al., 2017 |
| Milho/Budapeste | NaCl (100 mM) | AH (100 mM) | Aumento da biomassa; teores de clorofila; nutrientes minerais e atividade das principais enzimas antioxidantes. | Kaya et al., 2017 |

Cont. Tabela 1. Principais Trabalhos publicados e indexados na base Web of Science (2000-2018) sob a ação das SH na mitigação do estresse salino

| Planta/Local | Estresse salino | Substâncias húmicas | Principais resultados do uso de SH na mitigação do estresse salino | Referências |
|---------------------------------------|--|---|---|--------------------------------------|
| Arabidopsis/Coreia | NaCl (250 mM) | AH (86; 860 mg L ⁻¹) | Degradação induzida por sal da proteína HKT1 foi bloqueada pelo presença de AH. | Khaleda et al., 2017 |
| Soja/Polônia | NaCl (50 mM) | AH (0,005 g dm ⁻¹) | Aumento da massa fresca e seca das plantas; aumento do conteúdo de Ca, Mn, Zn e Fe e teor de clorofila. | Matuszak-Slamani et al., 2017 |
| Pimenta suscetível x tolerante/México | NaCl (0; 25; 50; 75 mM) | AH comercial (1g L ⁻¹) | Aumento dos parâmetros de crescimento e melhora nas relações K/Na e Ca/Na. | Bacilio et al., 2016 |
| Soja/Turquia | NaCl (150 mM) | AF (2,0 mg L ⁻¹) | Aumento do RWC; atividade enzimática (SOD, APX, GST), reduziu o dano oxidativo. | Dinler, 2016 |
| Ervilha/Turquia | NaCl (0; 10; 30 e 60 mM) | AH (0; 30; 60; 90 mg kg ⁻¹) | Aumento dos nutrientes minerais, ácidos orgânicos, hormônios e atividade enzimática. | Esringü et al., 2016 |
| Algodão/Egito | Solução Salina (3,46; 12,86 dS m ⁻¹) | AH (15 kg ha ⁻¹) | Melhora da eficiência fotossintética; eficiência do uso da água; estado nutricional; produtividade de sementes e fiapos. | Rady et al., 2016 |
| Tomate/Egito | Água de irrigação (3,8 dS m ⁻¹) | AH (0; 750; 1500 mg L ⁻¹) | Aumento da altura de plantas, número de folhas, massa fresca de raízes e brotações, precocidade, número de flores por cacho, teores foliares de N, P e K e produtividade de frutos. | Feleafel & Mirda, 2014 |
| Cevada/República Tcheca | Soluções salinas (100 mM) | AH (0,01 e 0,1%) | Aumento da absorção de nutrientes. | Jarsova et al., 2014 |
| Ervilha/Egito | Solo salino (8,2; 8,5 dS m ⁻¹) | AH (500; 200 kg ha ⁻¹) | Efeito sobre enzimas antioxidantes. | Osman & Rady, 2012 |
| Milho/Egito | NaCl (20; 60 mM) | Humus sólido (0, 2 e 4 g/kg) e AH (0, 0,1 e 0,2%) | Aumento da absorção de nutrientes. | Khaled and Fawy, 2011 |
| Tomate/Colombia | NaCl (20; 40; 60; 80 mM) | SH (23,6% HA e 1,1% FA, de leonardita; 40 kg ha ⁻¹) | Aumento no rendimento e na produção de matéria seca por planta, além de redução do teor de sólidos solúveis totais e da acidez titulável dos frutos. | Casierra-Posada an & Rodríguez, 2009 |
| Diferentes espécies arbóreas/Polônia | NaCl (3.3 g/L de água) | Fertilizante AH/AF (1g/planta) | Efeito positivo no crescimento e a aparência de árvores cultivadas sob estresse salino. Aumento do conteúdo de clorofila. | Marosz, 2009 |
| Abóbora/Turquia | NaCl (0, 28 e 56 mM) | AH (1; 2 g kg ⁻¹) | AH diminui o efeito da salinidade na produção de frutos | Demir et al., 1999 |

5. DISCUSSÃO

Como esperado foi observado aumento na biomassa da parte aérea e das raízes nas plântulas tratadas com AH na primeira fase do experimento (Figuras 4 A e 5 A). Diversos autores já relataram aumento da biomassa vegetal em plântulas de milho tratadas com AH (Ferretti et al., 1991; Nardi et al., 2000; Canellas et al., 2002; Santi et al., 2003; Nardi et al., 2007; Carletti et al., 2008; Quaggiotti et al., 2004).

A estimulação das plantas pelos AH pode ser considerada similar à da aplicação exógena de fitormônios tais como o aumento da absorção de nutrientes proporcionada pela estimulação da atividade das bombas de prótons membranares (Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Zandonadi et al., 2007). O aumento no fluxo de prótons em raízes de arroz tratadas com ácidos do tipo húmicos isolados de vermicomposto (AH) foi previamente observado (Ramos et al., 2015). Em milho, o mesmo AH utilizado nesse experimento também aumentou o efluxo de prótons medido pela microssonda vibrátil (Azevedo e tal., 2019). Foi observado concomitantemente o aumento na transcrição diferencial de genes *ZmMha* que codificam diferentes isoformas da proteína H^+ ATPase de membrana plasmática e de aquaporinas (*ZmPIP17*).

A emulação do efeito de auxinas pelas SH foi amplamente descrita (Trevisan et al., 2011; Oxlaetae et al., 2018) e foi relacionada por Canellas et al. (2002) com a teoria do crescimento ácido (Harger, 2003). Além do gradiente eletroquímico necessário para ativação de simporte e antiporte a ativação das H^+ -

ATPases de MP pelas auxinas promove o abaixamento de pH necessário para que proteínas não enzimáticas como as expansinas hidrolisem ligações O-H em grupos COOH e OH das paredes celulares. A quebra de ligações favorece o afrouxamento da parede celular e, portanto, a alongação da célula. O aumento da turgescência também favorece tanto o crescimento celular como o aumento observado na massa fresca das folhas e raízes das plântulas tratadas com AH.

Na fase inicial do experimento era esperada uma redução significativa na massa fresca da parte aérea das plântulas submetidas à salinidade, uma vez que o efeito primário da concentração elevada de sal no meio de crescimento é a diminuição imediata da taxa fotossintética líquida (Munns e Tester, 2008). A diminuição da massa fresca das folhas não foi observada (Figura 4 A). Pelo contrário, foi observado aumento significativo de massa fresca na parte aérea das plantas tratadas por cinco dias com a solução salina. A condutividade elétrica da solução de crescimento e do percolado no vaso foi, aproximadamente, a mesma (Tabela 4 do apêndice) de cerca de $6,6 \text{ dS m}^{-1}$, uma salinidade da solução considerada de média (Béltran, 1999) a alta (Ayres e Westcot, 1994). As plântulas de milho são consideradas medianamente tolerantes à salinidade (Munns e Tester, 2008) e a absorção de água para diminuir o efeito do aumento significativo da absorção de Na^+ (Figura 4) pode ter contribuído para o aumento da massa fresca tanto na parte aérea como nas raízes das plântulas submetidas à salinidade. O padrão de massa seca pode ser observado nas figuras 8 e 9 (apêndice). O conteúdo de água na planta (Tabela 5; apêndice), observado pela diferença entre massa fresca e seca, foi maior nas plantas tratadas com AH.

