



HARIANNA PAULA ALVES DE AZEVEDO

**ENRAIZAMENTO DE CAFÉ ARÁBICA EM SISTEMA
ORGÂNICO DE PRODUÇÃO**

LAVRAS - MG

2018

HARIANNA PAULA ALVES DE AZEVEDO

**ENRAIZAMENTO DE CAFÉ ARÁBICA EM SISTEMA ORGÂNICO DE
PRODUÇÃO**

**ROOTING OF ARABIC COFFEE IN AN ORGANIC PRODUCTION
SYSTEM**

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

Prof^a. Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares

Orientadora

Prof. Dr. Carlos Alberto Silva

Coorientador

LAVRAS-MG

2018

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

Azevedo, Harianna Paula Alves de.

Enraizamento de café arábica em sistema orgânico de
produção/ Harianna Paula Alves de Azevedo. - 2018.

69 p.

Orientador(a): Joyce Dória Rodrigues Soares.

Coorientador(a): Carlos Alberto Silva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Cafeicultura. 2. Agricultura orgânica. 3. Clonagem. I. Soares,
Joyce Dória Rodrigues. II. Silva, Carlos Alberto. III. Título.

HARIANNA PAULA ALVES DE AZEVEDO

**ENRAIZAMENTO DE CAFÉ ARÁBICA EM SISTEMA
ORGÂNICO DE PRODUÇÃO**

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

APROVADA em 27 de Abril de 2018

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho

EMBRAPA

Dr. Alex Mendonça de Carvalho

UNESP

Prof^a. Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares

Orientadora

LAVRAS-MG

2018

*Aos meus pais Ivone e Paulo por sempre acreditarem em mim,
e me mostrarem que com Deus nada é impossível.
À minha irmã Larissa por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, Nossa Senhora D'Ajuda e Beato Padre Victor por guiarem minhas decisões e colocar sempre em meu caminho pessoas especiais.

Ao Vô Juquinha, Vô Chico, e Vô Cecília, que mesmo não estando mais fisicamente comigo, deixaram tantos ensinamentos, e estão sempre olhando por mim.

À Vó Evanildes pelas orações e desejos que tudo desse certo pelo meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura por proporcionarem essa oportunidade única em minha vida, que fizeram com que eu me apaixonasse pela minha profissão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e seus docentes pelos conhecimentos passados durante o início da minha graduação.

À Professora Joyce, pela orientação passada durante esse tempo.

À secretária da Pós-graduação do DAG Marli dos Santos Túlio, pelo auxílio indispensável.

Ao Núcleo de Estudos em Melhoramento e Clonagem (NEMEC) pela imensa ajuda na realização deste trabalho.

Às meninas do Laboratório de Anatomia, por ajudaram desde o início na condução do trabalho, e por tornarem esse trabalho mais prazeroso e divertido.

À Professora Heloisa do setor de sementes, pela ajuda na condução deste trabalho.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir o caminho que eu escolhi.

Ao Rafael e Fernando pela irmandade e amizade incondicional.

Aos meus amigos do EJC, que estão sempre me apoiando e orando por mim.

Aos meus amigos de Três Pontas e Viçosa que sempre torceram por mim, mesmo distante.

À Jussara pela paciência e carinho comigo.

À Nicole, Isadora, Mariana, Ana, Nagla, Duda, Lídia e Bruna por estarem sempre juntas comigo em todos os momentos.

Aos amigos do InovaCafé por terem feito meus dias de trabalho e lazer mais felizes.

Aos membros da banca pelas valiosas contribuições na defesa.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Apesar do grande aumento da procura por produtos sustentáveis, ainda são poucas as pesquisas em relação à produção de café orgânico. As lavouras cafeeiras em sua totalidade são formadas a partir de mudas. A propagação vegetativa tem sido muito estudada para o café arábica, uma vez que ela mantém as características genéticas da planta matriz e proporciona uma lavoura uniforme. Diante disso, o objetivo deste trabalho é avaliar o extrato de tiririca e diferentes concentrações e tipos de substâncias húmicas como indutores de enraizamento e crescimento de raízes, sendo uma alternativa à utilização de AIB no enraizamento, produto proibido pela Lei de Orgânicos. No primeiro experimento foi feito o teste de germinação com sementes de café arábica da cultivar Topázio MG1190, com as dosagens de 0, 5, 10, 25, 50 mg/dm³ de ácido húmico e fúlvico, foi avaliado as porcentagens de germinação aos 15 dias; aos 30 dias além da germinação foi medido o comprimento radicular; e aos 45 dias, a avaliação da atividade das enzimas Catalase, Superóxido dismutase, Álcool desidrogenase, Esterase e H⁺ATPase. No segundo experimento coletou-se brotações de lavoura de café arábica, onde cortou-se as estacas, contendo pelo menos duas gemas. O experimento foi um fatorial triplo, 2 (sem ou com extrato de tiririca) x 2 (ácido húmico ou fúlvico) x 4 (0, 10, 25 e 50 mg/dm³). No segundo foram avaliados dados vegetativos: altura de broto (cm), sobrevivência, folhas remanescentes, pares de folhas, vigor e número de brotos, o comprimento, a área, o volume, o diâmetro das raízes, a massa fresca e seca do sistema radicular. Também foi quantificado a atividade das enzimas H⁺ATPase, catalase, superóxido dismutase, álcool desidrogenase e esterase. As substâncias húmicas não apresentam benefícios agrônômicos no estágio de plântula, para a cultura do café, não sendo recomendadas como um possível tratamento de sementes nestas condições. Nas estacas, na parte aérea a melhor dose de substâncias húmicas foi a 0 mg/dm³. Na parte radicular houve benefícios com a dose de 10 mg/dm³ de ácido húmico na presença do extrato de tiririca. Os menores estresses oxidativos foram vistos na dose de 10 mg/dm³ de ácido húmico ou fúlvico, independente da utilização do extrato. Porém, diante disto, ainda são necessários análises e estudos mais profundos acerca da utilização do extrato de tiririca e das substâncias húmicas na cultura do café arábica.

Palavras chave: Substâncias húmicas, *Coffea arabica* L., *Cyperus* spp., produção de mudas, sementes, estacas.

ABSTRACT

Despite the large increase in demand for sustainable products, there is still little research on organic coffee production. The coffee plantations in their entirety are formed from seedlings. Vegetative propagation has been extensively studied for arabica coffee, since it maintains the genetic characteristics of the matrix plant, and provides a uniform crop. Therefore, the objective of this work is to evaluate the extract of *Triceratum* concentrations and types of humic substances as inducers of rooting and root growth, being an alternative to the use of IBA in rooting, a product prohibited by Organic Law. In the first experiment, the germination test was carried out with arabica coffee seeds of Topázio MG1190 cultivar, with the dosages of 0, 5, 10, 25, 50, 50 mg/dm³ of humic and fulvic acid, the percentages of germination were evaluated at 15 days; at 30 days after germination the root length was measured; and at 45 days, the evaluation of the activity of the enzymes Catalase, Superoxide dismutase, Alcohol dehydrogenase, Esterase and H⁺ATPase. In the second experiment, sprouts were harvested from arabica coffee, where the cuttings were cut, containing at least two buds. The experiment was a triple factorial, 2 (without or with extract of tiririca) x 2 (humic or fulvic acid) x 4 (0, 10, 25 and 50 mg/dm³). In the second, vegetative data, shoot height (cm), survival, remaining leaves, leaf pairs, vigor and number of shoots were evaluated. The length, area, volume, root diameter, fresh and dry mass of the root system. The activity of the enzymes H⁺ATPase, catalase, superoxide dismutase, alcohol dehydrogenase and esterase was also quantified. Humic substances do not present agronomic benefits at the seedling stage for coffee cultivation and are not recommended as a possible seed treatment under these conditions. In stakes, in the aerial part the best dose of humic substances was 0 mg/dm³. In the root part there were benefits with the dose of 10 mg/dm³ of humic acid in the presence of the extract of tarrya. The lowest oxidative stresses were observed at a dose of 10 mg/dm³ of humic or fulvic acid, regardless of the use of the extract. However, in the light of this, further analysis and studies on the use of tere extract and humic substances in the Arabica coffee crop are still required.

Key words: Humic substances, *Coffea arabica* L., *Cyperus* spp., Production of seedlings, seeds, cuttings.

SUMÁRIO

1.	PRIMEIRA PARTE	10
1.1	INTRODUÇÃO	11
	REFERÊNCIAS	16
2.	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	19
2.1	ARTIGO 1 – ANÁLISE VEGETATIVA E ENZIMÁTICA DOS ESTÁGIOS INICIAIS DE <i>COFFEA ARABICA</i> L. SUBMETIDAS AO TRATAMENTO DAS SEMENTES COM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	20
	Resumo	20
	Abstract	20
2.1.1	Introdução	21
2.1.2	Material e métodos	23
2.1.3	Resultados e discussão	26
2.1.4	Conclusão	35
2.1.5	Agradecimentos	35
	Referências Bibliográficas	36
2.2	ARTIGO 2 – BIOESTIMULANTES PROMOTORES DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DE <i>Coffea arabica</i> L.	41
	Resumo	41
	Abstract	42
2.2.1	Introdução	42
2.2.2	Material e métodos	44
2.2.3	Resultados e discussão	47
2.2.4	Conclusões	63
2.2.5	Agradecimentos	63
	Referências Bibliográficas	64
3.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	69

1. PRIMEIRA PARTE

1.1 INTRODUÇÃO

A cultura do café é de grande importância para o agronegócio brasileiro, sendo o Brasil o maior produtor e exportador, e o segundo maior consumidor de café no mundo. Dentre as espécies comerciais, cerca de 80% corresponde à *Coffea arabica*, cujo centro de origem são as terras altas da Etiópia, é uma cultura adaptada à zona tropical e subtropical (CHARRIER, 1978).

Com o consumo em franca ascensão, não só no Brasil como também no mundo, é necessário que se aumente a produtividade, para isso tem se usado insumos com moléculas sintéticas, estas podem ser tóxicas ao ser humano e principalmente ao meio ambiente, assim a linha de orgânicos tem sido grande alternativa para os consumidores.

O governo brasileiro possui uma lei que regulamenta a produção de orgânicos, em que se considera um sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2018).

O consumo do café orgânico está em constante crescimento, os consumidores estão mais exigentes quando se diz respeito à saúde. Alguns países, como os que participam da União Europeia, Japão, Estados Unidos, entre outros, estão mais interessados em importar produtos orgânicos, principalmente café (ACOB, 2017) e na maioria das vezes eles pagam maiores valores por esses produtos. Porém, a procura tem sido muito maior que a produção de café orgânico para atender o mercado.

A safra esperada de café orgânico para 2017 era de 80 a 90 mil sacas de orgânico certificado, acrescidas de mais cerca de 20 mil sacas em transição para orgânico. No âmbito mundial, nos últimos anos a área cultivada com café orgânico praticamente quadruplicou de 2004 a 2014, saltando de 200 mil hectares para quase 800 mil hectares. A tendência para os próximos anos é de ainda mais crescimento. No Brasil, a estimativa atual é que a área cultivada com café orgânico seja de 5 a 6 mil hectares (ACOB, 2017). Pouco em relação à totalidade, de 2,21 milhões de hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2017), porém tem tendências a aumentar consideravelmente se levarmos em conta o rumo que o mercado está tomando.

Quanto ao manejo da lavoura orgânica, tem se feito uso de algumas opções para suprir as necessidades nutricionais do cafeeiro, que exporta, através dos frutos, maiores quantidades de nitrogênio e potássio (MALAVOLTA, 1993). Porém grande quantidade do que é exportado pode voltar ao solo por meio das cascas que sobram após o beneficiamento, representando uma adubação importante no ciclo da cultura.

Utiliza-se em larga escala a adubação com esterco bovino, avícola, entre outros, que são mais conhecidos pelos produtores. A utilização de alguns compostos orgânicos oriundos de compostagens controladas também vem crescendo. Araújo *et al.* (2008) utilizaram de composto orgânico e biofertilizante durante a fase de formação do cafeeiro e obtiveram resultados consideravelmente bons quanto ao uso destes.

Boas condições físicas e químicas do solo são essenciais para o cultivo de qualquer planta. Alguns autores têm mostrado que no cultivo orgânico o solo apresenta melhor qualidades que os solos de cultivos convencionais. Lopes *et al.* (2012), ao analisarem sistemas alternativos à produção intensiva em agroquímicos, mostraram que a produtividade do sistema convencional é inferior ao organo-mineral e ao orgânico, isso se deve ao incremento nestas condições do solo. Ao aumentar a matéria orgânica no solo, há melhorias no pH e nos valores de cálcio, magnésio, potássio, fósforo, zinco, boro, capacidade de troca catiônica do solo, soma de bases, saturação por bases e diminuição do Al trocável (THEODORO *et al.*, 2003).

As condições biológicas do solo também são imprescindíveis para os cultivos. Os macro e microrganismos condicionam o solo decompondo os restos culturais e outras fontes, eles promovem uma melhor aeração do solo, melhorando as condições para reter água no solo, e conseqüente melhora no aproveitamento dos nutrientes. Guimarães *et al.* (2015), estudando a fauna invertebrada em cafeeiro orgânico, notaram que a densidade e a riqueza destes foram influenciadas pelos sistemas de manejo do solo, sendo melhores em manejos agroecológicos.

Os restos deixados no solo, ao serem decompostos, formam a fração orgânica do solo. A fração orgânica, dentre alguns compostos, possui as substâncias húmicas, que são moléculas complexas, com elevado peso molecular, compostas por huminas, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos (GUERRA *et al.*, 2008). Elas influenciam as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, sendo consideradas as moléculas orgânicas naturais mais abundantes na Terra (SIMPSON *et al.*, 2002) e os principais componentes de matéria orgânica do solo (NARDI *et al.*, 2002).

No solo, as substâncias húmicas são importantes no controle da disponibilidade de nutrientes, na troca de gases entre o solo e a atmosfera, e atuam como moléculas quelatizantes

de produtos químicos tóxicos e metais pesados (PICCOLO E SPITELLER, 2003). E ainda, elas atuam na fisiologia das plantas e na composição e função dos microrganismos da rizosfera (VARANINI E PINTON, 2001). Entretanto, a atividade das substâncias húmicas está relacionada às suas características estruturais (BERBARA E GARCÍA, 2014). Kelleher e Simpson (2006) descreveram que algumas substâncias húmicas extraídas dos solos continham proteínas, carboidratos, biopolímeros alifáticos e lignina, que representam as principais classes de compostos em plantas e microrganismos.

García *et al.* (2012) estudaram ácido húmico extraído de vermicomposto avaliando quanto aos efeitos em plantas cultivadas em condições de deficiência hídrica. A promoção do crescimento de plântulas tratadas com ácido húmico começou aos 10 dias após a germinação, as plântulas aumentaram os pesos secos das raízes em comparação com os controles nas condições de estresse hídrico. Silva Filho e Silva (2002) demonstraram que as substâncias húmicas influenciaram no aumento e na velocidade das taxas de germinação e de crescimento precoce de mudas de tomate, cultivadas em solução nutritiva, e que os ácidos fúlvicos foram mais estimulantes que a fração húmica.

Além de aumentar o crescimento das raízes em estádios iniciais de desenvolvimento de plantas, as aplicações de ácidos húmicos também têm sido relatadas como aumentando o rendimento ou a qualidade da cultura. Em ensaios com quiabo (*Abelmoschus esculentus*) utilizando três taxas crescentes de ácido húmico, houve aumentos significativos de frutos por planta (KIRN *et al.*, 2010). Com uvas, uma preparação comercial de ácidos húmicos aumentou a qualidade das uvas para vinho, aumentando o teor de nitrogênio do mosto de uva, o que resultou num maior índice de degustação (MORARD *et al.*, 2011).

As substâncias húmicas melhoram a estrutura e a fertilidade do solo, bem como exercem efeitos benéficos na fisiologia das plantas afetando a absorção de nutrientes e a arquitetura radicular (TREVISAN *et al.*, 2010). As frações de ácidos húmicos interagem diretamente com as estruturas radiculares. A maioria das substâncias húmicas liga-se firmemente às paredes das células vegetais e pode ser absorvida pelas raízes, onde algumas delas podem transferir para a parte aérea, podendo desempenhar funções diretas no metabolismo das plantas (NARDI *et al.*, 2009).

Os ácidos húmicos podem ter efeitos como as auxinas no metabolismo das plantas. Por exemplo, o desenvolvimento de raízes laterais é aumentado quando tratado com substâncias húmicas, isto está relacionado com os mecanismos de divisão celular que são regulados pelas auxinas (TREVISAN *et al.*, 2010).

Há relatos da promoção de crescimento radicular das plantas quando tratadas com ácido fúlvico. Por exemplo, aumento do número de radículas iniciais em secções de hipocótilo de feijão comum, 6 dias após o tratamento com ácido fúlvico (POAPST E SCHNITZER 1971). Em outro estudo, o ácido fúlvico aumentou o número e o comprimento das raízes laterais de *Arabidopsis* e tomate (DOBBSS *et al.*, 2007).

Acima do solo também foram observados aumentos no crescimento das plantas, incluindo o aumento do crescimento de brotos de tomateiro (LULAKIS E PETSAS, 1995), o aumento do peso seco de brotos de trigo e milho (ANJUM *et al.*, 2011, DUNSTONE *et al.* 1988), e mais flores por planta de pepino (RAUTHAN E SCHNITZER, 1981).

O café arábica é uma cultura, quase que em sua totalidade, propagada via sementes para formação de mudas. A germinação de sementes de café é demorada e isto ainda não se sabe ao certo o porquê. Acredita-se que seja devido ao pergaminho que funciona como uma barreira física para a embebição das sementes, porém pode ser por fatores hormonais e até ambientais. Assim, para saber se as sementes que vão ser plantadas estão viáveis e aptas a germinar e formar plantas normais, são realizados testes em laboratório de germinação, que simulam as condições de campo favoráveis para que as sementes possam produzir uma planta normal (BRASIL, 2009), podendo assim utilizar dos melhores lotes de sementes para o plantio.