Na segunda fase do experimento foi observado um efeito significativo no aumento da massa fresca da parte aérea das plantas tratadas com AH e submetidas ao estresse salino (Figura 4 C). Por outro lado, as plântulas continuamente estressadas pela solução salina e expostas à suspensão de AH não perderam massa fresca da parte aérea (Figura 4 D), sendo ainda observado aumento, porém não significativo, da massa fresca da parte aérea. Ficou demonstrado, portanto, que os AH podem mitigar os efeitos dos danos proporcionados pela salinidade, seja com a aplicação prévia ou concomitante com a exposição à salinidade. Os mecanismos responsáveis por esse efeito mitigador podem ser vários e, ainda, ocorrerem simultaneamente. Entre eles, encontra-se

uma possível alteração no balanço iônico das plantas, o mecanismo mais descrito na adaptação e tolerância à salinidade (Kaya et al., 2018).

Com efeito, foi observado um aumento muito significativo não no teor de Na^+ ou K^+ ou Ca^{2+} , mas em ambas as fases do experimento as relações K^+/Na^+ e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ foram significativamente alteradas pelo tratamento com AH (Tabelas 1 e 2). O aumento na absorção de macro e micronutrientes em plantas tratadas com AH e submetidos à salinidade foi observado por (Çimrin et al., 2010).

Posteriormente, outros trabalhos também relacionaram o aumento na absorção de macro e micronutrientes proporcionados pelo tratamento com diferentes tipos de SH com a atenuação dos efeitos da salinidade em diferentes tipos de plantas (Khaled e Fawy, 2011; Osman e Rady, 2012; Feleafel e Mirda, 2014; Jarosova et al., 2014; Osman e Rady, 2012; Merwad, 2017; Hemida et al., 2017; Taha e Osman, 2018; Kaya et al., 2018). O trabalho de Bacilio et al., 2016 relacionou especificamente as alterações promovidas pelos AH nas relações K^+/Na^+ e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ em resposta à salinidade.

A extrusão de Na^+ do citosol, para o vacúolo (halófitas) ou para o apoplasto (glicófitas), ocorre através do antiporte Na^+/H^+ . O antiporte é um transporte ativo secundário que utiliza o gradiente eletroquímico estabelecido pela H^+ -ATPase da MP. É sabido que AH isolados de vermicomposto podem ativar a H^+ -ATPase de MP (Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Zandonadi et al., 2007). Neste sentido, era esperado que os AH reduzissem as concentrações de Na^+ na parte aérea das plântulas de milho de forma mais significativa. É possível que a extrusão de Na^+ para o apoplasto não tenha sido uma estratégia eficiente para a tolerância à salinidade moderada, uma vez que plantas glicófitas não são eficientes na exclusão de sais e não possuem mecanismos eficientes de compartimentalização (Silveira et al., 2016; Bacilio et al., 2016).

Khaleda et al. (2017) observaram uma degradação da proteína HKT1 induzida pela salinidade que foi bloqueada pelo tratamento com HA. O bloqueio desse transportador reduziu a absorção de Na^+ , no entanto, como esse transportador é comum ao K^+ é possível que sua absorção também seja reduzida. Além disso, a aplicação de HA levou ao aumento da distribuição de Na^+ nas raízes até a zona de alongamento e causou a reabsorção de Na^+ em plantas mutantes que apresentaram elevada expressão dessa proteína.

O Na^+ compartilha dos mesmos transportadores de K^+ e Ca^{2+} , quando em altas concentrações de Na^+ , há um desequilíbrio nas relações K^+/Na^+ e $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$, com maior influxo de Na^+ . O Na^+ pode também ser absorvido por meio de canais de cátion de baixa afinidade, os chamados canais não seletivos (Silveira et al., 2016). A capacidade das plantas de manter uma alta razão de K^+/Na^+ e uma alta razão de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ é um dos fatores determinantes para a tolerância à salinidade elevada (Maathuis e Amtmann, 1999; Munns e Tester, 2008). As altas razões citosólicas de K^+/Na^+ na parte aérea são críticas para a tolerância ao estresse salino em glicófitas (Khaleda et al., 2017) que não toleram salinidade ou CE acima de 4 dS m^{-1} , ou aproximadamente 40 mM de NaCl (Munns e Tester, 2008). Este fato está relacionado ao aumento do influxo de Na^+ que geralmente resulta em redução severa do crescimento, sintomas de toxicidade moderada ou mesmo morte das plantas (Bacilio et al., 2016).

O tratamento com AH apresentou teor de Ca^{2+} 27% maior que o tratamento com NaCl . A salinidade ocasionada pelo excesso de Na^+ reduz a disponibilidade, o transporte e a mobilidade do Ca^{2+} para as regiões de crescimento. Isso afeta diretamente a qualidade dos órgãos vegetativos e reprodutivos. O maior teor de Ca^{2+} auxilia na redução da concentração de íons Na^+ nas plantas (Marosz et al., 2009). O influxo de Ca^{2+} para o citoplasma em plântulas tratadas com AH foi observado previamente por Ramos et al. (2015), que também observaram aumento na expressão dos genes que codificam para a produção de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. O acúmulo de Ca^{2+} em abacaxizeiro tratado com AH isolados de vermicomposto foi previamente observado por Baldotto et al. (2010). O tratamento com HA aumentou o valor da relação $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ 34% em relação ao controle e 15 vezes quando comparadas as plântulas submetidas à salinidade (Tabela 3).

O aumento da atividade das enzimas antioxidantes tais como CAT, POD e SOD estão relacionadas à tolerância ao estresse salino, uma vez que atuam na detoxificação do excesso de EROs (Silveira et al., 2016; Baxter et al., 2014). Já foi previamente reportado aumento da atividade das enzimas antioxidantes pelos AH em condições de salinidade (Dinler, Gunduzer, e Tekinay, 1999; Hemida et al., 2017; Desoky, Merwad, e Rady, 2018) enquanto outros relataram que os HA reduziram a atividade enzimática (Kaya et al., 2017; Yildztekin et al., 2018).