Atualmente tem crescido a utilização de mudas propagadas vegetativamente. Elas possuem algumas vantagens, como por não possuírem raiz pivotante e não ter problemas com pião torto, são capazes de produzir plantas geneticamente iguais às plantas matriz (BRAGANÇA *et al.*, 1995; PAULINO *et al.*, 1987). A propagação via estacas no café arábica ainda está em estudo devido ao fato de se obter diferentes respostas para o enraizamento de acordo com as cultivares (CARVALHO, 2005).

O enraizamento da maioria das espécies cultivadas é regulado principalmente pela concentração de auxinas presentes no organismo da plantas. E no café não é diferente, são de vital importância neste processo, sendo mais utilizado o ácido indol butírico para indução de raízes na propagação vegetativa por estacas. A utilização de auxinas sintéticas, como o AIA e o AIB, promove a iniciação das raízes, e além de acelerar o processo de formação ainda garante uma maior porcentagem de estacas enraizadas e mais uniformidade no enraizamento (FACHINELLO *et al.*, 1995).

A tiririca, como são popularmente conhecidas as plantas do gênero *Cyperus*, é a principal planta daninha em solos cultivados de regiões tropicais. É considerada a mais importante do mundo, devido à sua larga distribuição, capacidade de competição e

agressividade, bem como à dificuldade de controle e erradicação (DURIGAN *et al.*, 2005; KISSMANN, 1997). Ao se propagarem via sementes e por meio dos tubérculos encontrados nas raízes, elas se tornam ainda mais difíceis para o controle e mais fáceis para a disseminação para áreas onde ainda não existem.

Alguns autores afirmam que há nos tubérculos de tiririca maiores quantidades de AIA que comparado a outras espécies herbáceas. De acordo com Lorenzi (2000), a tiririca apresenta nível elevado de AIB hormônio em toda planta, mas mais especificamente nos tubérculos. Os extratos de folhas e de tubérculos de tiririca apresentam diversos compostos fenólicos e são conhecidos também por promover o enraizamento de estacas (ALVES NETO; CRUZ-SILVA, 2008; BERGO; MENDES, 2000; FANTI, 2008).

Um dos fatores mais importantes na promoção do enraizamento é a concentração do regulador (ALMEIDA *et al.*, 2007; TOFANELLI *et al.*, 2003), uma vez que as auxinas são capazes de influenciar processos no sistema radicular e na parte aérea de acordo com a sua concentração. É de suma importância a utilização correta das concentrações de fitoreguladores a serem aplicados na base das estacas, sendo que a concentração ideal varia com a espécie em que se está trabalhando.

Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: 1) analisar as reações vegetativas e enzimáticas nos processos iniciais da cultura do café arábica tratadas com diferentes substâncias húmicas em diferentes concentrações. 2) Avaliar o efeito do extrato de tiririca, diferentes dosagens e tipos de substâncias húmicas nas estacas de café arábica da cultivar Topázio MG 1190, e seus efeitos no sistema radicular, no desenvolvimento vegetativo, na enzima H^+ ATPase ligada à absorção de nutrientes e enzimas ligadas ao estresse oxidativo, na tentativa de uma alternativa à utilização de AIB sintético no enraizamento de estacas, e assim, produzir mudas clonais aptas para formação de lavouras orgânicas.

REFERÊNCIAS

ACOB. Associação de Cafés Orgânicos e Sustentáveis do Brasil: Saiba mais. Disponível em: <<http://www.cafeorganico brasil.org>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

ALMEIDA, G. R. R. *et al.* Resposta a estresse hídrico e comportamento em condições de campo de cafeeiros propagados por embriogênese somática. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil, Águas de Lindóia. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2007.

ALVES NETO, A. J.; CRUZ-SILVA, C. T. A. **Efeito de diferentes concentrações de extratos aquosos de tiririca (*Cyperus rotundus* L.) sobre o enraizamento de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. Monografia (Graduação em Agronomia) - Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, 2008.

ANJUM S. A. *et al.* *Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions*. **J Agron Crop Sci**, v. 197, p. 409–417, 2011.

ARAÚJO, J. B. S. *et al.* Composto orgânico e biofertilizante supermagro na formação de cafeeiros. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 115-123, jul./dez. 2008.

BERBARA R. L. L., GARCÍA A. C. *Humic substances and plant defense metabolism*. In: Ahmad P, Wani MR (eds) *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*. **Springer Science+Business Media**, New York, v. 1, p 297– 319, 2014.

BERGO, C. L.; MENDES, A. N. G. Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) por meio do enraizamento de estacas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.2, p. 392 – 398, abr.-jun., 2000.

BRAGANÇA, S. M. *et al.* Formação de mudas. In: _____. **Manual técnico para a cultura do café no Estado do Espírito Santo**. Vitória: Secretaria de Estado de Agricultura, p. 19-28, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, p. 399, 2009.

CARVALHO, M. **Comportamento em pós plantio de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) propagados vegetativamente**. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, 2005.

CHARRIER, A. *La structure génétique des caféiers spontanés de la region Malgashe (*Mascarocoffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*)*. **Memories ORSTOM**, Paris, n. 87, p. 1-221, 1978.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Levantamentos de Safra – 1º Levantamento da Safra Café - Safra 2017**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>>. Acesso em: 30 de mar. de 2017.

DOBBSS L. B., MEDICI L. O., PERES L. E. P. *et al.* *Changes in root development of Arabidopsis promoted by organic matter from oxisol*. **Ann Appl Biol** v. 151, p 199–211, 2007.

DUNSTONE R. L. *et al.* Variable responses of stomatal conductance, growth, and yield to fulvic acid applications to wheat. *Aust J Agric Res* v. 39, p. 547–553, 1988.

DURIGAN, J. C. *et al.* Estádios de desenvolvimento e vias de contato e absorção dos herbicidas na inviabilização de tubérculos de *Cyperus rotundus*. **Planta Daninha**, Londrina, v. 23, p. 621-626, 2005.

FACHINELLO, J. C. *et al.* Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. 2. ed. **Pelotas: UFEPEL**, 178 p., 1995.

FANTI, F. P. **Aplicação de extratos de folhas e de tubérculos de *Cyperus rotundus* L. (*Cyperaceae*) e de auxinas sintéticas na estaquia caulinar de *Duranta repens* L. (*Verbenaceae*)**. 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

GARCÍA A. C *et al.* Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. *Afr J Biotechnol* v. 11, p. 3125–3134, 2012.

GUERRA, J.C.M *et al.* Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G. de A. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2.ed. Porto Alegre: Metrópole, p.19-26, 2008.

GUIMARÃES, N. de F. *et al.* Influência de sistemas de produção de café orgânico arborizado sobre a diversidade da fauna invertebrada epigéica. *Coffee Science*, Lavras, v. 10, n. 3, p. 280 - 288, jul./set. 2015.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2.ed. São Paulo: **BASF**, Tomo I. 825 p., 1997.

KELLEHER, B. P., SIMPSON, A. J. Humic substances in soils: are they really chemically distinct? *Environ Sci Technol* v. 40, p. 4605–4611, 2006.

KIRN, A. *et al.* Using indigenous humic acid from lignite to increase growth and yield of okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Soil Environ* 29:187– 191, 2010.

LOPES, P. R. *et al.* Produção de café agroecológico no sul de Minas Gerais: sistemas alternativos à produção intensiva em agroquímicos. **Rev. Bras. de Agroecologia**. v. 7(1), p. 25- 38, 2012.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.

LULAKIS, M. D.; PETSAS, S. I. Effect of humic substances from vine-canecan mature compost on tomato seedling growth. *Bioresour Technol* v. 54, p. 179–182, 1995.

MALAVOLTA, E. Nutrição mineral e adubação do cafeeiro: colheitas econômicas máximas. **Agronômica Ceres**, São Paulo, p.210, 1993.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Café: Saiba mais. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>>. Acesso em: 30 mar. 2018.
- MORARD, P. *et al.* Direct effects of humic-like substance on growth, water, and mineral nutrition of various species. *J of Plant Nutr* v. 34, p. 46–59, 2011.
- NARDI, S. *et al.* Biological activities of humic substances. In: Senesi N, Xing B, Huang PM (eds) *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. Wiley, Hoboken, p 305–339, 2009.
- NARDI, S. *et al.* Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol Biochem*, v. 34, p. 1527–1536. 2002.
- PAULINO, A. J. *et al.* Cultura do café conillon: instruções técnicas sobre a cultura do café no Brasil. Rio de Janeiro: MIC- IBC-DIPRO, 43 p, 1987.
- PICCOLO, A.; SPITELLER, M. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Anal Bioanal Chem* v. 377, p. 1047–1059. 2003.
- POAPST, P. A.; SCHNITZER, M. Fulvic acid and adventitious root formation. *Soil Biol Biochem* v. 3, p. 215–219, 1971.
- RAUTHAN, B. S.; SCHNITZER, M. Effects of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Plant Soil* v. 63, p. 491–495, 1981.
- SILVA FILHO, A.V. da; SILVA, M. I. V. da. Importância das substâncias húmicas para a agricultura. *Anais do simpósio nacional sobre as culturas do inhame e do taro*. João Pessoa, v. 2, 2002.
- SIMPSON, A. J. *et al.* Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* vv. 89, p. 84– 88, 2002.
- THEODORO, V. C. A. *et al.* Avaliação do estado nutricional de agroecossistemas de café orgânico no estado de Minas Gerais. *Ciênc. agrotec.*, Lavras. v.27, n.6, p.1222-1230, nov./dez., 2003.
- TREVISAN, S. *et al.* Humic substances biological activity at the plant-soil interface. *Plant Signaling Behav*, v. 5, p. 635–643, 2010.
- TOFANELLI, M. B. D. *et al.* Método de aplicação de ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de pessegueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, p. 363-364, 2003.
- VARANINI Z., PINTON R. Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) *The rhizosphere*. Marcel Dekker, Basel, p. 141 –158, 2001.

2. SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

*Artigos nas normas da Revista *Coffee Science*

2.1 ARTIGO 1 – ANÁLISE VEGETATIVA E ENZIMÁTICA DOS ESTÁGIOS INICIAIS DE *Coffea arabica* L. SUBMETIDAS AO TRATAMENTO DAS SEMENTES COM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Resumo

O café arábica é uma cultura perene e quase a totalidade propagada por sementes, que devem ser sadias e aptas a formar plantas normais. Além disso, o substrato para a formação das mudas também é de grande importância. O objetivo deste trabalho foi analisar as reações vegetativas e enzimáticas nos processos iniciais da cultura do café arábica tratadas com diferentes substâncias húmicas em diferentes concentrações. Foi feito o teste de germinação com sementes de café arábica da cultivar Topázio MG1190, com as dosagens de 0, 5, 10, 25, 50 mg/dm³ de substâncias húmicas, foi avaliado as porcentagens de germinação aos 15 dias, aos 30 dias além da germinação foi medido o comprimento radicular, aos 45 foi retirado as plântulas e armazenados a -80°C para posterior avaliação da atividade das enzimas Catalase, Superóxido dismutase, Álcool desidrogenase, Esterase e H⁺ATPase. Os resultados não foram satisfatórios, as germinações não apresentaram diferenças para a utilização de substâncias húmicas, o comprimento da raiz foi maior na dose de 0 mg/dm³, embora o H⁺ATPase tenha tido um resultado positivo para a aplicação, as enzimas catalase, superóxido dismutase, álcool desidrogenase e esterase foram melhores também na menor dose. As substâncias húmicas não apresentam benefícios agrônômicos no estágio de plântula, para a cultura do café, não sendo recomendadas como um possível tratamento de sementes nestas condições. Palavras-chave: ácido fúlvico, ácido húmico, cafeeiro, formação de mudas, sementes.

Abstract

Arabica coffee is a perennial crop and almost all propagated by seeds, which must be healthy and able to form normal plants. In addition, the substrate for the formation of seedlings is also of great importance. The objective of this work was to analyze the vegetative and enzymatic reactions in the initial processes of the Arabica coffee culture treated with different humic substances in different concentrations. It was made the germination test with Arabica coffee seeds of the cultivar Topaz MG1190, with doses of

0, 5, 10, 25, 50 mg / dm³ of humic substances was assessed germination rates at 15 days, 30 days apart germination root length was measured at 45 seedlings was removed and stored at -80°C for subsequent evaluation of the activity of catalase, superoxide dismutase, alcohol dehydrogenase, esterase and H⁺ -ATPase. The results were not satisfactory, the germination showed no differences to the use of humic substances, root length was higher in the dose of 0 mg / dm³ although the H⁺ -ATPase had a positive result for the application, the enzymes catalase, superoxide dismutase, alcohol dehydrogenase and esterase were also better at the lower dose. Humic substances do not present agronomic benefits at the seedling stage for coffee cultivation and are not recommended as a possible seed treatment under these conditions.

Key words: fulvic acid, humic acid, coffee, formation of seedlings, seeds.

2.1.1 Introdução

O café é um produto de grande importância econômico-social para o Brasil e tem expressiva participação no agronegócio mundial. A forma mais utilizada para a propagação do cafeeiro é por meio de mudas formadas a partir de sementes. Portanto, a formação de mudas de café livres de doenças e capazes de resistir ao transplante é fundamental para se obter um *stand* homogêneo, com elevada produtividade e longevidade produtiva (COGO, *et al.* 2012). Vários fatores podem determinar o desenvolvimento, a qualidade e os custos para a produção de mudas; dentre esses destaca-se para o tipo de substrato utilizado na formação das mudas (OLIVEIRA; MIGLIORANZA, 2015).

As mudas de café são normalmente transplantadas de 5 a 6 meses após a germinação das sementes, com 5 a 7 pares de folhas (BALIZA *et al.* 2013), sendo relevante a utilização de substratos que atendam a demanda de nutrientes pela planta. A escolha do substrato é fundamental, pois ele afeta a estrutura do solo, a capacidade de retenção e translocação da água e de nutrientes, além de aumentar a capacidade de troca de cátions, auxiliar no arejamento e fornecer de forma lenta e gradual os nutrientes às plantas (FERNANDES *et al.*, 2013). Estas características irão influenciar de forma direta ou indireta na fertilidade do local de plantio.

O substrato empregado na produção de mudas de café é responsável por 38% do custo de produção, portanto uma possível utilização de materiais orgânicos tende a diminuir esse custo, favorecendo economicamente os viveiristas.

Alguns trabalhos já foram conduzidos com diferentes fontes de matéria orgânica na produção de mudas de café em tubetes. Materiais orgânicos como a vermiculita, cama aviária, esterco bovino e húmus de minhoca proporcionam benefícios na sua produção, dependendo da dose no substrato (ALMEIDA *et al.*, 2011).

Os benefícios proporcionados ao solo pela inclusão da matéria orgânica mostram, cada vez mais, a importância de um dos seus constituintes: os denominados ácidos orgânicos, ou seja os ácidos húmicos e fúlvicos. A análise da literatura tem evidenciado que a influência de os referidos ácidos nas propriedades físicas, químicas e biológicas, tem acarretado maior desenvolvimento das plantas, incluindo-se parte aérea e sistema radicular. Quando o enraizamento de um vegetal é melhorado o aproveitamento da água e de nutrientes, com certeza é otimizado. Sabe-se que na instalação das lavouras, principalmente de perenes, as mudas têm um papel decisivo no sucesso do empreendimento: quando vigorosas, com raízes fortes e parte aérea bem formada o início é promissor.

Pereira *et al.* (2017) demonstraram os benefícios de diferentes substratos orgânicos na formação de mudas de café em tubetes. É de responsabilidade da matéria orgânica alterações químicas no substrato, como o aumento da capacidade de troca de cátions (CTC), bem como alterações físicas, como o aumento da porosidade e consequente aumento na retenção de água (FERNANDES *et al.*, 2013).

A fração orgânica do solo possui milhões de microrganismos, que são responsáveis por decompor os restos animais e vegetais deixados no solo. Esta decomposição dá origem à matéria orgânica no solo, sendo ela, na maior parte, composta pelas substâncias húmicas (NARDI *et al.*, 2002). As substâncias húmicas são moléculas complexas, com alto peso molecular, e se dividem em huminas, ácidos húmicos e ácidos fúlvicos (GUERRA *et al.*, 2008). Elas são consideradas as moléculas orgânicas mais abundantes no planeta, e são capazes de influenciar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (SIMPSON *et al.*, 2002).

Segundo Primo *et al.* (2011), a comprovação da matéria orgânica do solo (MOS) em aumentar a produtividade dos solos tem incentivado bastante, principalmente nas últimas três décadas, a pesquisa com a utilização de substâncias húmicas (SHs), buscando o melhor entendimento da sua dinâmica. Esse avanço das pesquisas se deve ao surgimento

de novas metodologias e equipamentos, porém, em algumas regiões do país os estudos são limitados, devido à utilização de técnicas complexas e equipamentos de alto custo de aquisição e manutenção. Vários experimentos com a utilização de SHs na produção agrícola têm sido desenvolvidos proporcionando o maior desenvolvimento das culturas. Os resultados obtidos são variáveis e dependem, além da espécie testada, das substâncias húmicas utilizadas, concentração, grau de purificação do material e das condições em que foram realizados os experimentos (SILVA *et al.*, 1999).

Além dos efeitos que exercem no solo, as substâncias húmicas atuam na fisiologia das plantas (VARANINI E PINTON, 2001). Entretanto, as suas funções no metabolismo das plantas estão relacionadas às suas características estruturais (BERBARA E GARCÍA, 2014), uma vez que os ácidos húmicos são de elevado peso molecular enquanto os ácidos fúlvicos são de baixo (NARDI *et al.*, 2009). Além disso, as funções também podem variar de acordo com o material orgânico do qual foi originado e o tempo que levou para se transformar (BERBARA E GARCÍA, 2014).

Diante do exposto, observa-se que o crescente número de estudos relatam bons resultados quanto ao efeito das substâncias húmicas na fisiologia das plantas, assim atestando a confiabilidade para usá-las, e passarem a ser consideradas insumo na agricultura. Sabe-se que o efeito das substâncias húmicas na cultura do café ainda foi pouco estudada, porém a tendência está sendo aumentar estes estudos, devido ao fato do grande aumento na procura por produtos que sejam produzidos de maneira mais sustentável. Dessa forma, as substâncias húmicas podem ser grandes aliadas para o aumento da produtividade em cultivos orgânicos.

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi analisar as reações vegetativas e enzimáticas nos processos iniciais da cultura do café arábica tratadas com diferentes substâncias húmicas em diferentes concentrações.

2.1.2 Material e métodos

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Lavras, localizada no município de Lavras-MG, no Departamento de Agricultura, no Laboratório de análise de sementes localizado no Setor de Sementes.

Foram utilizadas sementes de café da cultivar Topázio MG1190. Retirou-se o pergaminho das mesmas. Foram utilizados 3 papéis de filtro por repetição e 25 sementes em cada repetição. Cada tratamento possuiu 4 repetições. Colocou-se as sementes para

germinar entre duas folhas de papel, embrulhados em forma de rolos e depois colocados no germinador em posição vertical, a 30°C (BRASIL, 2009).

As substâncias húmicas foram colocadas no papel via água, na concentração de 0, 5, 10, 25 e 50 mg/dm³ de ácido fúlvico (AF) e ácido húmico (AH). Os papéis são pesados e a água a ser adicionada ao papel é 3x seu peso.

Foram realizadas 3 avaliações, sendo a primeira a 15 dias após a semeadura, fazendo a contagem das sementes germinadas e troca de papel. A segunda avaliação foi realizada 30 dias após a semeadura, onde além da germinação, mediu o comprimento da raiz (cm), utilizando uma parcela de 10 plântulas por repetição. A última avaliação foi realizada aos 45 dias, onde as plântulas foram retiradas para quantificar as atividades das enzimas Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Álcool desidrogenase (ADH), Esterase (EST) e H⁺ ATPase.

As plântulas do café arábica foram maceradas na presença de polivinilpirrolidona (PVP) e nitrogênio líquido. Em seguida, foram tomadas amostras de 100 mg para análise de cada enzima, acondicionadas em microtubos, à temperatura de -86°C.

Para a análise da CAT foi utilizado o meio de reação composto pelo tampão de extração fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), água e H₂O₂ 250 mM, incubado a 30 °C, em que foi monitorado o consumo do peróxido de hidrogênio (H₂O₂; MC HALE, 1987). A CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, com leitura realizada durante três minutos anotando o decréscimo da absorbâncias de 15 em 15 segundos.

Para a SOD utilizou meio de reação composto pelo tampão de extração fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 70 mM, EDTA 10 µM, água, NBT 1 mM e riboflavina 0,2 mM. A cubeta com o meio de reação e a amostra foram iluminados, por 7 minutos e para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado e branco foi mantido no escuro. A SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). As leituras foram realizadas a 560 nm, considerando que uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio (GIANNOPOLITIS *et al.*, 1977).

Para a ADH foram adicionados 250 µL de tampão de extração (Tris HCl 0,2 M, pH 8,0) e 0,1% de β- mercaptaenol. Estas permaneceram *overnight* e posteriormente foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirados 60 µL com posterior aplicação em gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e

4,5% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi efetuada à 150 volts por 6 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados conforme metodologia descrita por Alfenas, (2006).

Para a EST, a extração das proteínas foi realizada adicionando-se a 100 mg do pó da semente, 320 μ L do tampão de extração (0,2M Tris) homogeneizados em vortex e, posteriormente, mantidos por uma hora em geladeira. As amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm, a 4 °C por 60 minutos e 60 μ L do sobrenadante foram aplicados nos géis de poliacrilamida. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina pH 8,9. A eletroforese foi realizada a 110V durante 5 horas e os géis foram revelados para a esterase, conforme metodologia descrita por Alfenas (2006). A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando em consideração a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas no sistema avaliado.

Para a análise da enzima H^+ ATPase, as amostras maceradas foram homogeneizadas em 20 ml de meio de extração gelado contendo 250 mmol L⁻¹ de sacarose, 10% de glicerol (m:v), 0,5% de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mmol L⁻¹ de EDTA 0,2% de BSA (albumina sérica bovina) (m:v) e 0,1 mol L⁻¹ de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano]-HCl, pH 7,5. Imediatamente antes do uso foram adicionados 150 mmol L⁻¹ de KCl, 2 mmol L⁻¹ de DTT (ditiotreitól), 1 mmol L⁻¹ de cloridrato de benzamidina e 1 mmol L⁻¹ de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). Toda a preparação, foi efetuada à temperatura controlada entre 2 e 4°C. O pH do tampão de extração foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,5-8,0. Após a maceração do material radicular, o homogenato resultante foi e submetido à centrifugação de 1.500 x g durante 10 min à 2°C para a remoção de resíduos, células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 x g por 15 min à 2°C para a separação da fração mitocondrial. O novo sobrenadante então foi submetido à nova centrifugação a 100.000 x g por 40 min à 2°C. O precipitado dessa nova centrifugação, consistindo na fração microssomal, foi ressolubilizado em 2 mL de solução tampão [meio de ressuspensão: glicerol 15% (v:v), DTT 1 mmol L⁻¹, PMSF 1 mmol L⁻¹, 10 mmol L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5]. A concentração de proteína total contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

A atividade da enzima foi determinada pela medida colorimétrica da liberação de Pi (FISKE & SUBBARROW, 1925; FAÇANHA & DE MEIS, 1995). A reação foi iniciada com a adição da proteína (presente nas vesículas isoladas) e paralizada através

da adição de ácido tricloroacético (TCA) para uma concentração final de 10% (v:v). A revelação do Pi hidrolisado foi promovida mediante a adição de 0,5 ml da mistura contendo molibdato de amônio 2% em H₂SO₄ 2% + ácido ascórbico 1% e após 10 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 790 nm. A composição do meio de reação integra: 10 mmol L⁻¹ de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 6,5, 3 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 100 mmol L⁻¹ de KCl, 1 mmol L⁻¹ de ATP e 30 µg mL⁻¹ de proteína. A atividade específica da H⁺ATPase de membrana plasmática foi revelada pela percentagem de atividade sensível ao inibidor clássico das ATPases, o ortovanadato de sódio (0,2 mmol L⁻¹; Na₃VO₄) (DE MICHELIS & SPANSWICK, 1986).

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições de 25 sementes por parcela. Realizou-se a análise de variância para todas as características avaliadas e quando significativas, se qualitativas foram submetidas ao teste Scott-Knott a 5%, se quantitativas foi realizado a análise de Regressão. Foi utilizado o software SISVAR para as análises (FERREIRA, 2014).

2.1.3 Resultados e discussão

Diante dos resultados detectou-se que as germinações aos 15 dias e aos 30 dias não foram significativas para os fatores avaliados, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Este fato já poderia ser esperado, uma vez que as auxinas não têm efeitos diretos no processo de germinação das sementes. Esse resultado corrobora o trabalho de Vendruscolo (2014), o autor trabalhou com a cultura do sorgo e observou que não houve efeito das doses de substâncias húmicas na germinação e crescimento inicial de plântulas. Mas, este resultado também foi em contraponto à algumas outras espécies que mostraram respostas à aplicação de substâncias húmicas, como no caso do tomate estudado por Silva Filho e Silva (2002), onde demonstraram que as substâncias húmicas influenciaram no aumento e na velocidade das taxas de germinação.

Para a variável comprimento da raiz observou-se efeito significativo para as diferentes dosagens, mas não apresentou diferenças significativas para os diferentes ácidos orgânicos e para a interação entre eles. Com relação às avaliações das enzimas oxidativas, todas as avaliadas apresentaram diferenças significativas para os diferentes

ácidos e para as dosagens. Também apresentaram a interação entre ácidos e dosagens significativa.

A enzima H⁺ATPase, assim como as outras enzimas, apresentou diferenças significativas pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade para as dosagens utilizadas, os tipos de substâncias húmicas e para a interação entre as dosagens e os tipos.

A atividade da enzima H⁺ATPase aumenta com o aumento das dosagens de substâncias húmicas aplicadas, o mesmo ocorre, quando se analisa os tipos separados, para quando se utiliza ácido húmico, aumentando consideravelmente com o aumento das doses. Mas para o ácido fúlvico esse aumento vai somente até as dose de aproximadamente 40 mg/dm³ e após apresenta uma queda discreta (figura 1).

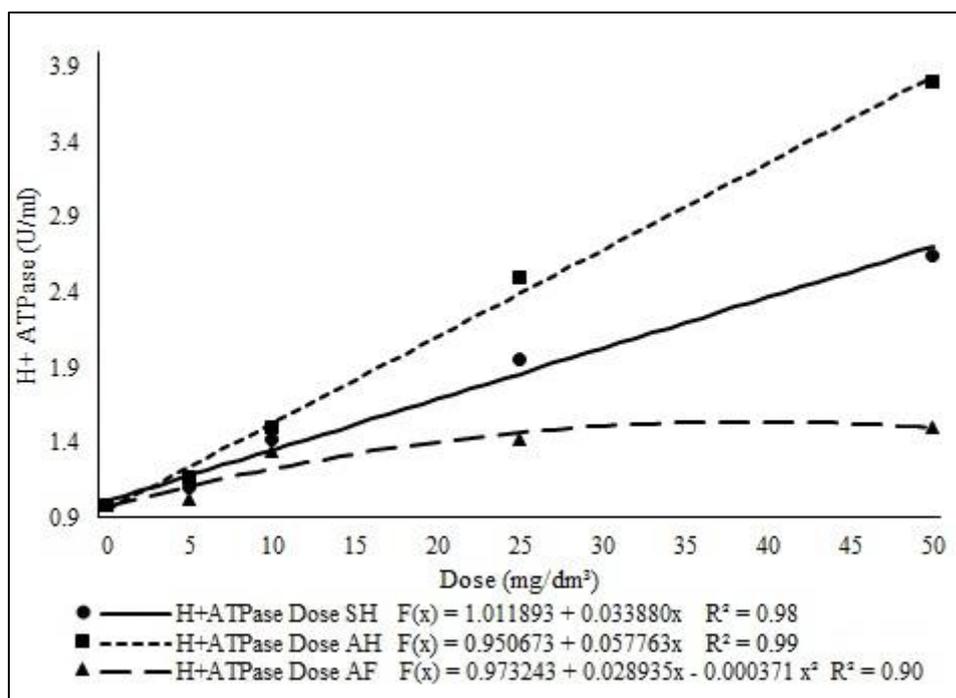


Figura 1. Atividade da enzima H⁺ATPase (U/ml) em função da dose de substâncias húmicas, e para os ácidos significativos da interação entre as doses e os tipos de ácidos, ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF).

A enzima H⁺ATPase é mais popularmente conhecida como bomba de prótons, e é a principal responsável pela absorção de nutrientes pelas raízes, ela gera um gradiente eletroquímico que induz a passagem dos nutrientes pela membrana das células radiculares. Canellas *et al.* (2009) mostraram que os ácidos húmicos aumentaram a atividade da H⁺ATPase nas células radiculares de milho, Jindo *et al.* (2012) também

relataram maior atividade da enzima em milho quando tratado com ácido húmico. Em aveia (*Avena sativa*) quando tratadas com substâncias húmicas teve a melhora de absorção de nutriente relacionada à H^+ ATPase (PINTON *et al.*, 1997).

As substâncias húmicas podem apresentar alguns grupamentos auxínicos na sua estrutura, e as auxinas induzem a ativação da bomba de prótons na membrana plasmática pela sua atividade hormonal (FAÇANHA *et al.*, 2002). Os ácidos húmicos estimularam as H^+ ATPases microsossomais nas raízes, com isso reforça ainda mais a teoria de que a atividade da bomba de prótons pode ser usada como um marcador bioquímico da atividade das substâncias húmicas nas raízes (CANELLAS *et al.*, 2004).

Embora os resultados da enzima H^+ ATPase, apresentem um aumento na atividade radicular de absorção de nutrientes, no presente trabalho não houve reflexo da melhora da atividade enzimática no comprimento radicular (Figura 2). Alguns autores relatam que a bomba de prótons estimula a expansão da parede celular promovendo o alongamento da célula e conseqüente aumento do comprimento da raiz (CANELLAS *et al.*, 2002; SZE *et al.*, 1999).

Na figura 2 observa-se a curva do comprimento radicular com comportamento complexo com o aumento da dosagem, e ainda assim, a dosagem 0 mg/dm³ foi onde se obteve o maior comprimento radicular. O efeito benéfico das substâncias húmicas no sistema radicular já foi visto em tomate (ADANI *et al.*, 1998), trigo (PENG *et al.*, 2001), milho (CANELLAS *et al.*, 2002, CANELLAS *et al.*, 2009, JINDO *et al.*, 2012, RODRIGUES *et al.*, 2017) e alface (BORCIONI *et al.*, 2016). No entanto no café arábica cultivar Topázio MG1190 não obteve-se resultados satisfatórios. O comprimento da raiz é um fator importante, pois quanto maior, maior o volume de solo explorado, podendo haver dentre vários benefícios, como a melhor absorção de água em maiores profundidades.

A promoção de crescimento de plantas por substâncias húmicas é bem documentada na literatura (NARDI *et al.*, 2009; CANELLAS; OLIVARES, 2014; CHEN *et al.*, 2017). Em geral, a resposta de crescimento de monocotiledôneas às SH parece ser maior do que para dicotiledôneas, embora a base molecular e fisiológica para esta diferença permaneça obscura (CANELLAS *et al.*, 2015).

Os efeitos das SH sobre a fisiologia vegetal incluem a promoção do crescimento radicular (NARDI *et al.*, 2002; CANELLAS *et al.*, 2015). A atividade do próton H^+ -ATPase da membrana plasmática em células radiculares é induzida por SH isoladas de

compostos agrícolas (MEDINA *et al.*, 2015) da mesma maneira que a auxina exógena induz crescimento (DOBBSS *et al.*, 2010).

Aguiar *et al.* (2013) estudaram a bioatividade de ácidos húmicos isolados de vermicomposto em diferentes estágios de maturação, compreendendo um período de 120 dias de compostagem. Após 60 dias da vermicompostagem, os ácidos húmicos presentes promoveram a emissão de raízes laterais, acidificação do meio de crescimento e indução de bomba de prótons, reduzindo em 50% o tempo previsto.

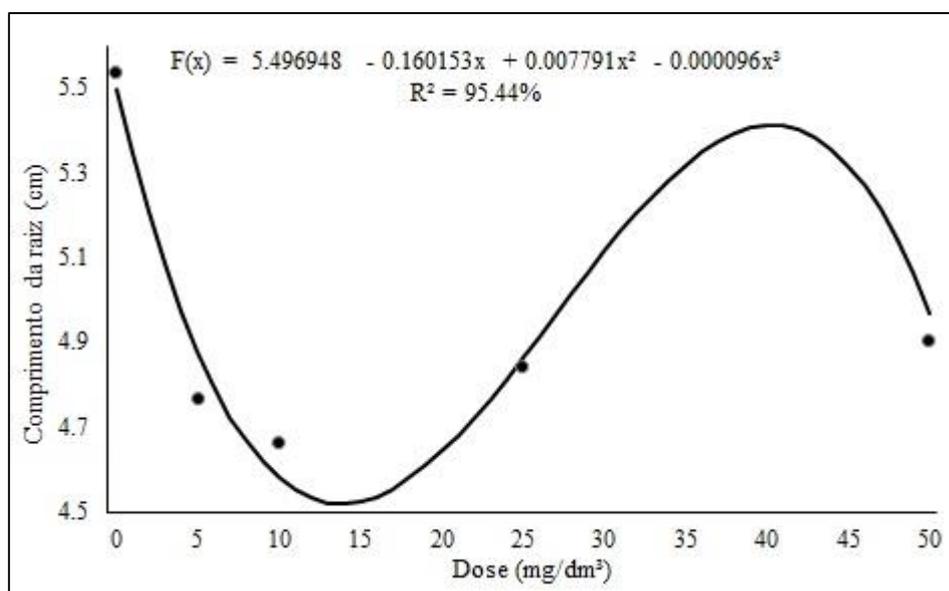


Figura 2. Comprimento da raiz em função das doses de substâncias húmicas

As médias da catalase, superóxido dismutase e álcool desidrogenase foram maiores quando utilizou-se ácido fúlvico, já a esterase a média maior foi quando aplicou ácido húmico (Tabela 2). A partir da formação das sementes, ela passa a sofrer alguns efeitos maléficos devido à diversos fatores, um deles é causado pelas espécies reativas de oxigênio, que são consequência do mal funcionamento de algumas vias metabólicas, bem como do funcionamento normal de outras (WANG *et al.*, 2012). Dentre elas pode-se destacar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical ânion superóxido (O²⁻) e o radical hidroxila (OH⁻) que são capazes de oxidar os componentes das células (VANDENABEELE, 2000). Diante disso, os organismos são capazes de produzir enzimas que são antioxidantes e tentam eliminar essas espécies reativas de oxigênio.

Dentre algumas enzimas podemos citar a catalase, superóxido dismutase, álcool desidrogenase e esterase.

Tabela 2. Médias das atividades enzimáticas da Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Álcool desidrogenase (ADH) e Esterase (EST).

	Médias (U/mg)			
	CAT	SOD	ADH	EST
AH	2.845 b	8.894 b	5.561 b	4.151 a
AF	3.535 a	11.051 a	6.909 a	2.796 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, teste Scott-Knot, $p < 0,05$.

Porém o aumento das enzimas oxidativas é um indicativo de que está havendo algum estresse no meio. Neste experimento não foi aplicado nenhum tipo específico de estresse nas sementes, tendo em vista que o germinador controla a luminosidade e temperatura, e a umidade também foi controlada, assim, pode ser que a alteração nas atividades enzimática esteja relacionada com a aplicação das substâncias húmicas no meio, uma vez que foi a única alteração.

A atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo oscilaram com o aumento das doses de substâncias húmicas, porém apresentaram as menores taxas enzimáticas nos extremos, nas doses de 0 e 50 mg/dm³, com exceção somente da esterase que apresentou um comportamento diferente com o aumento das doses (Figura 2).