Radicais superóxido são produzidos na fotossíntese na transferência de elétrons para o oxigênio e produzem H_2O_2 . Por esse motivo, diferentes tipos de antioxidantes enzimáticos como CAT são constantemente produzidos para manutenção do nível de H_2O_2 dentro das células. As concentrações de metabólitos e atividades enzimáticas podem aumentar ou diminuir durante diferentes condições ambientais. Durante o estresse salino, o uso de HA pode induzir o aumento da atividade dessas enzimas e concorrer com NaCl, reduzindo os efeitos deletérios. Foi possível observar um aumento na atividade enzimática nas plântulas na presença de HA em relação ao controle, tanto na parte aérea (+16%), como na raiz (+15%), em comparação com o controle (Fig. 5A e 6A). Comparado ao NaCl, o aumento foi de 9% e 42%, respectivamente. Plantas tratadas com SH mostraram a melhor recuperação do estresse oxidativo induzido pela salinidade (Desoky, Merwad, e Rady, 2018) ou seca (Aguiar et al., 2018; da Piedade et al., 2017).

Hatami et al. (2018) observaram que o uso de AH inibiu a atividade de EROs ao mesmo tempo que aumentou a atividade enzimática de SOD e CAT. Observamos neste experimento que em plântulas controle que foram expostas à salinidade (Figura 6 B) a atividade da CAT no extrato foliar foi 52% menor em comparação com as plântulas tratadas com AH. Em plântulas pré-tratadas com NaCl com adição ou não de AH, a presença dos AH aumentou a atividade de CAT em 38% em parte aérea.

Foi possível concluir que a mitigação dos efeitos do estresse salino pelos AH pôde ser relacionada com (i) alterações no balanço iônico das plântulas e (ii) promoção da atividade de enzimas antioxidantes. Outros efeitos previamente relacionados à mitigação do estresse salino em diferentes plantas tratadas com SH indicaram alterações no balanço hormonal (Esringü et al., 2016), aumento na produção de compostos orgânicos osmoprotetores (Osman e Rady, 2012; Hemida et al., 2017; Yildiztekin, Tuna, e Kaya, 2018; Desoky, Merwad, e Rady, 2018), aumento no conteúdo de clorofila (Marosz, 2009; Kaya et al., 2018) e na eficiência fotossintética (Osman e Rady, 2012; Rady et al., 2016). É esperado que todos esses efeitos atuem de forma simultânea e a análise de forma isolada possa apresentar algumas distorções inerentes a forma como se faz a experimentação agrícola, isto é, tentando isolar os fatores para compreendê-los.

6. RESUMO E CONCLUSÃO

A salinidade é uma condição natural dos solos em regimes áridos e em zonas litorâneas. De maneira antrópica a salinização ocorre também em áreas cultivadas com manejo equivocado da irrigação. Tendo em vista essa problemática, são necessárias a utilização de produtos e/ou processos que reduzam os danos causados pelo estresse. Os bioestimulantes vegetais foram definidos como materiais ou microrganismos que, quando aplicados em pequenas concentrações, podem promover o crescimento das plantas e atenuar os danos de estresses bióticos e abióticos em plantas. Os ácidos húmicos têm sido um dos materiais mais utilizados na formulação dos bioestimulantes e já foi relatado o seu uso com sucesso na mitigação dos efeitos do estresse salino. Nesse estudo foi observado alguns efeitos mitigatórios dos AH. Plântulas tratadas com AH apresentaram maior massa fresca de raiz e parte aérea mesmo sob condições de salinidade. A presença dos AH no meio de crescimento não diminuiu o teor de Na^+ , no entanto, nessas condições as relações K^+/Na^+ foram maiores que nas plântulas sob salinidade, há uma hipótese a ser testada sobre a possibilidade de que as plântulas tenham acumulado sódio nos vacúolos e por esse motivo os teores de Na^+ não tenham diminuído. Houve um aumento geral da atividade de CAT na presença dos AH, superior à atividade nas plântulas submetidas ao estresse salino moderado. A recuperação do estresse salino em plântulas tratadas com AH envolveu além do aumento de massa fresca a ativação do sistema enzimático de proteção antioxidante e alteração no balanço iônico celular.

A continuação óbvia desse trabalho é a de estudar a expressão diferencial dos genes de resposta à salinidade em plântulas tratadas com AH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, N. O., Olivares, F. L., Novotny, E. H., Canellas, L. P. (2018). Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. *Peer J*, 6:e5445; DOI 10.7717/peerj.5445).
- Aguiar, N. O., Medici, L. O., Olivares, F. L., Dobbss, L. B., Torres-Netto, A., Silva, S. F., Novotny, E. H., Canellas, L. P. (2016). Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. *Annals of Applied Biology*, 168: 203-213.
- Aguiar, N. O., Novotny, E. H., Oliveira A. L., Rumjanek V. M., Olivares, F. L., Canellas L. P. (2013a). Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. *J. Geochem. Explor.* 129, 95–102.
- Ahanger M. A., Akram N. A., Ashraf M., Alyemeni M. N., Wijaya L., Ahmad P. (2016). Signal transduction and biotechnology in response to environmental stresses. *Biologia Plantarum*, 61 (3): 401-416, 2016.
- Akladios, S. A. e Mohamed, H. I. (2018). 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*, 236, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.047>.
- Altieri, M (2002) Agroecologia - Bases Científicas para uma agricultura sustentável. *Expressão Popular-ASPTA*; 592 p.
- Atkinson, N. J. e Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523–3544. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers100>.
- Ayers, R. S. e Westcot, D. W. (1994). Water quality for agriculture. 3. ed. Rome: FAO. *Irrigation and Drainage Paper*, 29; 174p.

- Azevedo, I. G., Ramos, A. C., Olivares, F. L., Bertolazzi, A. A., Canellas, L. P. (2019). Humic acids and *Herbaspirillum seropedicae* change the extracellular H⁺ flux and gene expression in maize roots seedlings *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* (DOI: 10.1186/s40538-019-0149-02019).
- Bacilio, M., Moreno, M., Lopez-Aguilar, D. R., Bashana, Y. (2017). Scaling from the growth chamber to the greenhouse to the field: Demonstration of diminishing effects of mitigation of salinity in peppers inoculated with plant growth-promoting bacterium and humic acids. *Applied Soil Ecology*, 119: 327–338.
- Bacilio, M., Moreno, M., Bashana, Y. (2016). 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*, 107: 394–404.
- Baldotto, M. A., Baldotto, L. E. B., Gonzaga Junior, L., Olivares, F. L., Canellas, L. P. (2012a). Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. *Revista Ceres*, 59:262-270.
- Baldotto, L. E. B., Baldotto, M. A., Olivares, F. L., Viana, A. P., Bressan-Smith, R. (2010). Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar Vitória durante a aclimatização. *R. Bras. Ci. Solo*, 34:349-360.
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1229-1240.
- Benazzouk, S., Djazouli, Z. E., Lutts, S. (2018). Assessment of the preventive effect of vermicompost on salinity resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig). *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(6), 0. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2696-6>.
- Berbara, R. L., García, A. C. (2014). Humic substances and plant defense metabolism, Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment. In: Parvaiz, A., Mohd, R.W. (Eds.), *Humic Substances and Plant Defense Metabolism*. Springer, New York, pp. 297–319.
- Bettoni, M. M., Mogor, F., Pauletti, V., Goicoechea, N., Aranjuelo, I., Garmendia, I. (2016). Nutritional quality and yield of onion as affected by different application methods and doses of humic substances. *Journal of Food Composition and Analysis*, 51, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.06.008>.
- Bindumadhava, H., Nair, R. M., Nayyar, H. (2016) Salinity and High Temperature Tolerance in Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] from a Physiological Perspective. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. June, p. 1–20.
- Bottomley, W. B. (1917). Some effects of organic growth-promotion substances (auximones) on the growth of *Lemna minor* in mineral cultural solutions. *Proc. R. Soc. London (Biol.)* 89, 481–505.

- Bottomley, W. B. (1920). The effect of organic matter on the growth of various plants in culture solutions. *Ann. Bot.* London 34, 353–365.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Calvo-Polanco, M., Sanchez-Romera, B., Aroca, R. (2014). Mild salt stress conditions induce different responses in root hydraulic conductivity of phaseolus vulgaris over-time. *PLoS One*. 9 (3): e90631.
- Canellas, L. P., Piccolo, A., Dobbss, L. B., Spaccini, R., Olivares, F. L., Zandonadi, D. B., Façanha, A. R. (2010). Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*, 78, (4), 457-466.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Canellas, N. O. A., Mazzei, P., Piccolo, A. (2019). Humic acids increase the maize seedlings exudation yield. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 6:3.
- Canellas, L. P., Dantas, D. J., Aguiar, N. O., Peres, L. E. P., Zsögön, A., Olivares, F. L., Dobbss, L. B., Facanha, A. R., Nebbioso, A., Piccolo, A. (2011). Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomatoauxin mutants. *Annals of Applied Biology*, 159: 202-211.
- Canellas, L. P., Martínez-Balmori, D., Médici, L. O., Aguiar, N. O., Campostrini, E., Rosa, R. C., Façanha, A. R., Olivares, F. L. (2013). A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*, 366: 119-132.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L. (2017). Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid. *Plant Soil*. 2017; 417:403–13.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Okorokova-Façanha, A. L., Façanha, A. R. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130: 1951–1957.
- Canellas, L. P., Silva, S. F., Olivares, F. L. (2017). The biostimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield. *Chemical Biological Technologies for Agriculture*, Doi: 10.1186/s40538-017-0106-8.
- Canellas, L. P., Silva, S. F., Olk D, Olivares, F. L. (2015). Foliar application of *Herbaspirillum seropedicae* and humic acid increase maize yields. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 13: 146-153.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L. (2014). Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1: 1– 11.

- Canellas, L. P., Dobbss, L. B., Oliveira, A. L., Chagas, J. G., Aguiar, N. O., Rumjanek, V. M., Novotny, E. H., Olivares, F. L., Spaccini R, Piccolo A (2012). Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *Eur. J. Soil Sci.* 63,315–324.
- Carlett, P., Masi, A., Spolaore, B., Polverino De Laureto, P., De Zorzi, M., Turetta, L., Ferretti, M., Nardi, S. (2008). Protein expression changes in maize roots in response to humic substances. *Journal of Chemical Ecology*, 34: 804-818.
- Casierra-Posada, F., Rodríguez, C. A. (2009). Reducing negative effects of salinity in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants by adding leonardite to soil. *Acta Horticulturae*, Doi: 10.17660/2009.821.14
- Chen, Y., Clapp, C. E., Magen, H. (2004). Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Sci Plant Nutr.*; 50:1089-1095.
- Çimrin, K. M., Türkmen, Ö., Turan, M., Tuncer, B. (2010). Phosphorus and humic acid application alleviate salinity stress of pepper seedling. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 5845–5851.
- Cordeiro, F. C., Santa-Catarina, C., Silveira, V., De Souza, S. R. (2011). Humic acid effect on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea mays* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75: 70–74.
- Da Piedade Melo, A., Olivares, F. L., Médici, L. O., Torres-Neto, A., Dobbss, L. B., Canellas, L. P. (2017). Mixed rhizobia and *Herbaspirillum seropedicae* inoculations with humic acid-like substances improve water-stress recovery in common beans. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4:6.
- De Lima, V. L. A., De Farias, M. S. S., Borges Júnior, J. C. F. (2016). Drenagem agrícola no manejo dos solos afetados por sais. In: Gheyi, H. R., Dias, N. da S., Lacerda, C. F., Gomes Filho, E. (ed.). Manejo da salinidade na agricultura. Fortaleza, *INCT Sal.* p. 422.
- Demir, K., Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M. (1999). Effects of humic acids on the yield mineral nutrition of cucumber (*cucumis sativus* L.) grown with different salinity levels. *Acta horticulturae*, 492(492):95-104.
- Desoky, E. S. M., Merwad, A. R. M., Rady, M. M. (2018). Natural Biostimulants Improve Saline Soil Characteristics and Salt Stressed-Sorghum Performance. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49(8), 967–983. <https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1448861>.
- Dias, N. S., Blanco, F. F. (2010). Efeitos dos sais no solo e na planta. Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados. *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade*. Fortaleza- CE. ISBN 978-85-7563-489-9.
- Dinler, B. S., Gunduzer, E., Tekinay, T. (2016). Pre-treatment of fulvic acid plays a stimulant role in protection of soybean (*Glycine max* L.) leaves against heat and salt stress. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 58(1), 29–41. <https://doi.org/10.1515/abcsb-2016-0002>.