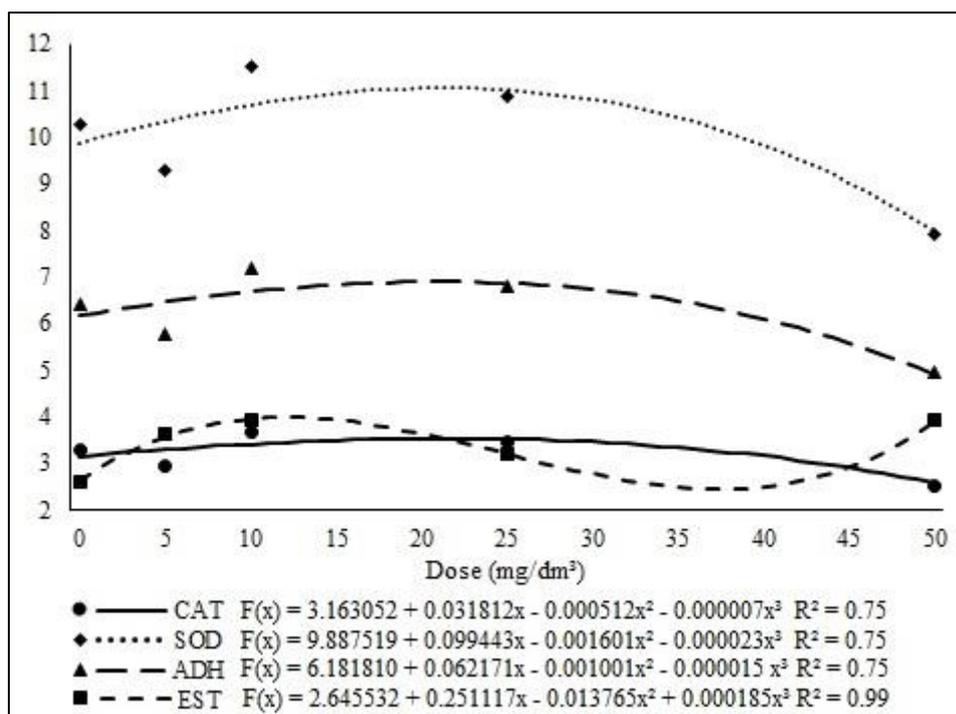


Figura 2. Atividade das enzimas Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Álcool desidrogenase (ADH) e Esterase (EST) em função das dosagens de substâncias húmicas.

Todas as doses utilizadas são relativamente pequenas, quando se compara a alguns fertilizantes comumente usados na agricultura, e mesmo assim acontecem mudanças consideráveis nas reações enzimáticas. Isso pode ser devido ao efeito bioestimulante que as substâncias húmicas podem exercer na plantas, que em pequenas dosagens são capazes de influenciar positiva ou negativamente o metabolismo e desenvolvimento das plantas. (BIOSTIMULANT COALITION, 2018). Bioestimulantes de plantas ou bioestimulantes agrícolas incluem diversas substâncias e microorganismos que promovem crescimento de vegetal. O mercado de biológicos agrícolas projetou alcançar um valor de 11.35 bilhões de dólares em 2022, e uma taxa de crescimento anual de 12,76% de 2016 a 2022 (ANONYMOUS, 2017).

O aumento da atividade das enzimas é um grande indicativo de que está havendo um aumento das espécies reativas de oxigênio no meio, e assim está havendo algum estresse para isso. As substâncias húmicas são efetivas em aumentar a atividade das enzimas oxidativas em diversas situações independente do estresse, como ocorre com algumas espécies, como por exemplo em amieiro e bétula quando tratados com

substâncias húmicas. As substâncias húmicas atuam nos genes de transcrição da enzima álcool desidrogenase, aumentando os níveis da mesma (TAHIRI *et al.*, 2016).

A interação do tipos de ácidos dentro de cada nível de dose das substâncias húmicas se mostrou significativa para as enzimas antioxidantes. Na dose de 5 mg/dm³ somente a esterase apresentou diferenças significativas para os ácidos, apresentando maiores médias quando o tratamento foi com ácido húmico. Nas doses de 10 e 25 mg/dm³, catalase, superóxido dismutase e álcool desidrogenase tiveram maiores média com ácido fúlvico, e a esterase com ácido húmico. Na dose de 50 mg/dm³ todas as enzimas avaliadas apresentaram maiores médias quando o tratamento foi com ácido fúlvico.

Tabela 3. Médias das atividade enzimáticas (U/ml) da Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Álcool desidrogenase (ADH) e Esterase (EST) dentro de cada dosagem de ácido húmico e fúlvico.

		5 mg/dm ³			
		CAT	SOD	ADH	EST
AH		2.940 a	9.190 a	5.746 a	3.767 a
AF		2.990 a	9.347 a	5.844 a	3.517 b
		10 mg/dm ³			
		CAT	SOD	ADH	EST
AH		3.087 b	9.649 b	6.033 b	5.384 a
AF		4.273 a	13.358 a	8.352 a	2.461 b
		25 mg/dm ³			
		CAT	SOD	ADH	EST
AH		2.830 b	8.846 b	5.531 b	5.204 a
AF		4.130 a	12.910 a	8.072 a	1.243 b
		50 mg/dm ³			
		CAT	SOD	ADH	EST
AH		2.083 b	6.512 b	4.072 b	3.776 b
AF		2.007 a	9.367 a	5.857 a	4.141 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, teste Scott-Knot, p<0,05.

Ao considerar que, onde houve a menor atividade, também foi onde houve menores problemas com estresse das plântulas de café. A catalase, superóxido dismutase e álcool desidrogenase, apresentaram curvas com comportamento semelhante, com os menores valores de atividades dos extremos das doses de 0 e 50 mg/dm³ de ácido fúlvico, já a esterase apresentou o menor valor aproximadamente na dose de 35 mg/dm³ (Figura 3).

O ácido fúlvico apresenta menor tamanho molecular que o ácido húmico, isso facilita que ele passe pela membrana plasmática nas raízes (BOCANEGRA *et al.*, 2006) e assim poder mover dentro da planta e interagir ou até influenciar na fisiologia e metabolismo (ANJUM *et al.*, 2011). Neste experimento com o café arábica da cultivas Topázio MG1190 isto não foi muito evidente.

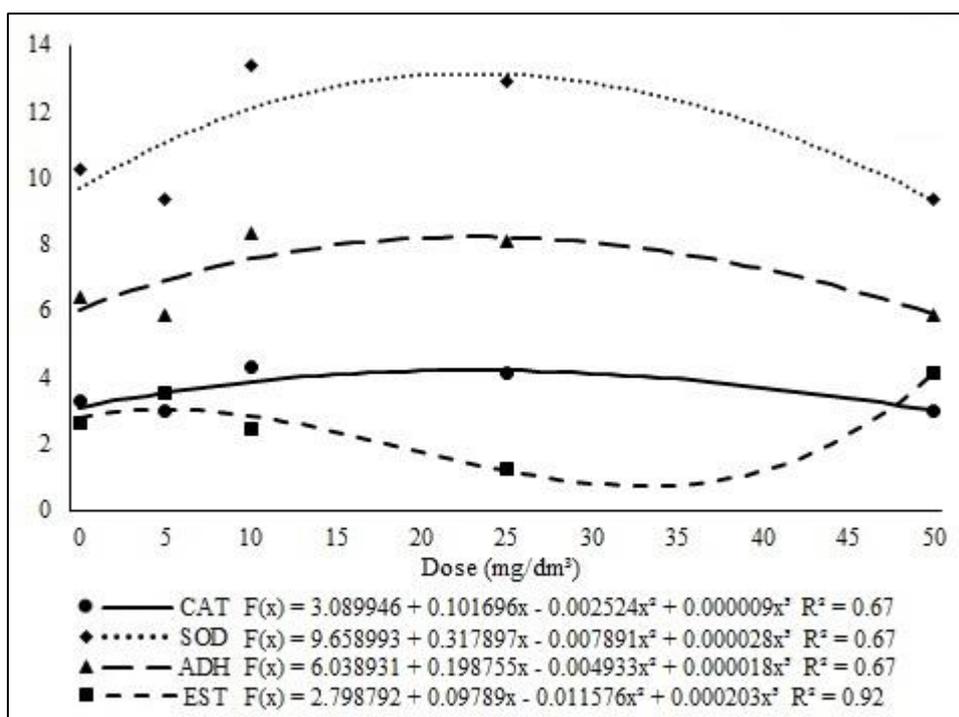


Figura 3. Atividade das enzimas Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Álcool desidrogenase (ADH) e Esterase (EST) em função das dosagens de ácido fúlvico.

A atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e álcool hidrogenase caíram com o aumento das doses de ácido húmico, sendo o menor valor na dose de 50 mg/dm³ (Figura 3). Isto pode ser um indicativo de melhoria no estresse com o aumento

das doses de ácido húmico, uma vez que as enzimas após combaterem as causas do estresse podem ser desativadas até que sejam necessárias em outro momento de estresse.

O alface ao ser tratado com ácido húmico apresentou aumento considerável na atividade da superóxido dismutase (HAGHIGHI, 2011). A batata doce mostrou um aumento na atividade da catalase, também quando tratada com ácido húmico, sendo um auxílio no combate às espécies reativas de oxigênio (CHEN *et al.*, 2017). Estudo com espécies lenhosas do tipo azaleia atestou a influência do ácido húmico sobre algumas enzimas, dentre elas a catalase e a superóxido dismutase, pois contribuíram para as maiores atividades das enzimas (ELMONGY *et al.* 2018).

As aplicações de ácidos húmicos melhoraram os efeitos negativos da salinidade sobre o crescimento vegetativo e a floração em uma estufa de *Chrysanthemum indicum* (MAZHAR *et al.*, 2012). Em um estudo de campo com pistache (*Pistacia vera*), o ácido húmico melhorou os efeitos negativos sobre o crescimento das plantas resultantes da irrigação com taxas baixas a moderadas de NaCl, e este efeito esteve relacionado com uma redução na acumulação de prolina e diminuição dos níveis de ácido abscísico (ABA) (MOGHADDAM; SOLEIMANI, 2012).

Além do estresse salino, outro fator abiótico que prejudica as plantas é a baixa tolerância à seca. O ácido húmico extraído do vermicomposto foi avaliado quanto aos efeitos no crescimento e na fisiologia de mudas de arroz cultivadas sob condições de déficit de água (GARCÍA *et al.*, 2012). O aparecimento de sintomas de estresse hídrico iniciou-se aos 10 dias após a germinação juntamente à promoção de crescimento de plântulas induzida pelo ácido húmico. Plântulas tratadas com ácido húmico aumentaram os pesos secos das raízes em comparação com os controles nas condições de estresse hídrico. Aos 25 dias após a germinação sob estresse hídrico, os níveis de clorofila, carotenóides, proteínas e carboidratos foram maiores nas plantas tratadas do que nos controles, indicando que a capacidade fotossintética das plantas estressadas pela água foi aumentada pelo ácido húmico. Num ensaio na cultura do milho, as aplicações de ácido fúlvico sob condições de seca aumentaram a produção (ANJUM *et al.*, 2011).

A enzima esterase teve seu menor valor na dose 0 mg/dm³ de ácido húmico, então ela aumenta a atividade com o aumento das doses até 30 mg/dm³ e após cai a atividade (Figura 3). O bom funcionamento da enzima esterase é de vital importância, pois a peroxidação de lipídeos da membrana plasmática é um dos piores episódios de deterioração para as células, e a esterase está envolvida no metabolismo de lipídeos e na hidrólise de ésteres, auxiliando a membrana a passar pelos estresses ileso

(BASAVARAJAPPA *et al.*, 1991). O ácido húmico causou um aumento considerável na atividade da esterase, mostrando que, onde houve menor estresse foi na menor dose.

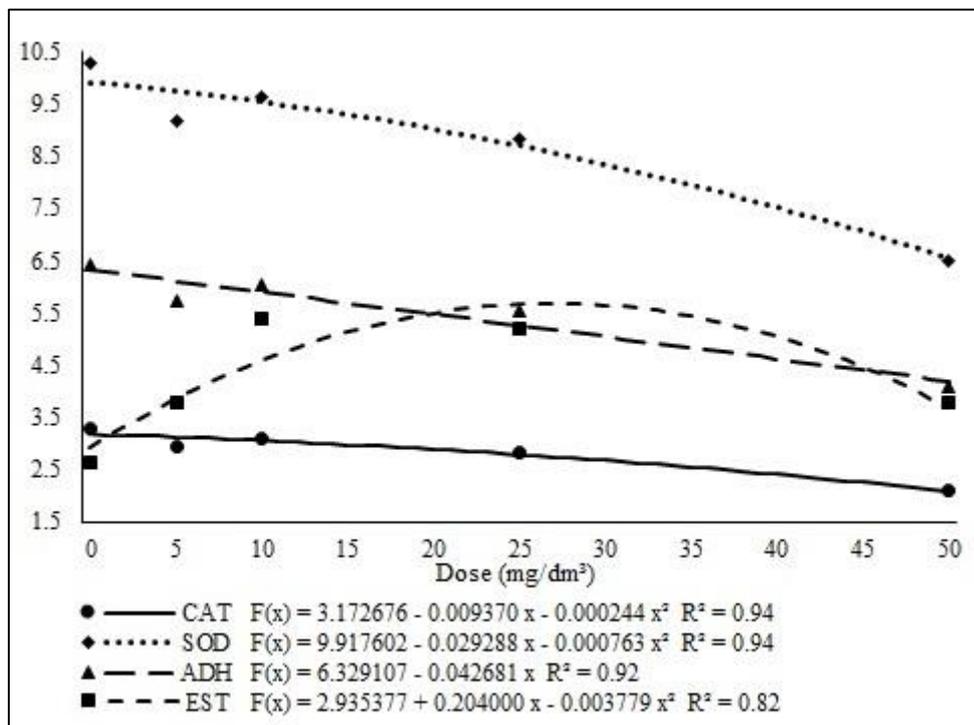


Figura 3. Atividade das enzimas Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Álcool desidrogenase (ADH) e Esterase (EST) em função das dosagens de ácido húmico.

2.1.4 Conclusão

Tendo em vista os resultados satisfatórios encontrados em diversas culturas, no café da espécie *Coffea arabica* as substâncias húmicas não apresentam benefícios agronômicos no estágio de plântula, não sendo recomendadas como um possível tratamento de sementes nestas condições.

2.1.5 Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Agricultura, à Agência de Inovação do Café, ao Setor de Sementes e seus funcionários e à CAPES.

Referências Bibliográficas

- ADANI, F. *et al.* *The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition.* **J Plant Nutr**, v. 21, p. 561–575, 1998.
- AGUIAR N. O. *et al.* *Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages.* **Plant and Soil**, 362:161-174, 2013.
- ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**, 2.ed. Viçosa: Ed. da UFV, 627p, 2006.
- ALMEIDA, S. L. S. *et al.* Adição de resíduos orgânicos ao substrato para produção de mudas de café em tubete. **Revista Agroambiental**, Pouso Alegre-MG, v. 3, n. 2, p. 9-13, 2011.
- ANJUM S. A. *et al.* *Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions.* **J Agron Crop Sci**, v. 197, p. 409–417, 2011.
- BALIZA, D. P. *et al.* Antecipação da produção e desenvolvimento da lavoura cafeeira implantada com diferentes tipos de mudas. **Coffee Science**, Lavras-MG, v. 8, n. 1, p. 61-68, 2013.
- BASAVARAJAPPA, B. S. *et al.* *Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds.* **Seed Sci. & Technol.**, v. 19, p. 279-286, 1991.
- BERBARA R. L. L., GARCÍA A. C. *Humic substances and plant defense metabolism.* In: Ahmad P, Wani MR (eds) *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment.* **Springer Science+Business Media**, New York, v. 1, p 297– 319, 2014.
- BIOSTIMULANT COALITION.** *What are biostimulants?* <http://www.biostimulantcoalition.org/about/>, Acesso em: 03 mar 2018.
- BOCANEGRA M. P. *et al.* *Plant uptake of iron chelated by humic acids of different molecular weights.* **Commun Soil Sci Plant Anal** v. 37, p. 1–2, 2006.

- BORCIONI, E. *et al.* Aplicação de ácido fúlvico em mudas influenciando o crescimento radicular e produtividade de alface americana. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 47, n. 3, p. 509-515, jul-set, 2016.
- BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-54, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Brasília: Mapa/ACS, p. 399, 2009.
- CANELLAS L. P. *et al.* Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiol** v. 130, p. 1951–1957, 2002.
- CANELLAS L. P. *et al.* Relationships between chemical characteristics and root growth promotion of humic acids isolated from Brazilian oxisols. **Soil Sci** v. 174, p. 611–620, 2009.
- CANELLAS, L.P. *et al.* Organic matter quality of a soil cultivated with perennial herbaceous legumes. **Sci. Agric.**, v. 61, p. 43-53, 2004.
- CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v.1, p.1-11, 2014.
- CANELLAS, L.P. *et al.* Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v.196, n.1, p.15-27, 2015.
- CHEN, X. *et al.* Responses of root physiological characteristics and yield of sweet potato to humic acid urea fertilizer. **PLoS ONE** v. 12, p.12, 2017.
- COGO, F. D. *et al.* Formação de mudas de cafeeiro sob doses crescentes de fósforo. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia-GO, v. 8, n. 14; p. 598-605. 2012.
- DE MICHELIS, M. I.; SPANSWICK, R. M. H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. **Plant Physiol.**, v. 81, p. 542-547, 1986.
- DOBBSS, L.B. *et al.* Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.6, p.3681-3688, 2010.
- ELMONGY, M.S *et al.* The effect of humic acid on endogenous hormone levels and antioxidant enzyme activity during in vitro rooting of evergreen azalea. **Scientia Horticulturae** v. 227, p. 234–243, 2018.

- FAÇANHA, A. R. *et al.* Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1301-1310, set. 2002.
- FAÇANHA, A.R.; DE MEIS, L. *Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes.* **Plant Physiol.**, v. 108, p. 241-246, 1995.
- FERNANDES, A. L. T. *et al.* Adubação orgânica do cafeeiro, com uso do esterco de galinha, em substituição à adubação mineral. **Coffee Science**, Lavras-MG, v. 8, n. 4, p. 486-499, 2013.
- FERREIRA, D. F. *Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons.* **Ciênc. agrotec.** [online], vol.38, n.2, p. 109-112, 2014.
- FISKE, C. F.; SUBBAROW, L. *The colorimetric determination of phosphorus.* **J. Biol. Chem.**, v. 66, p. 375-400, 1925.
- GARCÍA, A. C. *et al.* Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.13, p.3125-3134, 2012.
- GIANNOPOLITIS, C. N. *et al.* Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.** V. 59, p. 309-314, 1977.
- GUERRA, J. C. M. *et al.* Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G. de A. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais.** 2.ed. Porto Alegre: Metrópole, p.19-26, 2008.
- HAGHIGHI, M. *Sewage Sludge Application in Soil Improved Leafy Vegetable Growth.* **J. Biol. Environ. Sci.**, v. 5(15), p. 165-167, 2011
- HAVIR, E. A.; MC HALE, N. A. *Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves.* **Plant Physiol**, v. 84(2), p. 450-455. Jun 1987.
- JINDO, K. *et al.* Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. **Plant Soil**, v. 353, p. 209-220, 2012.
- MEDINA, J. *et al.* Crop residue stabilization and application to agricultural and degraded soils: A review. **Waste Management**, v.42, p.41-54, 2015.
- MAZHAR, A. A. M. *et al.* Growth, flowering and chemical constituents of *Chrysanthemum indicum* L. plant in response to different levels of humic acid and salinity. **Journal of Applied Sciences Research**, v.8, n.7, p.3697-3706, 2012.

- MOGHADDAM, A. R. L.; SOLEIMANI, A. *Compensatory effects of humic acid on physiological characteristics of pistachio seedlings under salinity stress. Acta Horticulturae*, v.940, p.252-255, 2012.
- NARDI, S. *et al. Biological activities of humic substances*. In: Senesi N, Xing B, Huang PM (eds) **Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems**. Wiley, Hoboken, p 305–339, 2009.
- NARDI, S., *et al. Physiological effects of humic substances on higher plants. Soil Biol Biochem* v. 34, p. 1527–1536. 2002.
- OLIVEIRA, C. L. L. G.; MIGLIORANZA, E. *Quality levels of organic coffee seedlings in black and white nonwoven fabric (NWF) containers of various sizes. African Journal of Agricultural Research*, Nairóbi - Quênia, vol. 10, n. 9, p. 886-894, 2015.
- PEREIRA, I. S. *et al. Substratos orgânicos na produção de mudas de cafeeiro em tubetes. Revista de Agricultura Neotropical*, Cassilândia-MS, v. 4, n. 2, p. 17-26, abr./jun. 2017.
- PENG, A. *et. al. The effect of fulvic acid on the dose effect of selenite on the growth of wheat. Biol Trace Elem Res* v. 83, p. 275–279, 2001.
- PINTON, R. *et al. Effect of humic substances stimulate proton release by intact oat seedling roots. J Plant Nutr* v. 20, p. 857–869, 1997.
- PRIMO, D. C.; MENEZES, R. S. C.; SILVA, T. O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 5, n. 7, p. 1-13, maio 2011.
- RODRIGUES, L. A. *et al. Humic acid on germination and vigor of corn seeds. Rev. Caatinga*, Mossoró, v. 30, n. 1, p. 149 – 154, jan. – mar., 2017.
- SILVA FILHO, A.V. da; SILVA, M. I. V. da. Importância das substâncias húmicas para a agricultura. **Anais do simpósio nacional sobre as culturas do inhame e do taro**. João Pessoa, v. 2, 2002.
- SILVA, R. M. da *et al. Crescimento da parte aérea e do sistema radicular do milho cultivado em solução nutritiva adicionada de substâncias húmicas. Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 5, n. 2, p. 101-110, 1999.
- SIMPSON, A. J. *et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. Naturwissenschaften* vv. 89, p. 84– 88, 2002.
- SZE H. *et al. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. Plant Cell*. v. 11, p. 677–690, 1999.

TAHIRI, A. *et al.* *Comprehensive comparison of the chemical and structural characterization of landfill leachate and leonardite humic fractions.* ***Analytical and bioanalytical chemistry***, v. 408(7), p. 1917-1928, 2016.

VANDENABEELE, J. D. S. *et al.* *Dual action of the active oxygen species during plant stress responses.* ***Cellular and Molecular Life Science***, v. 57, n. 5, p. 779-795, jan. 2000.

VARANINI Z., PINTON R. *Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition.* In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) ***The rhizosphere.*** Marcel Dekker, Basel, p. 141 –158, 2001.

VENDRUSCOLO, E. P. *et al.* *Substâncias húmicas na qualidade fisiológica de sementes de sorgo,* ***Journal of Agronomic Sciences***, Umuarama, v.3, n.2, p.169-177, 2014.

WANG, L. *et al.* *Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress.* ***Jornal of proteomics***, China, v. 75, p. 2109-2127, jan. 2012

2.2 ARTIGO 2 – BIOESTIMULANTES PROMOTORES DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS DE *Coffea arabica* L.

Resumo

Recentemente vem crescendo o número de estudos sobre a propagação vegetativa por estacas de café arábica. Para o enraizamento de estacas de café arábica utiliza hormônios vegetais para a indução das raízes. Porém, para formar mudas orgânicas, não pode utilizar moléculas sintéticas neste processo. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato de tiririca, diferentes dosagens e tipos de substâncias húmicas nas estacas de café arábica. Coletou-se brotações de lavoura de café arábica, onde cortou-se as estacas, contendo pelo menos duas gemas. O experimento foi um fatorial triplo, 2 (sem ou com extrato de tiririca) x 2 (ácido húmico ou fúlvico) x 4 (0, 10, 25 e 50 mg/dm³). Foram avaliados dados vegetativos altura de broto (cm), sobrevivência, folhas remanescentes, pares de folhas, vigor e número de brotos. O comprimento, a área, o volume, diâmetro das raízes, a massa fresca e seca do sistema radicular. Também foi quantificado a atividade das enzimas H⁺ATPase, catalase, superóxido dismutase, álcool desidrogenase e esterase. Na parte aérea a melhor dose de substâncias húmicas foi a 0 mg/dm³. Na parte radicular houve benefícios com a dose de 10 mg/dm³ de ácido húmico na presença do extrato de tiririca. Os menores estresses oxidativos foram vistos na dose de 10 mg/dm³ de ácido húmico ou fúlvico, independente da utilização do extrato. Porém, diante disto, ainda são necessário análises e estudos mais profundos acerca da utilização do extrato de tiririca e das substâncias húmicas na cultura do café arábica.

Palavras-chave: sistema radicular, AIB, ácido húmico, ácido fúlvico, brotações.

Abstract

Recently the number of studies on the vegetative propagation by Arabica coffee cuttings has been increasing. For the rooting of Arabica coffee cuttings it uses plant hormones for the induction of the roots. However, to form organic seedlings, you can not use synthetic molecules in this process. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of the tiririca extract, different dosages and types of humic substances in the arabica coffee cuttings. Cultivation shoots of arabica coffee were collected, where the cuttings were cut, containing at least two buds. The experiment was a triple factorial, 2 (without or with extract of tiririca) x 2 (humic or fulvic acid) x 4 (0, 10, 25 and 50 mg/dm³). Vegetative data were evaluated at shoot height (cm), survival, leaves remaining, leaf pairs, vigor and number of shoots. The length, area, volume, root diameter, fresh and dry mass of the root system. The activity of the enzymes H + ATPase, catalase, superoxide dismutase, alcohol dehydrogenase and esterase was also quantified. In the aerial part the best dose of humic substances was 0 mg/dm³. In the root part there were benefits with the dose of 10 mg/dm³ of humic acid in the presence of the extract of tarrya. The lowest oxidative stresses were observed at a dose of 10 mg/dm³ of humic or fulvic acid, regardless of the use of the extract. However, in the light of this, further analysis and studies on the use of tere extract and humic substances in the Arabica coffee crop are still required.

Key words: root system, AIB, humic acid, fulvic acid, sprouts.

2.2.1 Introdução

O café arábica é propagado, em quase sua totalidade, via sementes, uma vez que é uma cultura com aproximadamente 90% de autogamia. Por ser uma cultura perene é de vital importância mudas sadias e bem desenvolvidas para obter o sucesso na formação de novas lavouras (GUIMARÃES *et al.*, 1998). Recentemente vem crescendo o número de estudos sobre a propagação vegetativa por estacas de café arábica, que ainda é pouco utilizada devido à dificuldade de estabelecer uma metodologia, pois há uma grande variação entre as cultivares e cada uma responde de uma maneira a esse processo de enraizamento (CARVALHO, 2005).

A propagação vegetativa por estaquia tem muitas vantagens, uma delas é que as mudas formadas a partir de estacas não possuem a raiz pivotante, eliminando o problema do pião torto na formação das mudas. Outra vantagem é que quando dois parentais se

complementam genotipicamente bem, seus híbridos podem ser mais produtivos (BUENO *et al.*, 2006), e ainda se pode inserir outros caracteres de interesse à cultura ainda em heterozigose, e a partir da propagação vegetativa consegue que as características permaneçam nos seus descendentes, uma vez que se mantém as características das plantas mãe (BRAGANÇA *et al.*, 1995; PAULINO *et al.*, 1987).

Atualmente, as metodologias que são utilizadas para o enraizamento de estacas de café arábica utilizam hormônios vegetais para a indução das raízes. O grupo de reguladores de crescimento utilizado com mais frequência para este fim é o das auxinas que agem na ativação de células do câmbio vascular, promovendo a formação de raízes adventícias em estacas (HARTMANN *et al.*, 2002). Os reguladores de crescimento como ácido naftaleno-acético (ANA), ácido indol-acético (AIA) e ácido indol-butírico (AIB) são utilizados para estimular o enraizamento ou nível de brotação das estacas. O AIB tem sido preferencial por não ser tóxico e ser mais efetivo para a maioria das espécies (PIRES; BIASI, 2003). Porém, quando se diz respeito em formar mudas orgânicas, não pode utilizar moléculas sintéticas neste processo.

No contexto da agricultura orgânica é necessário encontrar alternativas para auxiliar no enraizamento. De acordo com Lorenzi (2000), a tiririca, plantas do gênero *Cyperus*, apresenta nível elevado de AIB nas suas folhas e raízes, porém ainda não se sabe quantificar a concentração, e um grande fator que pode influenciar na formação de raízes adventícias em estacas é a concentração do regulador de crescimento utilizada (ALMEIDA *et al.*, 2007; TOFANELLI *et al.*, 2003).

As substâncias húmicas estão presentes na fração orgânica já decomposta nos solos, elas influenciam as propriedades químicas, físicas e biológicas (SIMPSON *et al.*, 2002). Também são capazes de influenciar o metabolismo e fisiologia das plantas. As substâncias húmicas podem ter efeitos semelhantes às auxinas no metabolismo das plantas. Por exemplo, o desenvolvimento de raízes laterais é aumentado quando tratado com substâncias húmicas, isto está relacionado com os mecanismos de divisão celular que são regulados pelas auxinas (TREVISAN *et al.*, 2010).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato de tiririca, diferentes dosagens e tipos de substâncias húmicas nas estacas de café arábica da cultivar Topázio MG 1190, e seus efeitos no sistema radicular, no desenvolvimento vegetativo, na enzima H⁺ATPase ligada à absorção de nutrientes e enzimas ligadas ao estresse oxidativo, na tentativa de uma alternativa à utilização de AIB sintético no enraizamento de estacas, e assim, produzir mudas clonais aptas para formação de lavouras orgânicas.

2.2.2 Material e métodos

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Lavras, localizada no município de Lavras-MG, no Departamento de Agricultura, no Setor de Cafeicultura, onde foram coletados brotações (ramos ladrões) de lavoura de café arábica, cultivar Topázio MG1190. Após coletados, foram cortados de 5 a 7 cm cada estaca, contendo pelo menos duas gemas, e deixado um par de folhas por estaca, porém cortando a folha na metade. Foi feita a lavagem em água pura (adaptado OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As estacas que foram tratadas com extrato de tiririca tiveram suas bases mergulhadas no mesmo por 60 minutos e foram colocadas em substrato para enraizar. O extrato de tiririca foi feito com 800g dos tubérculos das plantas, coletadas no campus da Universidade Federal de Lavras de acordo com a metodologia proposta em Dias *et al.* (2012). Sendo preparado a partir da trituração de tubérculos, dissolvidos em uma solução composta por 665 ml de água destilada, 335 ml de álcool cereais (RONCATTO *et al.*, 2008).

As substâncias húmicas foram colocadas no substrato (areia, argila e vermiculita 2:2:1) via água, na concentração de 0, 10, 25 e 50 mg/dm³. O experimento foi montado em estufa, irrigada pelo método de microaspersão por nebulização, com controle de umidade relativa do ar (entre 85 – 90%) e temperatura (24°C), com telado de sombrite com 50% de sombreamento, irrigado por sistema automático de acionamento.

Ao final do experimento, com 130 dias, foram avaliados dados vegetativos altura de broto (cm), sobrevivência, folhas remanescentes, pares de folhas, vigor e número de brotos, o comprimento, a área, o volume e o diâmetro das raízes. Foram quantificados a massa fresca e seca do sistema radicular. Também foram quantificados as atividades da enzima H⁺ATPase e das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo catalase, superóxido dismutase, álcool desidrogenase e esterase.

Para análise do comprimento, área, volume e diâmetro da raiz, foram feitas fotografias das estacas para posterior análise no software SAFIRA, 2010 – Sistema para Análise de Fibras e Raízes (JORGE; RODRIGUES, 2010). Os dados vegetativos foram analisados através de contagem e medição com régua graduada em centímetros. As amostras das raízes foram lavadas e pesadas em balança analítica para se obter a massa fresca, após, foram acondicionados separadamente, em sacos de papel identificados e

levados para estufa de circulação de ar forçada a 65°C, onde permaneceram até atingir peso constante, e também foram pesados em balança analítica, para obtenção da massa seca. Também foram retiradas as folhas e acondicionadas à -86°C para posterior avaliação das enzimas.

As folhas do café arábica foram maceradas na presença de polivinilpirrolidona (PVP) e nitrogênio líquido. Em seguida, foram tomadas amostras de 100 mg para análise de cada enzima, acondicionadas em microtubos, à temperatura de -86°C.

Para a análise da CAT foi utilizado o meio de reação composto pelo tampão de extração fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), água e H₂O₂ 250 mM, incubado a 30 °C, em que foi monitorado o consumo do peróxido de hidrogênio (HAVIR; MC HALE, 1987). A CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, com leitura realizada durante três minutos anotando o decréscimo da absorbâncias de 15 em 15 segundos.

Para a SOD utilizou meio de reação composto pelo tampão de extração fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 70 mM, EDTA 10 µM, água, NBT 1 mM e riboflavina 0,2 mM. A cubeta com o meio de reação e a amostra foram iluminados, por 7 minutos e para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado e branco foi mantido no escuro. A SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). As leituras foram realizadas a 560 nm, considerando que uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio (GIANNOPOLITIS *et al.*, 1977).

Para a ADH foram adicionados 250 µL de tampão de extração (Tris HCl 0,2 M, pH 8,0) e 0,1% de β- mercaptaenol. Estas permaneceram *overnight* e posteriormente foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirados 60 µL com posterior aplicação em gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi efetuada à 150 volts por 6 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados conforme metodologia descrita por Alfenas, (2006).

Para a EST, a extração das proteínas foi realizada adicionando-se a 100 mg do pó da semente, 320 µL do tampão de extração (0,2M Tris) homogeneizados em vortex e, posteriormente, mantidos por uma hora em geladeira. As amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm, a 4 °C por 60 minutos e 60 µL do sobrenadante foram aplicados nos géis de poliacrilamida. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris-glicina pH 8,9. A

eletroforese foi realizada a 110V durante 5 horas e os géis foram revelados para a esterase, conforme metodologia descrita por Alfenas (2006). A interpretação dos resultados foi baseada na análise visual dos géis de eletroforese, levando em consideração a intensidade de cada uma das bandas eletroforéticas no sistema avaliado.

Para a análise da enzima $H^+ATPase$, as amostras maceradas foram homogeneizadas em 20 ml de meio de extração gelado contendo 250 mmol L^{-1} de sacarose, 10% de glicerol (m:v), 0,5% de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mmol L^{-1} de EDTA 0,2% de BSA (albumina sérica bovina) (m:v) e 0,1 mol L^{-1} de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano]-HCl, pH 7,5. Imediatamente antes do uso foram adicionados 150 mmol L^{-1} de KCl, 2 mmol L^{-1} de DTT (ditiotreitól), 1 mmol L^{-1} de cloridrato de benzamidina e 1 mmol L^{-1} de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). Toda a preparação, foi efetuada à temperatura controlada entre 2 e 4°C. O pH do tampão de extração foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,5-8,0. Após a maceração do material radicular, o homogenato resultante foi e submetido à centrifugação de 1.500 x g durante 10 min à 2°C para a remoção de resíduos, células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 x g por 15 min à 2°C para a separação da fração mitocondrial. O novo sobrenadante então foi submetido à nova centrifugação a 100.000 x g por 40 min à 2°C. O precipitado dessa nova centrifugação, consistindo na fração microssomal, foi ressolubilizado em 2 mL de solução tampão [meio de ressuspensão: glicerol 15% (v:v), DTT 1 mmol L^{-1} , PMSF 1 mmol L^{-1} , 10 mmol L^{-1} de Tris-HCl pH 7,5]. A concentração de proteína total contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

A atividade da enzima foi determinada pela medida colorimétrica da liberação de Pi (FISKE & SUBBARROW, 1925; FAÇANHA & DE MEIS, 1995). A reação foi iniciada com a adição da proteína (presente nas vesículas isoladas) e paralizada através da adição de ácido tricloroacético (TCA) para uma concentração final de 10% (v:v). A revelação do Pi hidrolisado foi promovida mediante a adição de 0,5 ml da mistura contendo molibdato de amônio 2% em H_2SO_4 2% + ácido ascórbico 1% e após 10 min foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 790 nm. A composição do meio de reação integra: 10 mmol L^{-1} de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 6,5, 3 mmol L^{-1} de $MgCl_2$, 100 mmol L^{-1} de KCl, 1 mmol L^{-1} de ATP e 30 $\mu g mL^{-1}$ de proteína. A atividade específica da $H^+ATPase$ de membrana plasmática foi revelada pela percentagem de atividade sensível ao inibidor clássico das

ATPases, o ortovanadato de sódio (0,2 mmol L⁻¹; Na₃VO₄) (DE MICHELIS & SPANSWICK, 1986).

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com 4 blocos de 5 estacas por parcela. O experimento foi um fatorial triplo, 2 (sem ou com extrato de tiririca) x 2 (ácido húmico ou fúlvico) x 4 (0, 10, 25 e 50 mg/dm³). Realizou-se a análise de variância para todas as características avaliadas e quando significativas, se qualitativas foram submetidas ao teste Scott-Knott a 5%, se quantitativas foi realizado a análise de Regressão. Foi utilizado o software SISVAR para as análises (FERREIRA, 2014).