- Dobbss, L. B., Canellas, L. P., Alleoni, L. R. F., Rezende, C. E. R., Fontes, M. F., Velloso, A. C. X. (2008). Eletroquímica de Latossolos brasileiros após a remoção da matéria orgânica humificada solúvel. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:985-996, 2008.
- Dobbss, L. B., Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Peres, L. E. P., Azevedo, M., Spaccini, R., Piccolo, A., Façanha, A. R. (2010). Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3681–3688
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196: 3-14.
- Ertani, A., Francioso, O., Pizzeghello, D., Tobar, E. L., Sanchez-Cortes, S., Nardi, S. (2013): Spectroscopic and biological properties of humic substances extracted from earthworm coprolites in a long-term experiment treated with manure and mineral fertilization. *Bioremed. Biodivers. Bioavail.* 7, 14–21.
- Ertani, A., Francioso, O., Tugnoli, V., Righi, V., Nardi, S. (2011). Effect of commercial lignosulfonate-humate on *Zea mays* L. Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11940–11948. <https://doi.org/10.1021/jf202473e>.
- Esringü, A., Kaynar, D., Turan, M. (2016). Ameliorative effect of humic acid and plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) on hungarian vetch plants under salinity stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, DOI:10.1080/00103624.2016.1141922.
- Esteves, B. S., Suzuki, M. S. (2008). Efeitos da Salinidade Sobre as Plantas. *Oecol. Bras.*, v.12, n.4, p.662-679.
- Façanha, A. R., Façanha, A. L. O., Olivares, F. L., Guridi, F., Santos, G. A., Velloso, A. C. X., Rumjanek, V. M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz-Filho, R., Oliveira, M. A. e Canellas, L. P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37:1301- 1310.
- Feleafel, M. N., Mirdad, Z. M. (2014). Alleviating the deleterious effects of water salinity on greenhouse grown tomato. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(1), 49–56.
- Ferreira, P. A., da Silva, J. B. L., Ruiz, H. A. (2016). Aspectos físicos e químicos de solos em regiões áridas e semiáridas. In: Gheyi, H. R., Dias, N da S., Lacerda, C. F., Gomes Filho, E. (ed.). Manejo da salinidade na agricultura. Fortaleza, *INCT Sal.* p. 22.
- Ferretti, M., Ghisi, R., Nardi, S., Passera, C. (1991). Effect of humic substances on photosynthetic sulphate assimilation in maize seedlings. *Can. J. Soil Sci.* 71, 239–242;
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1979). Yield Response to Water. In: Irrigation and Drainage Paper, No.33. *FAO*, Rome.

- García, A. C., Santos, L. A., Izquierdo, F. G., Rumjanek, V. M., Castro, R. N., Santos, F. S., Ambrosio de Souza, L. G., Berbara, R. L. (2014). Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Journal of Geochemical Exploration*, 136 pág. 48–54.
- García, A. C., Santos, L. A., Ambrósio de Souza, L. G., Tavares, O. C. H., Zonta, E., Gomes, E. T. M., García-Mina, J. M., Berbara, R. L. L. (2016). Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants. *J. Plant Physiol.* 192, 56–63.
- García, A. C., Santos, L. A., Izquierdo, F. G., Sperandio, M. V. L., Castro, R. N., Berbara, R. L. L. (2012). Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecol. Eng.* 47, 203–208.
- Gaxiola, R. A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L., Fink, G. R. (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:1480–1485.
- Glenn, E. P., Brown, J. J., Blumwald, E. (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 18: 227–255.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32, 481-494.
- Hager, A. (2003). Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J Plant Res*, 116:483–505.
- Hatami, E., Ali, A. S., Ali, R. G. (2017). Alleviating salt stress in almond rootstocks using of humic acid. *Scientia Horticulturae*, v. 237, n. December 2017, p. 296–302, 2018.
- Hemida, K. A., Eloufey, A. Z. A., Seif El-Yazal, M. A., Rady, M. M. (2017). Integrated effect of potassium humate and α -tocopherol applications on soil characteristics and performance of *Phaseolus vulgaris* plants grown on a saline soil. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(11), 1556–1571. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1292033>.
- Huang, C., He, W., Guo, J., Chang, X., Su, P., Zhang, L. (2005). Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *Journal of Experimental Botany*, 56: 3041–3049.
- Jannin, L., Arkoun, M., Ourry, A., Laine, P., Goux, D., Garnica, M., Fuentes, M., San Francisco, S., Baigorri, R., Cruz, F., Houdusse, F., Garcia-Mina, J. M., Yvin, J. C., Etienne, P. (2012). Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. *Plant and Soil*, 359: 297–319.
- Jarosova, M., Klejdus, B., Kovacik, J., Hedbavny, J. (2014). The impact of humic substances on oxidative stress and plant growth of spring barley exposed to NaCl. *Mendelnet*, 463–468.

- Jia, Z., Lian, Y., Zhu, Y., He, J., Cao, Z., Wang, G. (2009). Cloning and characterization of a putative transcription factor induced by abiotic stress in *Zea mays*. *Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 24, p. 6764–6771.
- Kaya, C., Akram, N. A., Ashraf, M., Sonmez, O. (2018). Exogenous application of humic acid mitigates salinity stress in maize (*Zea mays* L.) plants by improving some key physico-biochemical attributes. *Cereal Research Communications*, 46(1), 67–78. <https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.064>.
- Khaled, H. e Fawy, H. A. (2011). Effect of Different Levels of Humic Acids on the Nutrient Content, Plant Growth, and Soil Properties under Conditions of Salinity. *Soil and Water Res*, 6: 21-29.
- Khan, M. I. R., Mughal, A., Iqbal, N., Khan, N. A. (2013). Potentiality of sulphur containing compounds in salt stress tolerance. In: Parvaiz, A., Azooz, M. M., Prasad, M. N. V., editors. *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*. Springer, p. 443–472. Chapter 17.
- Kraus, T. E., McKersie, B. D., Fletcher, R. A. (1995). Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. *Journal of Plant Physiology*, 145, 570–576.
- Liang, X. W., Zhang, L., Natarajan, S. K., Beckker, D. F. (2013) Proline Mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signaling*, 19:998–1011.
- Liu, C., Mao, B., Ou, S., Wang, W., Liu, L., Wu, Y. (2014). OsbZIP71, a bZIP transcription factor, confers salinity, and drought tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* 84, 19–36. doi: 10.1007/s11103-013-0115-3.
- Maathuis, F. J. M. e Amtmann, A. (1999). K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany* 84: 123–133.
- Madhava, R. K. V., Sresty, T. V. (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science* 157: 113–128.
- Maggioni, A., Varanini, Z., Nardi, S., Pinton, R. (1987). Action of soil humic matter on plant roots: stimulation of ion uptake and effects on (Mg²⁺ + K⁺) ATPase activity. *Science of the Total Environment*, 62: 355–363.
- Mahajan, S. e Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444 (2005) 139–158
- Marosz, A. (2009). Effect of fulvic and humic organic acids and calcium on growth and chlorophyll content of tree species grown under salt stress. *Dendrobiology*, 62: 47-53.
- Matuszak-Slamani, R., Bejger, R., Cieśła, J., Bieganowski, A., Koczańska, M., Gawlik, A., Gołębiowska, D. (2017). Influence of humic acid molecular fractions on growth and development of soybean seedlings under salt stress. *Plant Growth Regulation*, 83(3), 465–477. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0312-1>.