2.2.3 Resultados e discussão

Das características de parte aérea avaliadas, a sobrevivência e o vigor das estacas não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste F apresentando coeficientes de variação de 6.76 e 9.41%. O número de brotos, a altura dos brotos e o número de pares de folhas apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% para diferentes dosagens aplicadas de substâncias húmicas, com CV variando de 7.00 a 14.03%. Para as folhas remanescentes a interação entre as dosagens e os tipos de substâncias húmicas foram significativos também, com CV de 15.77%.

O comprimento, área, e volume radicular não apresentaram diferenças significativas entre os fatores avaliados, tendo CVs 16.31%, 18.06% e 19.71% respectivamente. O diâmetro médio radicular foi significativo para os ácidos utilizados, apresentando CV de 5.18%

A massa fresca do sistema radicular foi significativa para as doses, a interação entre o extrato de tiririca e as doses utilizadas e para a interação tripla entre o extrato de tiririca, as doses e os tipos de ácidos, com CV de 3.39%. A massa seca foi significativa para as doses, para os tipos de ácidos e para a interação tripla, sendo o CV de 1.11%.

A atividade da enzima H⁺ATPase foi significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste f para o extrato de tiririca, para as doses e para as substâncias húmicas aplicadas. Também para todas as interações duplas e para a interação tripla. O coeficiente de variação foi de 5.42%.

As enzimas relacionadas ao estresse oxidativo avaliadas, catalase, superóxido dismutase, álcool desidrogenase e esterase apresentaram significância ao nível de 5% para

as substâncias húmicas aplicadas, as diferentes doses e ao extrato de tiririca. Também foram significativas todas as interações entre os tratamentos utilizados. Os CVs foram de 1.06 a 2.38%. Tendo em vista todos os coeficientes de variação, o experimento apresentou boa precisão.

A altura e o número de brotos apresentaram curvas semelhantes com o aumento das dosagens de substâncias húmicas. Apresentaram picos nos extremos de dosagem, 0 e 50 mg/dm³ (Figura 1). Resposta na parte vegetativa tem sido cada vez mais vista quando se usa substâncias húmicas, principalmente quando se utiliza o ácido fúlvico, que por ser de menor peso molecular, ele é capaz passar através dos poros das membranas e chega na parte aérea das plantas mais facilmente, mas o ácido húmico embora de elevado peso molecular também exerce influência na parte aérea das plantas (NARDI *et al.*, 2009). Sendo isto comprovado em alguns resultados satisfatórios como o aumento do crescimento de brotos de trigo (TAHIR *et al.* 2011), de pepino (MORA *et al.* 2010), de tomateiro (LULAKIS E PETSAS, 1995; ADANI *et al.* 1998), de milho (EYHERAGUIBEL *et al.* 2008) e de pimenta (CIMRIN *et al.* 2010).

Porém neste caso, com o café arábica, a resposta não foi favorável ao uso dessas substâncias para as brotações, pode ser devido à concentração dos compostos de natureza auxínica presentes nas substâncias húmicas, pois sabe-se que a concentração é diretamente relacionada ao estímulo de raízes ou parte aérea. Como se trabalha com valores muito pequenos de diluição, acertar a concentração correta ainda é um desafio.

Nos pares de folhas ocorreu o mesmo que com as brotações, e ainda na dose 0 mg/dm³ foi maior o número de pares de folhas (Figura 1). As folhas remanescentes apresentaram médias maiores estatisticamente quando se utilizou ácido húmico na dose de 10 mg/dm³ do que o ácido fúlvico (Tabela 2). Ao analisar o desenvolvimento com o aumento das doses de ácido húmico, as folhas remanescentes apresentaram maiores valores aproximadamente na dose 40 mg/dm³ (Figura 2).

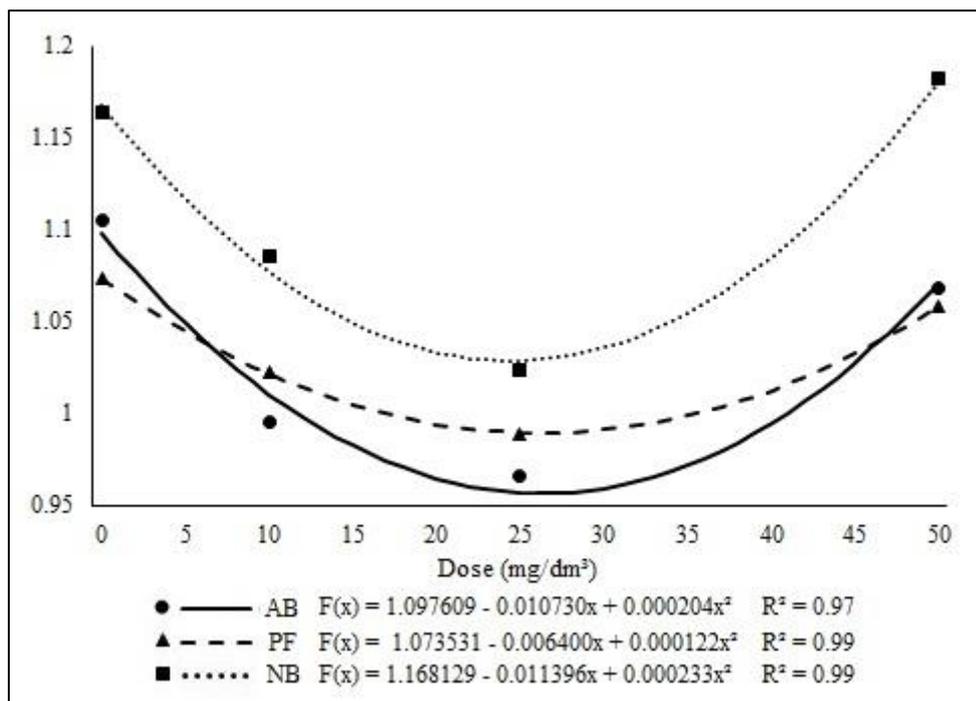


FIGURA 1. Altura do broto (AB) em centímetros, número de pares de folhas (PF) e número de brotos (NB) em função das doses de substâncias húmicas.

As folhas são essenciais para o enraizamento das estacas, pois os metabolitos advindos da fotossíntese em conjunto com as auxinas são de vital importância para a formação raízes (VAN OVERBEEK *et al.* 1946). Ferreira *et al.* (2008) afirmaram que ao emitir brotações antes do início do enraizamento pode ser prejudicial às plantas, mas se acontecer o contrário, emitir as primeiras raízes e depois brotações, pode indicar que a estaca está sendo capaz de formar uma nova planta. Ao deixar um par de folhas remanescentes, espera-se que elas auxiliem neste equilíbrio entre a parte aérea e radicular, até que saiam novas folhas.

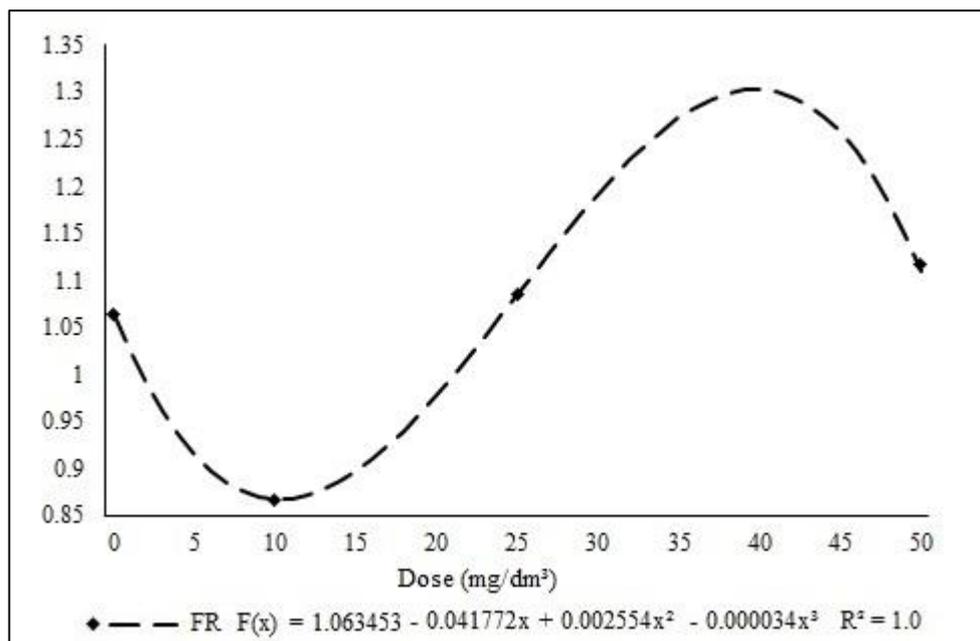


FIGURA 2. Número de folhas remanescentes (FR) em função das doses de substâncias húmicas.

O diâmetro médio das raízes foram maiores quando na presença do ácido húmico (tabela 1). Porém quando se diz respeito de diâmetro radicular, as raízes mais finas, ou seja, com menos diâmetro apresenta uma eficiência maior na absorção de nutrientes, assim, neste caso, o ácido fúlvico foi melhor.

Embora neste experimento com café arábica o comprimento, área e volume não apresentarem diferenças aos tratamentos com substâncias húmicas utilizados, na literatura, o principal efeito visto quando as utiliza para o crescimento de plantas, diz respeito ao sistema radicular, em geral o aumento no crescimento das raízes já foi relatado em milho (CANELLAS *et al.* 2002 e CANELLAS *et al.* 2009; EYHERAGUIBEL *et al.* 2008; JINDO *et al.* 2012), trigo (TAHIR *et al.* 2011; PENG *et al.*, 2001), tomate (ADANI *et al.* 1998; CANELLAS *et al.* 2011), arabidopsis (DOBBSS *et al.* 2010; CANELLAS *et al.* 2010), pimenta (CIMRIN *et al.* 2010), camará (COSTA *et al.* 2008), entre outras culturas.

A massa seca média foi maior quando se utilizou ácido fúlvico (Tabela 1). Os dados de matéria seca são de grande valia para análise de crescimento, pois através deles pode-se comparar diversos fatores em estudo, em várias situações (HUNT, 1990). A enzima H⁺ATPase apresentou melhores valores quando se utilizou ácido húmico no substrato (Tabela 1). A enzima H⁺ATPase que também é conhecida como bomba de prótons, apresenta atividade na membrana plasmática e tem como função auxiliar na

absorção de nutrientes, criando uma força motriz para que os íons passem através da membrana, ao melhorar a atividade pode-se aumentar o aproveitamento dos nutrientes e isso refletir, além do sistema radicular, no desenvolvimento de toda planta (TREVISAN *et al.*, 2010).

Tabela 1. Médias do diâmetro radicular (DM), da matéria seca (MS) e da atividade da enzima H⁺ATPase.

	Médias		
	DM (cm)	MS (g)	H ⁺ (U/ml)
AH	1.530 b	1.015 b	1.207 a
AF	1.572 a	1.024 a	0.985 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, teste Scott-Knot, $p < 0,05$.

A massa fresca e seca oscilaram com o aumento das dosagens, os tipos dos ácidos e a presença ou ausência do extrato de tiririca. Quando utilizou ácido húmico sem o extrato de tiririca na estaca, tanto massa fresca quanto seca apresentaram um pico na dose 10 mg/dm³ (Figura 3). Ao adicionar o extrato de tiririca aos tratamentos, somente a massa fresca se mostrou significativa, aumentando com o aumento das dosagens (Figura 4). Quando se utilizou o ácido fúlvico sem o extrato de tiririca, a massa fresca apresentou duas altas, na dose 10 e 50 mg/dm³, enquanto a massa seca variou pouco, apresentando um pico na dose 10 mg/dm³ (Figura 5). Ao utilizar o extrato de tiririca com o ácido fúlvico a massa fresca também teve um pico na dose 10 mg/dm³, e a massa seca apresentou aumento após a dose 40 mg/dm³ (Figura 6). O extrato de tiririca influenciou mais quando o substrato estava tratado com ácido húmico que fúlvico, podendo ser um indício das combinações das auxinas presentes no ácido húmico e no extrato. Morard *et al.* (2011) encontraram respostas satisfatórias nos cultivos de pepino, milho, pelargônio e trigo, analisadas com substâncias húmicas quanto a massa fresca das raízes, bem como de outras partes das plantas, além de observar um efeito bioestimulante delas.

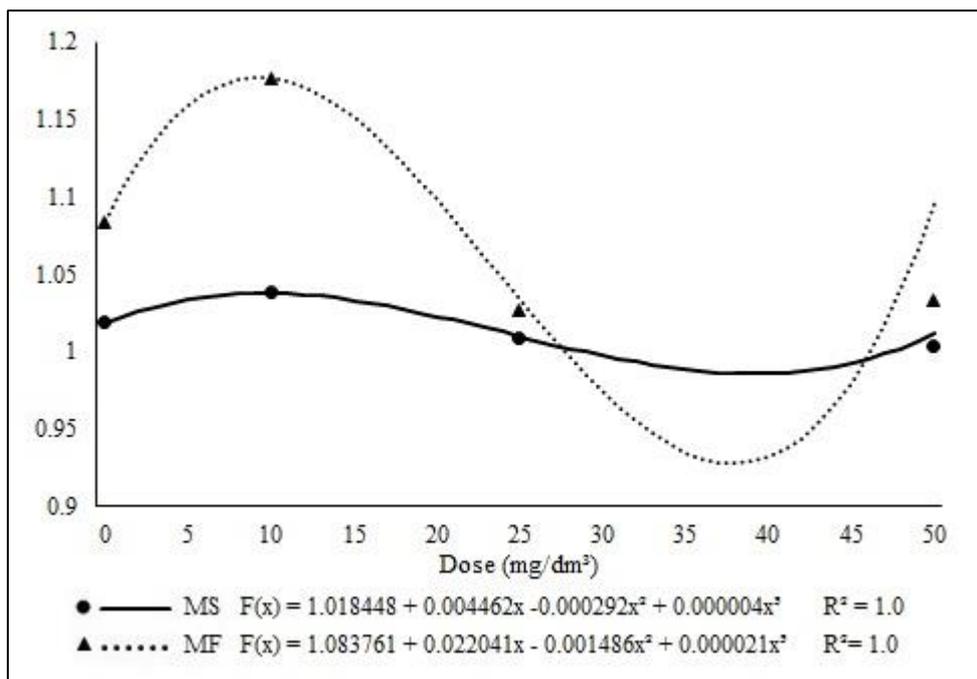


Figura 3. Massa seca (MS) e massa fresca (MF) do sistema radicular, expresso em gramas, em função das dosagens de ácido húmico sem o extrato de tiririca.

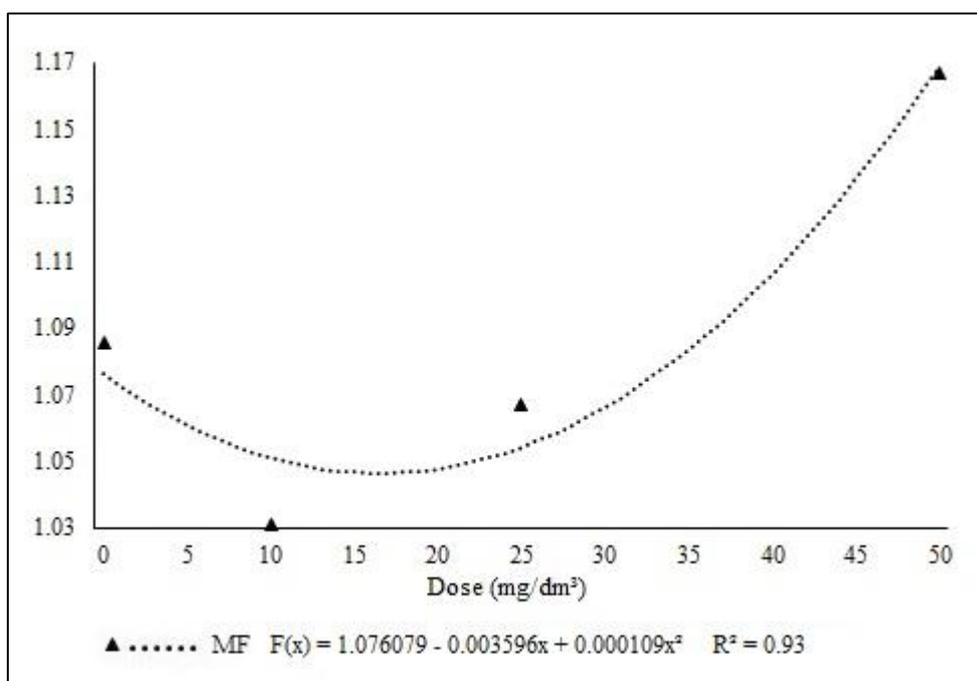


Figura 4. Massa fresca (MF) do sistema radicular, expresso em gramas, em função das dosagens de ácido húmico com o extrato de tiririca.

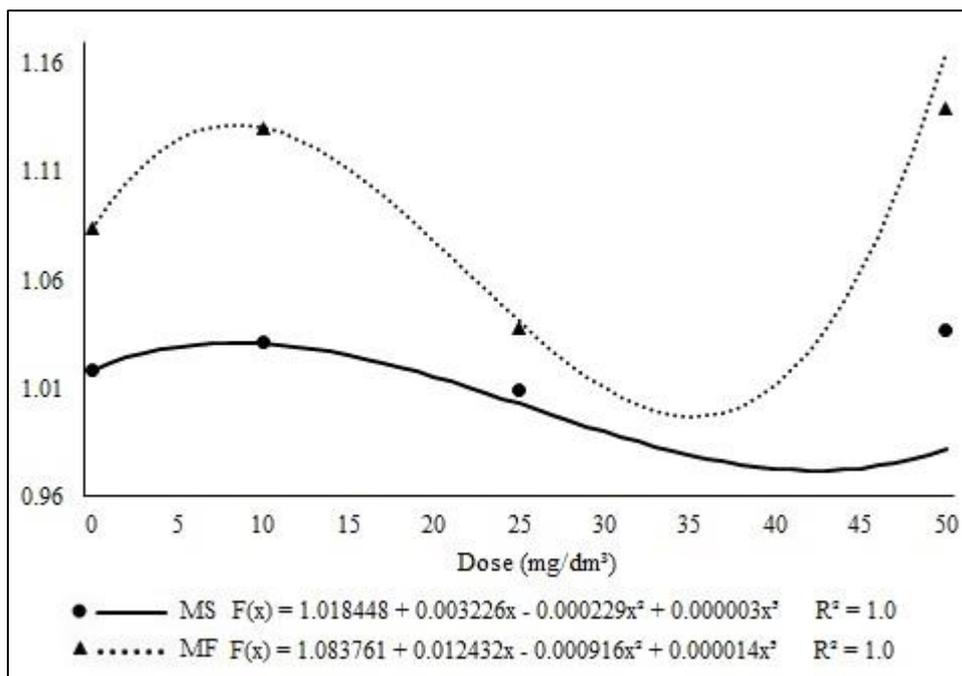


Figura 5. Massa seca (MS) e massa fresca (MF) do sistema radicular, expresso em gramas, em função das dosagens de ácido fúlvico sem o extrato de tiririca.

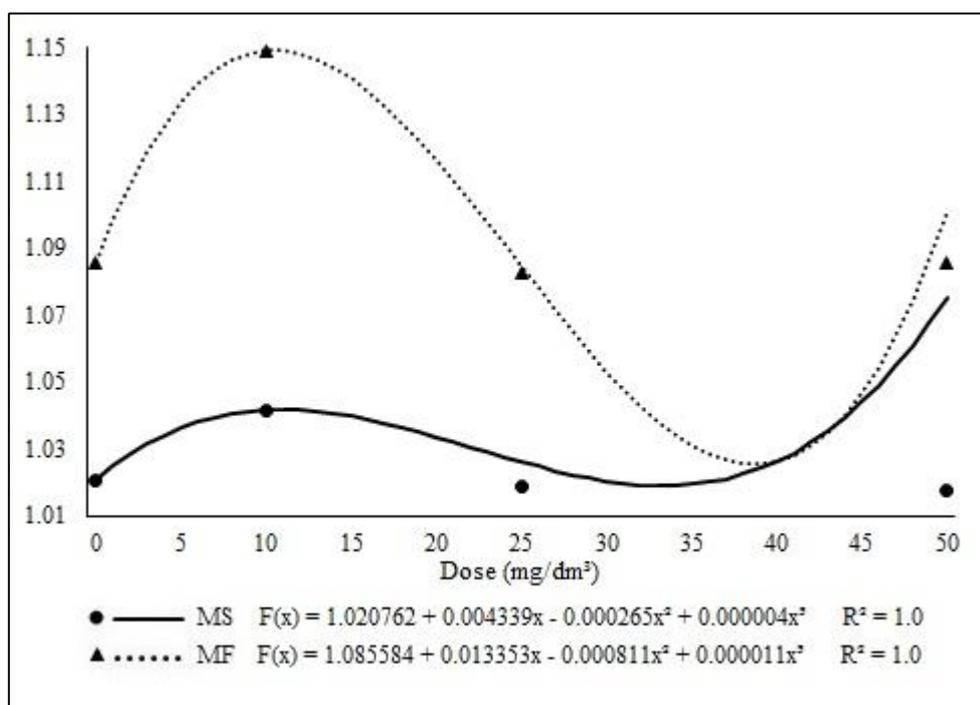


Figura 6. Massa seca (MS) e massa fresca (MF) do sistema radicular, expresso em gramas, em função das dosagens de ácido fúlvico com o extrato de tiririca.

A atividade da enzima H⁺ATPase apresentou maiores médias para o ácido húmico em todas as doses utilizadas (Tabela 2), exceto na dose 0 mg/dm³, que não foi significativa. Ao utilizar o ácido húmico a enzima aumenta linearmente a atividade com o aumento das dosagens, enquanto o ácido fúlvico o aumento foi quadrático e mais sutil com o aumento das doses, além de cair depois de certo ponto (Figura 7). O estímulo no aumento da atividade da enzima H⁺ATPase poderia representar também um estímulo para o aumento do sistema radicular, Canellas *et al.* (2009) mostraram que os ácidos húmicos aumentaram a atividade da H⁺ATPase nas células da raiz, causando um aumento na área e volume do sistema radicular, e também sugeriu que os ácidos são capazes de interagir na rizosfera e induzir a liberação de compostos semelhantes à auxinas que promovem o crescimento das raízes. Neste caso com café arábica, aumentou-se a atividade da enzima sem refletir nas raízes.

Tabela 2. Médias do número de folhas remanescentes (FR) e da atividade da enzima H⁺ATPase dentro de cada dosagem significativa, analisando os ácidos.

	10 mg/dm ³		25 mg/dm ³	50 mg/dm ³
	FR	H ⁺ (U/ml)	H ⁺ (U/ml)	H ⁺ (U/ml)
AH	0.867 a	1.150 a	1.260 a	1.654 a
AF	1.137 b	1.022 b	1.060 b	1.093 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, teste Scott-Knot, p<0,05.

A massa fresca, quando se utilizou a dosagem 10 mg/dm³ de substância húmica, apresentou maiores médias na ausência do extrato de tiririca, e nas dosagens de 25 e 50 mg/dm³ as médias foram maiores na presença do extrato. A atividade da enzima H⁺ATPase obteve maiores médias quando se utilizou o extrato nas dose 10 e 25 mg/dm³, e na dose 50 a maior média foi na ausência do extrato (Tabela 3). Isso é explicado pela diferença nas concentrações de auxinas, quando se mistura o extrato de tiririca e as substancias húmicas em diferentes doses. No caso da massa fresca, a menor dose de substância húmica com o extrato, pode ser que não tenha atingido a concentração de auxina capaz de estimular positivamente, e no caso da H⁺ATPase acontece o contrário, na maior dose com o extrato, pode ter havido maiores concentrações de auxinas, causando uma toxidez.

Tabela 3. Médias da massa fresca (MF) e da atividade da enzima H⁺ATPase dentro de cada dosagem significativa, analisando o extrato de tiririca.

	10 (mg/dm ³)		25 (mg/dm ³)		50 (mg/dm ³)	
	MF (g)	H ⁺ (U/ml)	MF (g)	H ⁺ (U/ml)	MF (g)	H ⁺ (U/ml)
S/	1.153 a	0.995 b	1.032 b	1.063 b	1.087 b	1.393 a
C/	1.090 b	1.177 a	1.075 a	1.256 a	1.126 a	1.354 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, teste Scott-Knot, p<0,05.

Analisando somente a interação do extrato de tiririca com os ácidos utilizados no experimento, no geral a maior média na atividade da enzima H⁺ATPase foi quando se emergiu as estacas no extrato e utilizou o ácido húmico no substrato (Tabela 4). Ao analisar as doses separadamente os resultados foram semelhantes, quando se utiliza o ácido fúlvico as maiores médias são na ausência do extrato, com exceção da dose 50mg/dm³ (Tabela 5). Não há relatos anteriores sobre os efeitos do extrato de tiririca sobre a atividade enzimática da H⁺ATPase, porém é notável que no café arábica ele causou um ligeiro aumento na atividade. Porém com substâncias húmicas há diversos relatos na literatura da melhora na atividade desta enzima. Em estudos com espécies de café e milho, a utilização de substâncias húmicas apontou uma ativação da membrana plasmática, mais especificamente, a H⁺ATPase, concluindo que isto é um possível marcador metabólico que garante ao ácido húmico a capacidade de participar de forma ativa em reações biológicas (FAÇANHA *et al.*, 2002).

Tabela 4. Média da atividade da enzima H⁺ATPase, analisando a interação entre o extrato de tiririca e os ácidos utilizados no experimento.

	H ⁺ (U/ml)	
	S/	C/
AH	1.098 bA	1.315 aA
AF	1.007 aB	0.962 bB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, e maiúscula na coluna, não diferem entre si, teste Scott-Knott, p<0,05.

A massa fresca e seca na dose de 10 mg/dm³ apresentaram maiores médias na presença do extrato de tiririca, e quando tratados com ácido fúlvico. Já na dose 50 mg/dm³, a massa fresca apresentou maior média, quando tratadas com ácido húmico, na presença do extrato, e quando tratadas com ácido fúlvico, na ausência do extrato. A massa seca das raízes do tratamento com ácido húmico apresentou maior média na presença do extrato (Tabela 5). Souza *et al.* (2012) ao avaliar o efeito do extrato de tiririca no enraizamento de folhas de *Solanum lycopersicum*, obteve valores de massa fresca e seca

satisfatórios ao enraizamento, tendo em vista ser um tratamento orgânico, os resultados foram promissores para a utilização do extrato.

Tabela 5. Médias da massa fresca (MF), massa seca (MS) e atividade da enzima H+ATPase nas doses significativas, analisando o extrato de tiririca e os ácidos.

	10 mg/dm ³							
	MF (g)		MS (g)		H+ (U/ml)			
	S/	C/	S/	C/	S/		C/	
AH	1.176 aA	1.031 bB	1.038 aA	1.010 bB	0.959 bB		1.340 aA	
AF	1.130 aA	1.149 aA	1.031 aA	1.041 aA	1.030 aA		1.014 aB	
	25 mg/dm ³				50 mg/dm ³			
	H+ (U/ml)		MF (g)		MS (g)		H+ (U/ml)	
	S/	C/	S/	C/	S/	C/	S/	C/
AH	1.028 bB	1.491 aA	1.034 bB	1.167 aA	1.003 aB	1.019 aA	1.647 aA	1.662 aA
AF	1.099 aA	1.021 bB	1.139 aA	1.086 bB	1.037 aA	1.018 bA	1.139 aB	1.046 bB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, e maiúscula na coluna, não diferem entre si, teste Scott-Knott, $p < 0,05$.

O aumento da atividade da enzima H+ATPase foi linear para o ácido húmico na ausência do extrato de tiririca, porém quando se adicionou o extrato no tratamento, causou um aumento quadrático em doses menores de ácido húmico. Para o ácido fúlvico tanto na presença quanto na ausência do extrato teve um sutil aumento quadrático (Figura 8). Tendo em vista esses resultados para a enzima, é evidente que é mais estimulada quando tratada com ácido húmico, quanto ao extrato, ele alterou pouco os resultados, mas o que o pouco foi benéfico e se mostrou significativo.

Dias *et al.* 2012, ao analisar a utilização do extrato de tiririca no enraizamento de estacas de café canéfora, não encontrou neste extrato uma alternativa viável para a indução do enraizamento de estacas, mesmo com o aumento do tempo de imersão. Na cultura da cevada, o extrato de tiririca causou inibição no alongamento da radícula (FRIEDMAN; HOROWITZ, 1970). Também em mofumbo, o extrato não foi suficiente para promover o enraizamento das estacas (OLIVEIRA *et al.*, 2014). O mesmo efeito foi visto em duranta (REZENDE *et al.*, 2013). Entretanto para sapoti (ARRUDA *et al.*, 2009), mandioca (MAHMOUD *et al.*, 2009), cana-de-açúcar (ALVES NETO; CRUZ-SILVA, 2008) e pinhão-manso (SILVA, 2007), a utilização do extrato de tiririca para o enraizamento foi de grande valia.

Embora a tiririca possua em grandes quantidades o hormônio AIB nas folhas e raízes, ela também possui muitos outros constituintes capazes de produzir respostas alelopáticas negativas quando em contato com algumas espécies (ANDRADE *et al.*,

2009; FANTI, 2008), isto seria uma das hipóteses para o fato do extrato não influenciar bem as respostas neste trabalho.

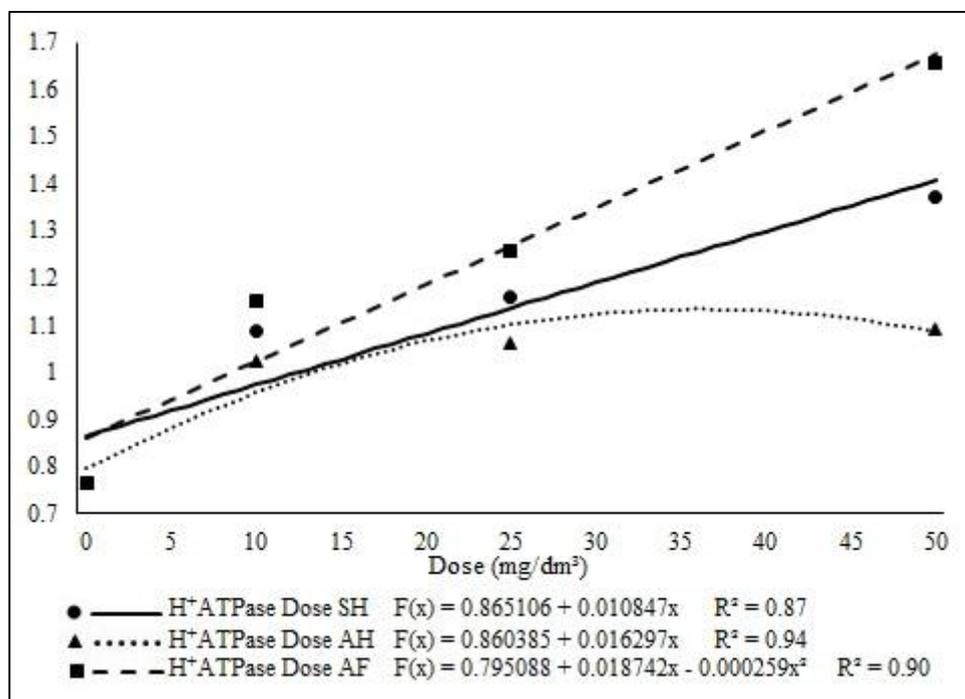


Figura 7. Atividade da enzima H⁺ATPase (U/ml) em função da dose de substâncias húmicas (SH), e para os ácidos significativos da interação entre as doses e os tipos de ácidos, ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF).

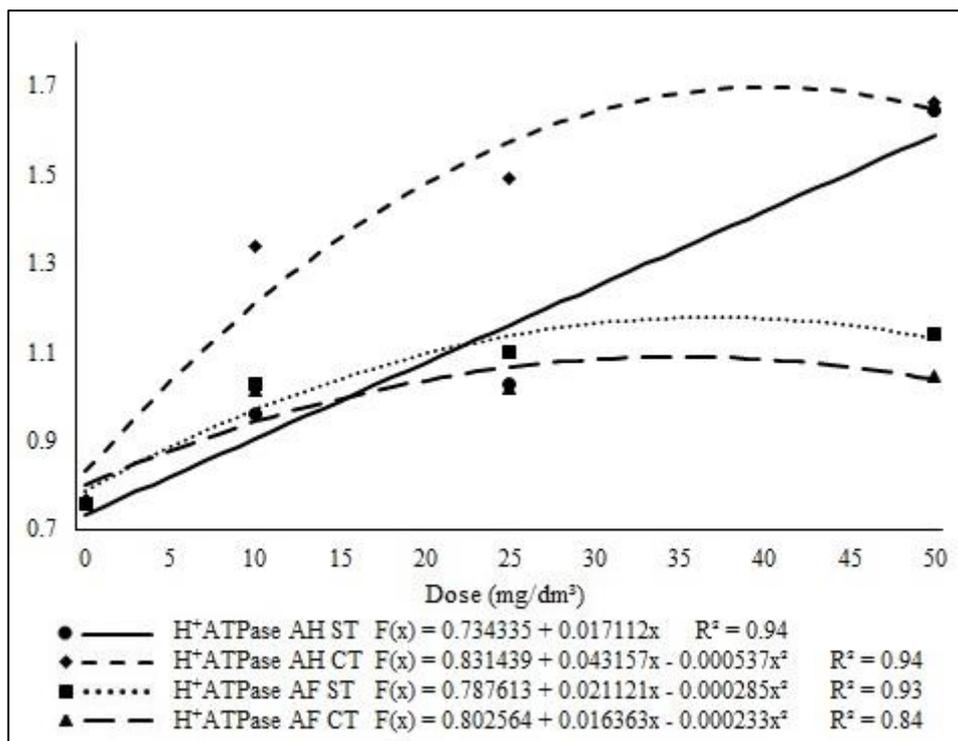


Figura 8. Atividade da enzima H⁺ATPase (U/ml) em função das doses de ácido húmico na ausência do extrato de tiririca (AH ST), das doses de ácido húmico na presença do extrato de tiririca (AH CT), das doses de ácido fúlvico na ausência do extrato de tiririca (AF ST), das doses de ácido fúlvico na presença do extrato de tiririca (AF CT).

A catalase, superóxido dismutase e álcool desidrogenase apresentam as médias de suas atividades superiores quando na presença do extrato de tiririca que na ausência. Porém a esterase a média foi maior na ausência de extrato. Na relação contrária, tanto na presença quanto na ausência do extrato, o ácido húmico apresentou médias estatisticamente superiores nas atividades da catalase, superóxido dismutase e álcool desidrogenase, porém para a esterase o ácido fúlvico teve maiores médias nas estacas com e sem extrato de tiririca (Tabela 6).

Estas enzimas avaliadas são importantes no combate ao estresse causado pelas espécies reativas de oxigênio, que podem se tornar grandes vilãs no processo de formação de mudas por propagação vegetativa no café, elas são capazes de ocasionar a peroxidação lipídica na membrana plasmática e isso pode culminar na morte da célula e até das estacas. Dentre essas espécies reativas de oxigênio temos as que mais afetam as plantas que são o radical ânion superóxido (O₂⁻), o radical hidroxila (HO⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que são produzidas a partir do mal funcionamento de algumas vias metabólicas,

mas também do funcionamento normal de outras vias (VANDENABEELE, 2000; WANG *et al.*, 2012).

Tabela 6. Médias das atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH) e esterase (EST), analisando o extrato de tiririca e os ácidos.

	CAT		SOD		ADH		EST	
	S/	C/	S/	C/	S/	C/	S/	C/
AH	1.398 bA	1.723 aA	4.371 bA	5.384 aA	2.733 bA	3.366 aA	6.012 aB	4.568 bB
AF	0.864 aB	0.605 bB	2.701 aB	1.891 bB	1.689 aB	1.182 bB	6.649 aA	6.087 bA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, e maiúscula na coluna, não diferem entre si, teste Scott-Knott, $p < 0,05$.