- Merwad, A. R. M. (2017). Effect of humic and fulvic substances and Moringa leaf extract on Sudan grass plants grown under saline conditions. *Canadian Journal of Soil Science*, 97(4), CJSS-2017-0050. <https://doi.org/10.1139/CJSS-2017-0050>.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Baigorri, R., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M. (2014a). NO and IAA key regulators in the shoot growth promoting action of humic acid in *Cucumis sativus* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33: 430–439.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A. M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M., García-Mina, J. M. (2010). Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology*, 167: 633–642.
- Mora, V., Baigorri, R., Bacaicoa, E., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M. (2012). The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. *Environmental and Experimental Botany – Journal*, 76: 24–32.
- Mora, V., Olaetxea, M., Bacaicoa, E., Baigorri, R., Fuentes, M., Zamarrereño, A. M., Garcia-Mina, J. M. (2014b). Abiotic stress tolerance in plants: exploring the role of nitric oxide and humic substances. In MN Khan, M Mobin, F Mohammad, FJ Corpas, eds, *Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology*. Springer International Publishing, Berlin, pp 243–264.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239–250.
- Munns, R. e Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651–81.
- Muscolo, A., Felici, M., Concheri, G., Nardi, S. (1993). Effect of earthworm humic substances on esterase and peroxidase activity during growth of leaf explants of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Biology and Fertility of Soils*, 15:127–131.
- Nakashima, K., Ito, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses. *Plant Physiology*, v. 149, n. 1, p. 88–95.
- Nakashima, K., Tran, L. S. P., Nguyen, D. V., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Todaka, D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. – *The Plant Journal*, 51: 617-630.
- Nardi, S., Ertani, A., Ornella, F. (2017). Soil-root cross-talking: the role of humic substances. *J Plant Nutr Soil Sci*. 180:5–13.

- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances in higher plants. *Soil Biol. Biochem.* 34:1527-1537.
- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., Muscolo, A. (2009). Biological activities of humic substances. *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental*, 301–337.
- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., Muscolo, A. (2009). Biological activities of humic substances. *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental*, 301–337.
- Nardi, S., Concheri, G., Dell’Agnola, G., Scrimin, P. (1991). Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. *Soil Biology and Biochemistry.* 23: 833–836.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Gessa, C., Ferrarese, L., Trainotti, L., Casadoro, G. (2000). A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 32, 415–419.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., Ertani, A. (2016): Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Sci. Agric.* 73, 18–23.
- Olaetxea, M., Hita, D., García, A. C., Fuentes, M., Baigorri, R., Mora, V., Garnica, M., Urrutia, O., Erro, J., Angel M^a Zamarreño, A. M., Berbara, R. L., Garcia-Mina, J. M. (2018). Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root- and shoot growth. *Appl Soil Ecol.* 2018; 123:521-537.
- Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Rosa, R. C. C., Canellas, L. P. (2015). Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 183: 100-108.
- Osman, A. S. H. e Rady, M. M. (2012). Ameliorative effects of sulphur and humic acid on the growth, anti-oxidant levels, and yields of pea (*Pisum sativum* L.) plants grown in reclaimed saline soil. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87 (6) 626-632
- Pedrotti, A., Chagas, R. M., Ramos, V. C., Prata, A. P. do N., Lucas, A. A. T., Santos, P. B. (2015). Causas e consequências do processo de salinização dos solos. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 19(2), 1308–1324. <https://doi.org/10.5902/2236117016544>.
- Pettit, R. E. (2002). Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid and humin: Their importance in soil fertility and plant health, *A and M University* p. 1–24. Texas.
- Piccolo, A., Spaccini, R., Drosos, M., Vinci, G., Cozzolino, V. (2018). The Molecular Composition of Humus Carbon: Recalcitrance and Reactivity in Soils In The Future of Soil Carbon. *Elsevier Inc*, ISBN 978-0-12-811687-6, DOI: 10.1016/B978-0-12-811687-6.00004-3.

- Piccolo, A. (2012). The nature of soil organic matter and innovative soil managements to fight global changes and maintain agricultural productivity. In: Carbon sequestration in agricultural soils a multidisciplinary approach to innovative methods, Piccolo, A. ed. *Springer Heidelberg* DOI 10.1007/978-3-642-23385-2).
- Piccolo, A. (2001). The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 166 (11): (810-832).
- Piccolo, A. (2002). The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.* 75, 57–133.
- Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Varanini, Z. (1997). Soil humic substances stimulate proton release by intact oat seedling roots. *Journal of Plant Nutrition*, 20: 857–869.
- Prisco, J. T. e Gomes Filho, E. (2010). Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: Gheyi, H. R.; Dias, N. S., Lacerda, C. F. Manejo da salinidade na agricultura. Fortaleza, *INCT Sal.* p. 472.
- Quaggiotti, S., Reperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2004). Effect of low molecular size humic substances on the expression of genes involved in nitrate transport and reduction in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55: 803–813.
- Rady, M. M., Abd El-Mageed, T. A., Abdurrahman, H. A., Mahdi, A. H. (2016). Humic acid application improves field performance of cotton (*Gossypium barbadense* L.) under saline conditions. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 26(2), 487–493.
- Ramos, A. C., Olivares, F. L., Silva, L. S., Aguiar, N. O., Canellas, L. P. (2015). Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling dependent on Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2, 4.
- Ribeiro, M. R., Filho, M. R. R., Jacomine, P. K. T. (2016). Origem e classificação dos solos afetados por sais. In: Gheyi, H. R., Dias, N. da S., Lacerda, C. F., Gomes Filho, E. (ed.). Manejo da salinidade na agricultura. Fortaleza, *INCT Sal.* p. 34.
- Rice, J. A. e MacCarthy, P. (1991). Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Organic Geochemistry* 17: 635-648).
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R. (2004). When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology*, 134 (4) 1683-1696; DOI: 10.1104/pp.103.033431.
- Roomi, S., Masi, A., Conselvan, G. B., Trevisan, S., Quaggiotti, S., Pivato, M., Arrighoni, G., Yasmin, T., Carletti, P. (2018). Protein profiling of arabidopsis roots

treated with humic substances: insights into the metabolic and interactome networks. *Front Plant Sci.* 9:1812.

Rose, M. T., Patti, A. F., Little, K. R., Brown, A. L. (2014). A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in Agronomy*, 124: 37-89.

Russell, L., Stokes, A. R., Macdonald, H., Muscolo, A., Nardi, S. (2006). Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A2. *Plant and Soil* 283, 175–185.

Santi, S., Locci, G., Monte, R., Pinton, R., Varanini, Z. (2003). Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms. *J. Exp. Bot.* 54, 1851–1864.

Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., Zhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(3), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.01.002>.

Shinozaki, K. e Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress tolerance and response. *Journal of Experimental Botany*, 58: 221-227.

Silveira, J. A. G., Silva, S. L. F., Silva, E. N., Viégas, R. A. (2016). Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: Gheyi, H. R., Dias, N. da S., Lacerda, C. F., Gomes Filho, E. (ed.). Manejo da salinidade na agricultura. Fortaleza, *INCT Sal*.p. 206.

Spaccini, R., Piccolo, A., Conte, P., Haberhauer, G., Gerzabek, M. H. (2002). Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biol Biochem* 34:1839–1851).

Spaccini, R., Piccolo, A. (2009). Molecular characteristics of humic acids extracted from compost at increasing maturity stages. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1164–1172.]

Stevenson, F. J. (1994). The humus chemistry, Genesis, Composition, Reactions. Second Edition, New York, *John Wiley & Sons*, 496p.

Taha, S. S. e Osman, A. S. (2018). Influence of potassium humate on biochemical and agronomic attributes of bean plants grown on saline soil. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93(5), 545–554. <https://doi.org/10.1080/14620316.2017.1416960>.

Taiz, L. e Zieger, E. (2002). *Plant Physiology*. Third Edition, 690 p.

Trevisan, S., Botton, A., Vaccaro, S., Vezzaroa, A., Quaggiotti, S., Nardi, S. (2011). Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environmental and Experimental Botany – Journal*, 74: 45–55.

- Varanini, Z., Pinton, R., De Biasi, M. G., Astolfi, S., Maggioni, A. (1993). Low molecular weight humic substances stimulated H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant and Soil*, 153, 61–69.
- Vaughan, D. e Malcolm, R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological process. In: VAUGHAN, D MALCOLM, R.E. (eds.) *Soil Organic Matter and Biological Activity*. Dordrecht: *Kluwer Academic Publishers*, p 37-75.
- Vitart, V., Baxter, I., Doerner, P., Harper, J. F. (2001). Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H⁺-ATPase in the root endodermis. *Plant Journal* 27: 191–201.
- Wang, W., Vinocur, B. & Altman, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1–14 (2003). <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Wei, W., Bilsborrow, P. E., Hooley, P., Fincham, D. A., Lombi, E., Forster, B. P. (2003). Salinity induced differences in growth, ionic distribution, and partitioning in barley between the cultivar Maythorpe and its derived mutant Golden Promise. *Plant Soil*, v.250, p.183-191.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. e Shinozaki, K. (2006). Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance To Dehydration and Cold Stresses. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, n. 1, p. 781–803.
- Yildiztekin, M., Tuna, A. L., Kaya, C. (2018). Physiological effects of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*) and humic substances on plant growth, enzyme activities of certain pepper plants grown under salt stress. *Acta Biologica Hungarica*, 69(3), 325–335. <https://doi.org/10.1556/018.68.2018.3.8>.
- Yu, Q. e Rengel, Z. (1999). Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leaved lupins. *Plant Science*, 144: 1–11.
- Zacccone, C., Soler-Rovirab, P., Plazab, C., Cocozzaa, T. M., Miano. (2009). Variability in As, Ca, Cr, K, Mn, Sr, and Ti concentrations among humic acids isolated from peat using NaOH, Na₄P₂O₇ and NaOH + Na₄P₂O₇ solutions. *Journal of Hazardous Materials*, v. 167, n. 1–3, p. 987–994, 2009.
- Zakikhani, H., Ardakani, M. R., Rejali, F., Gholamhoseini, M., Joghhan, A. K., Dolatabadian, A. (2012). Influence of diazotrophic bacteria on antioxidant enzymes and some biochemical characteristics of soybean subjected to water stress. *Journal of Integrative Agriculture*, 11:1828–1835.
- Zandonadi, D. B., Santos, M. P., Busato, J. G., Peres, L. E. P., Façanha, A. R. (2013). Plant physiology as affected by humified organic matter. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(1): 12-25.
- Zandonadi, D. B., Santos, M. P., Caixeta, L. S., Marinho, E. B., Peres, L. E. P., Façanha, A. R. (2016). Plant proton pumps as markers of biostimulant action. *Sci Agric*. 73:24-28).

- Zandonadi, D. B., Santos, M. P., Dobbss, L. B., Olivares, F. L., Canellas, L. P., Binzel, M. L., Okorokova-Facanha, A. L., Façanha, A. R. (2010). Nitric oxide mediates humicacids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*, 231: 1025–10.
- Zandonadi, D. B., Canellas, L. P. e Façanha, A. R. (2007). Indoleacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta* 225, 1583–1595.
- Zhao, Y., Xing, L., Wang, X., Hou, Y. J., Gao, J., Wang, P., Duan, C. G., Zhu, X., Zhu, J. K. (2014). The ABA receptor PYL8 promotes lateral root growth by enhancing MYB77-dependent transcription of auxin-responsive genes. *Sci Signal*.3;7(328):ra53. doi: 10.1126/scisignal.2005051.

7. APÊNDICE

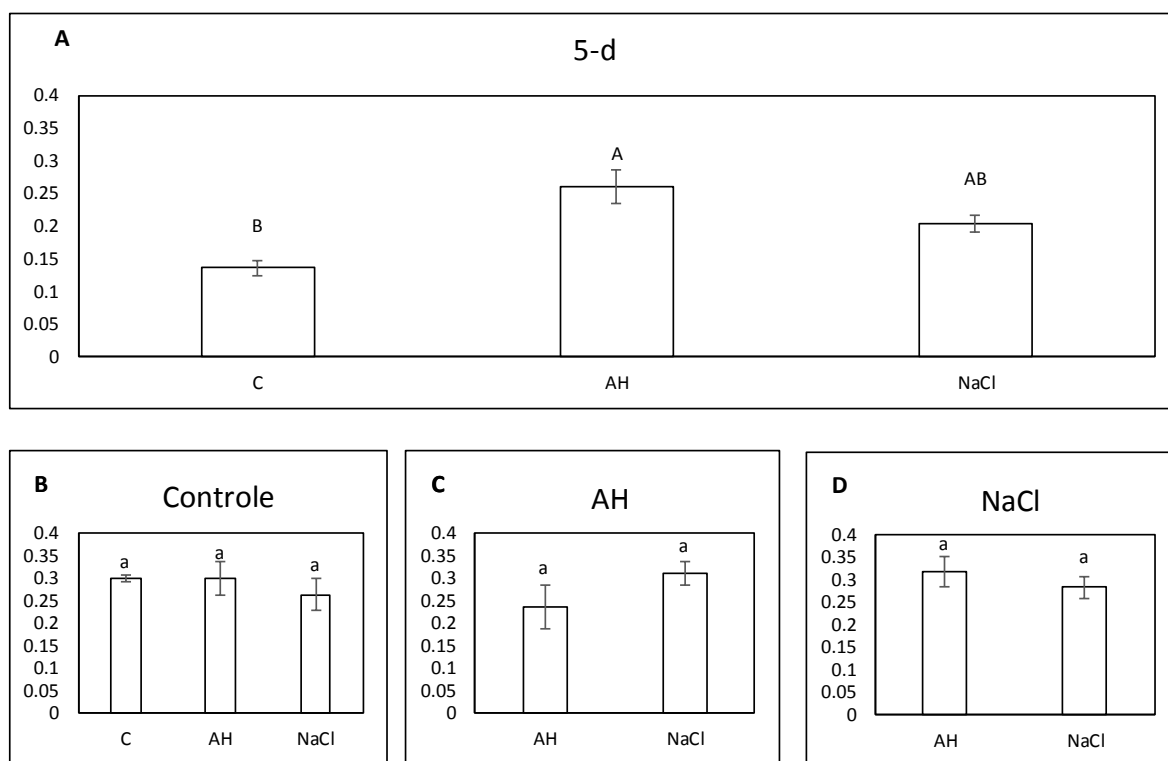


Figura 1A. A: Massa seca (g) da parte aérea de plântulas de milho 12 dias após a emergência previamente tratadas ou não (Controle) durante 5 dias com ácidos do tipo húmicos (AH, 3,5 mM C) ou cloreto de sódio (NaCl 60 mM). Após 5 dias as plântulas foram novamente submetidas aos tratamentos por 72 h. B: controle, sem tratamento prévio; C: Plântulas previamente tratadas com AH; D: plântulas previamente submetidas ao estresse com solução de NaCl. As barras representam o desvio padrão (SD) entorno da média e as letras diferentes representam diferença significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).

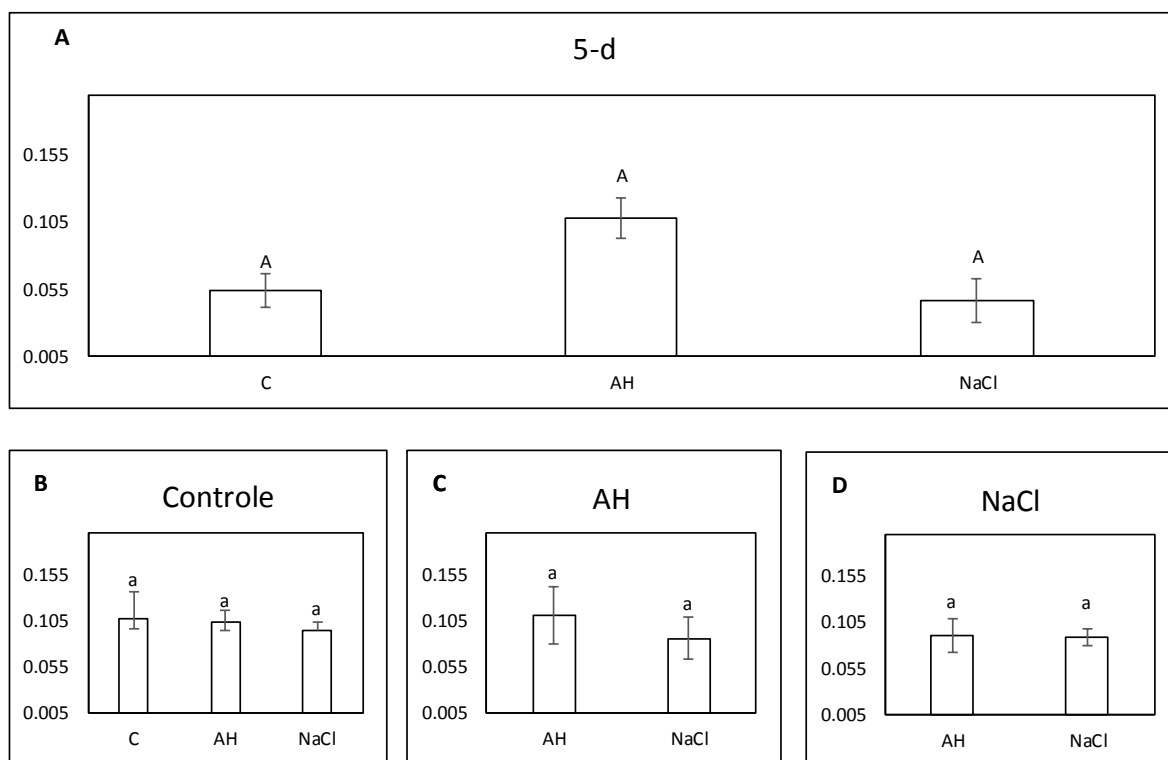


Figura 2A. A: Massa seca (g) das raízes de plântulas de milho 12 dias após a emergência previamente tratadas ou não (Controle) durante 5 dias com ácidos do tipo húmicos (AH, 3,5 mM C) ou cloreto de sódio (NaCl 60 mM). Após 5 dias as plântulas foram novamente submetidas aos tratamentos por 72 h. B: controle, sem tratamento prévio; C: Plântulas previamente tratadas com AH; D: plântulas previamente submetidas ao estresse com solução de NaCl. As barras representam o desvio padrão (SD) entorno da média e as letras diferentes representam diferença significativa pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Tabela 1A. Condutividade elétrica (CE: dS m^{-1}) das soluções de AH, NaCl e Controle (solução de Furlani 25% da concentração). Nos tratamentos com NaCl foram aplicados nos vasos 3x o volume do vaso (3L) de solução salina, para assegurar que a CE do percolado fosse semelhante a CE da solução.

| Trat. | Condutividade elétrica (dS m^{-1}) | |
|-----------------|--|-----------|
| | Solução | Percolado |
| | 5d | |
| Controle | 0.3123 | 0.1755 |
| AH | 0.4009 | 0.2144 |
| NaCl | 6.8 | 6.4 |
| 72h | | |
| Controle | 0.337 | 0.306 |
| AH | 0.388 | 0.353 |
| NaCl | 6.6 | 6.5 |

Tabela 2A. Conteúdo de água em raiz e parte aérea (g.g^{-1}). Plântulas de milho aos 12 dias após a emergência previamente tratadas ou não (controle) durante 5 dias com ácidos do tipo húmicos (AH concentração de 3,5 mM C) ou cloreto de sódio (NaCl 60 mM). Após cinco dias de tratamento as plântulas foram novamente submetidas aos tratamentos por 72 h de acordo com o esquema experimental mostrado no material e métodos (Figura 2). O conteúdo de água foi apresentado em médias seguidas pelo desvio padrão (SD) entorno da média.

| Trat. | Raiz | Parte aérea |
|-----------------|--------------------------|-------------|
| | g.g^{-1} | |
| | 5d | |
| Controle | 1.34 ± 0.06 | 1.33 ± 0.05 |
| AH | 1.91 ± 0.17 | 2.21 ± 0.09 |
| NaCl | 1.76 ± 0.07 | 1.87 ± 0.07 |
| | 5d + 72h Controle | |
| Controle | 2.65 ± 0.06 | 2.18 ± 0.14 |
| AH | 2.27 ± 0.12 | 2.12 ± 0.28 |
| NaCl | 2.43 ± 0.08 | 2.17 ± 0.15 |
| | 5d + 72h AH | |
| AH | 2.38 ± 0.18 | 1.62 ± 0.09 |
| NaCl | 1.46 ± 0.07 | 2.56 ± 0.24 |
| | 5d + 72h NaCl | |
| AH | 2.78 ± 0.10 | 2.77 ± 0.34 |
| NaCl | 2.68 ± 0.18 | 2.16 ± 0.18 |