No caso das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo o aumento nos valores não é indicativo de melhora, e sim é indício de que está havendo algum tipo de estresse no meio, o que pode ser devido aos tratamentos utilizados. Segundo a tabela 7, na dose 10 mg/dm³ as enzimas catalase, superóxido dismutase e álcool desidrogenase nos tratamentos com ácido fúlvico apresentaram menor estresse na ausência do extrato, e ácido húmico, na presença do extrato, para a esterase o menor estresse foi com ácido húmico na ausência do extrato. Na dose 25 mg/dm³, a catalase, superóxido dismutase e álcool desidrogenase mostraram que as estacas sofreram menor estresse quando utilizou ácido fúlvico independente do extrato, e a esterase no tratamento com ácido húmico com o extrato de tiririca. Na dose 50 mg/dm³, as quatro enzimas expressaram o menor estresse quando o tratamento foi com ácido fúlvico na presença do extrato, com exceção da esterase que foi na ausência do extrato. Isso se deve às concentrações dos compostos presentes no extrato e nas substâncias húmicas, uma vez que não são só auxinas presentes neles, tudo pode influenciar. De maneira geral, o ácido fúlvico e a utilização do extrato de tiririca foi onde se obteve os menores estresses.

Os ácidos húmicos são solúveis em meios básicos e os ácidos fúlvicos são solúveis em meios alcalinos e ácidos (STEVENSON 1994, BERBARA E GARCÍA 2014), assim independente do pH do substrato, os ácidos fúlvico estarão dissolvidos na solução e prontamente disponíveis para a planta absorver. Outra característica do ácido é o seu peso molecular que é baixo, isso facilita que ele passe pela membrana plasmática nas raízes (BOCANEGRA *et al.*, 2006) e assim poder mover dentro da planta e interagir ou até influenciar na fisiologia e metabolismo (ANJUM *et al.*, 2011).

Tabela 7. Médias das atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH) e esterase (EST) nas doses significativas, analisando o extrato de tiririca e os ácidos.

	10 mg/dm ³							
	CAT		SOD		ADH		EST	
	S/	C/	S/	C/	S/	C/	S/	C/
AH	0.987 aA	0.187 bB	3.084 aA	0.584 bB	1.928 aA	0.365 bB	3.566 bB	4.512 aB
AF	0.263 aB	0.273 aA	0.823 aB	0.854 aA	0.534 aB	0.515 aA	9.540 aA	6.791 bA
	25 mg/dm ³							
	CAT		SOD		ADH		EST	
	S/	C/	S/	C/	S/	C/	S/	C/
AH	0.820 bA	2.200 aA	2.563 bA	6.877 aA	1.603 bA	4.300 aA	6.907 aA	2.279 bB
AF	0.110 aB	0.143 aB	0.448 aB	0.344 aB	0.280 aB	0.215 aB	6.922 bA	7.130 aA
	50 mg/dm ³							
	CAT		SOD		ADH		EST	
	S/	C/	S/	C/	S/	C/	S/	C/
AH	1.003 bA	2.550 aA	3.136 bA	7.971 aA	1.961 bA	4.984 aA	9.872 aA	7.592 bA
AF	0.257 aB	0.093 bB	0.802 aB	0.292 bB	0.502 aB	0.182 bB	6.430 bB	6.537 aB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha, e maiúscula na coluna, não diferem entre si, teste Scott-Knott, $p < 0,05$.

A catalase, superóxido dismutase e álcool desidrogenase apresentaram queda na atividade com o aumento das dosagens de ácido húmico nos tratamentos sem o extrato de tiririca, até um mínimo aproximadamente na dose 30 mg/dm³, a enzima esterase aumenta linearmente com o aumento das doses (Figura 9). Quando se utiliza o extrato de tiririca nos tratamentos, as mesmas três enzimas quase anulam a atividade na dose 10 mg/dm³, e a esterase tem uma queda até a dose 25 mg/dm³, depois tem um sutil aumento (Figura 10). Quando os tratamentos são com o ácido fúlvico, tanto na presença quanto na ausência do extrato, as enzimas catalase, superóxido dismutase e álcool desidrogenase chegam a zerar aproximadamente na dose 20 mg/dm³, e a esterase embora oscile a atividade, o menor valor continuou sendo na dose 0 nas duas situações (Figuras 11 e 12). Ficou evidente que o extrato de tiririca interage com o ácido húmico, fazendo com que neste tipo de situação, diminua a dose do ácido se utilizar o extrato. Já a interação com o ácido fúlvico não fica tão clara.

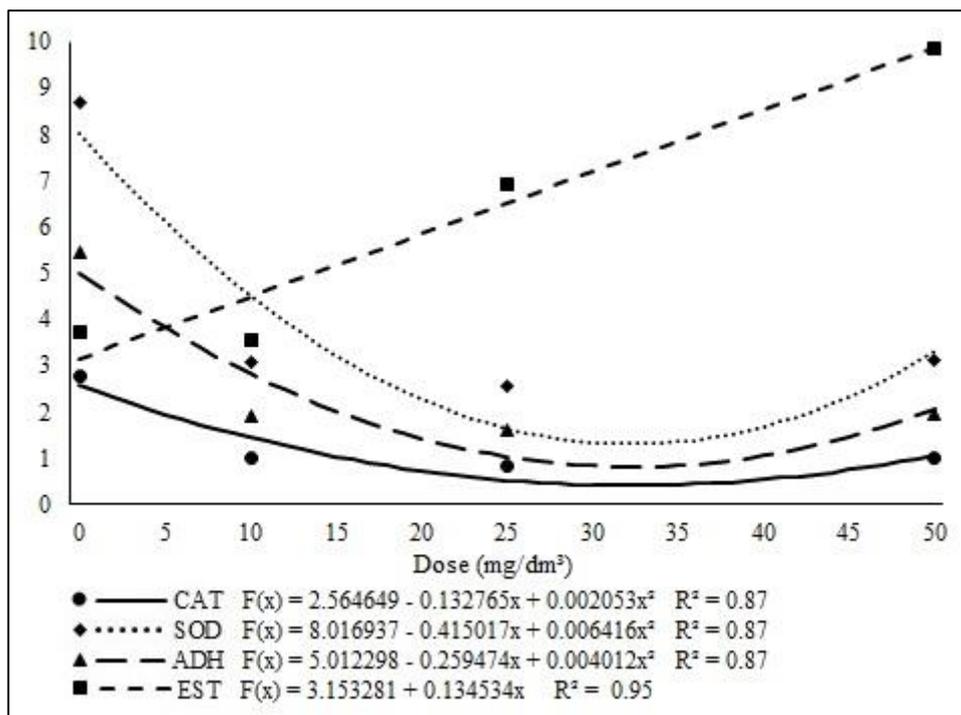


Figura 9. Atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH) e esterase (EST) em função das doses de ácido húmico na ausência do extrato de tiririca.

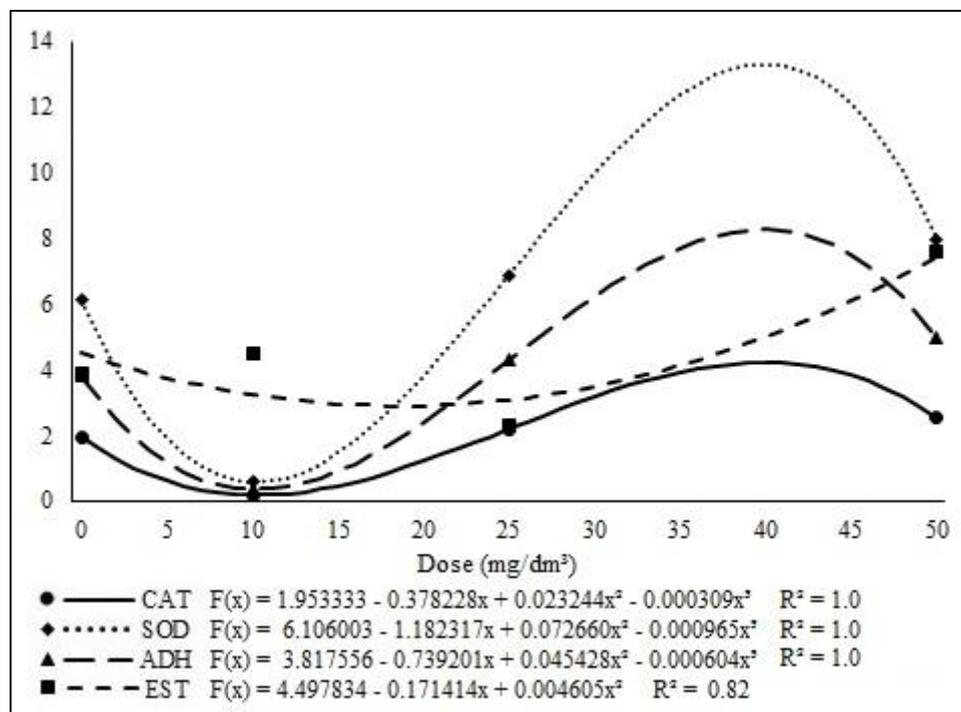


Figura 10. Atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH) e esterase (EST) em função das doses de ácido húmico na presença do extrato de tiririca.

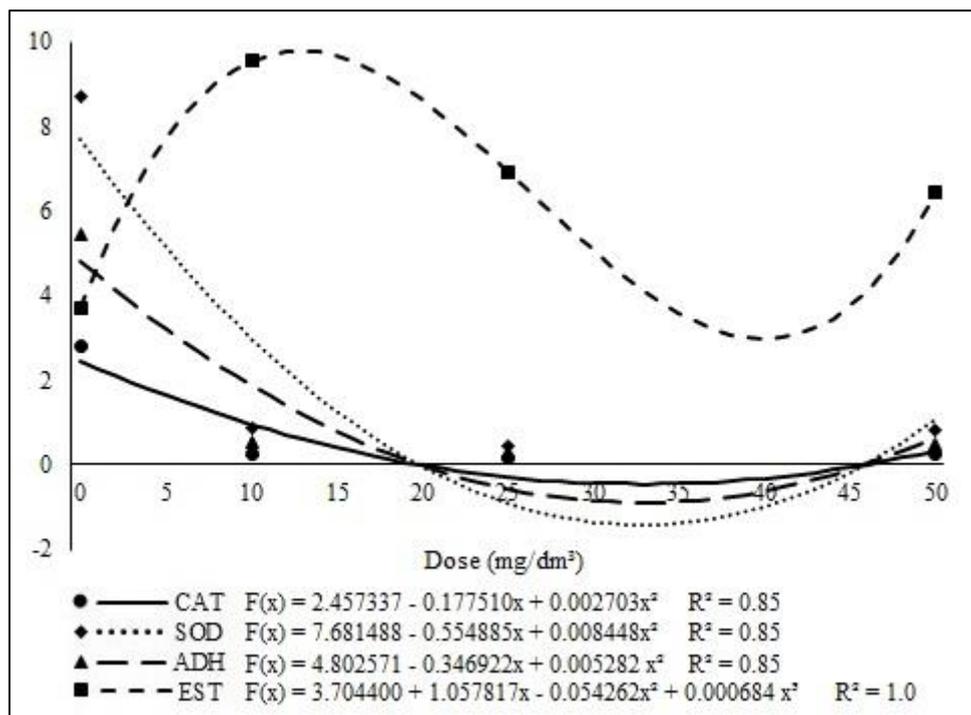


Figura 11. Atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH) e esterase (EST) em função das doses de ácido fúlvico na ausência do extrato de tiririca.

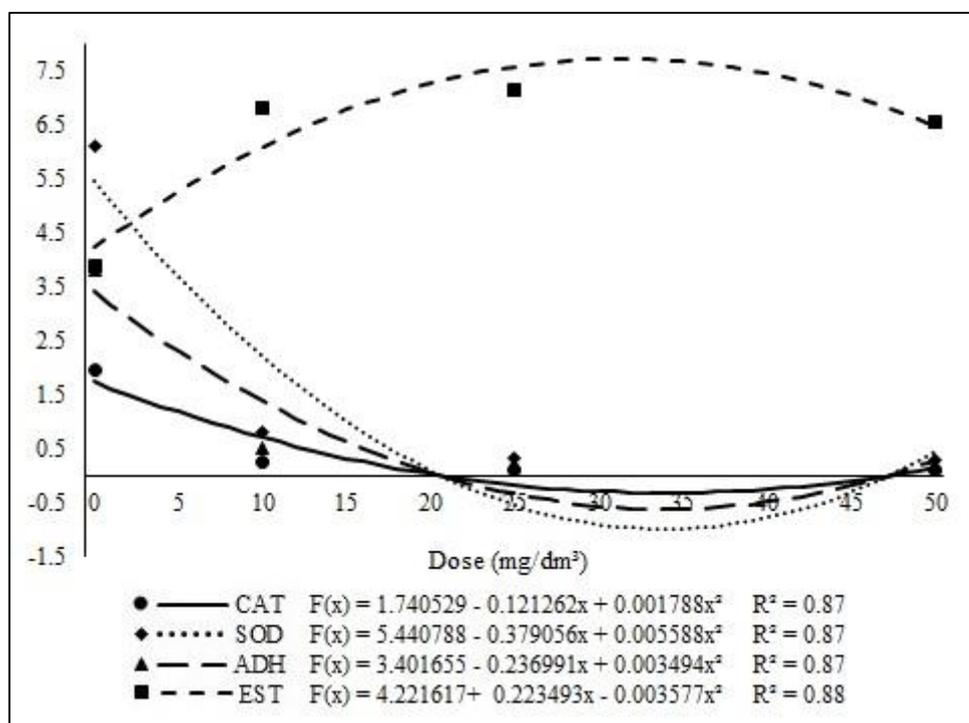


Figura 12. Atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), álcool desidrogenase (ADH) e esterase (EST) em função das doses de ácido fúlvico na presença do extrato de tiririca.

Na literatura não há relatos de estudos sobre os efeitos do extrato de tiririca em enzimas antioxidantes, porém sabe-se que o extrato aquoso e alcoólico de tiririca possui terpenos, esteroides, flavonoides, alcaloides e taninos (CONCI, 2004), e que além destes ainda possuem os fenóis (CATUNDA *et al.*, 2002) que atuam diretamente no sistema AIA-oxidase/peroxidase das plantas, regulando e inibindo a oxidação do ácido indolacético (QUAYYUM *et al.*, 2000).

As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em diversos processos metabólicos de plantas, incluindo a regulação e o desenvolvimento do crescimento das plantas, e também nas respostas a estresses bióticos e abióticos (SUZUKI *et al.*, 2012). O processo de estaquia é um grande estresse que se realiza nas mini estacas, e as substâncias húmicas se mostraram como uma auxílio para amenizar as consequências deste estresse. Para proteger os lipídeos da peroxidação, os ácidos húmicos auxiliam na ativação das enzimas antioxidantes, auxiliando no combate às espécies reativas de oxigênio (GARCÍA *et al.* 2014).

2.2.4 Conclusões

Na parte aérea a melhor dose de substâncias húmicas foi a 0 mg/dm³. Na parte radicular houve benefícios com a dose de 10 mg/dm³, preferencialmente de ácido húmico na presença do extrato de tiririca. Os menores estresses oxidativos foram vistos na dose de 10 mg/dm³ dos tratamentos com ácido húmico ou fúlvico, independente da utilização do extrato. Porém, diante disto, ainda são necessário análises e estudos mais profundos acerca da utilização do extrato de tiririca e das substâncias húmicas na cultura do café arábica.

2.2.5 Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Agricultura, à Agência de Inovação do Café, ao Núcleo de estudos em melhoramento e clonagem (NEMEC), ao Setor de Sementes e seus funcionários, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências Bibliográficas

- ADANI, F. *et al.* *The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition.* **J Plant Nutr** v. 21, p. 561–575, 1998.
- ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**, 2.ed. Viçosa: Ed. da UFV, 627p, 2006.
- ALMEIDA, G. R. R. *et al.* Resposta a estresse hídrico e comportamento em condições de campo de cafeeiros propagados por embriogênese somática. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil, Águas de Lindóia. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2007.
- ALVES NETO, A. J.; CRUZ-SILVA, C. T. A. **Efeito de diferentes concentrações de extratos aquosos de tiririca (*Cyperus rotundus* L.) sobre o enraizamento de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. Monografia (Graduação em Agronomia) - Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, 2008.
- ANDRADE, H. M. *et al.* Potencial alelopático de *Cyperus rotundus* L. sobre espécies cultivadas. **Ciência e Agrotecnologia** v.33, p. 1984-1990, 2009.
- ANJUM S. A. *et al.* *Fulvic acid application improves the maize performance under well-watered and drought conditions.* **J Agron Crop Sci**, v. 197, p. 409–417, 2011.
- ARRUDA, L. A. M. *et al.* Atividade hormonal do extrato de tiririca na rizogênese de estacas de sapoti. In: Jornada de ensino, pesquisa e extensão da UFRPE-JEPEX, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2009.
- BERBARA R. L. L., GARCÍA A. C. *Humic substances and plant defense metabolism.* In: Ahmad P, Wani MR (eds) *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment: volume 1.* **Springer Science+Business Media**, New York, pp 297– 319, 2014.
- BOCANEGRA, M. P. *et al.* *Plant uptake of iron chelated by humic acids of different molecular weights.* **Commun Soil Sci Plant Anal** v. 37, p. 1–2, 2006.
- BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-54, 1976.
- BRAGANÇA, S. M. *et al.* Formação de mudas. In: _____. **Manual técnico para a cultura do café no Estado do Espírito Santo**. Vitória: Secretaria de Estado de Agricultura, p. 19-28, 1995.

- BUENO, L. C. S. *et al.* **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos.** 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.
- CANELLAS, L. P. *et al.* *Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid.* **Chemosphere** v.78, p. 457–466, 2010.
- CANELLAS, L. P. *et al.* *Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺ATPase activity in maize roots.* **Plant Physiol** v. 130, p. 1951–1957, 2002.
- CANELLAS, L. P. *et al.* *Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants.* **Ann Appl Biol** v. 159, p. 202–211, 2011.
- CANELLAS, L. P. *et al.* *Relationships between chemical characteristics and root growth promotion of humic acids isolated from Brazilian oxisols.* **Soil Sci** v. 174, p. 611–620, 2009.
- CARVALHO, M. **Comportamento em pós plantio de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) propagados vegetativamente.** 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, 2005.
- CATUNDA, M. G. *et al.* Efeitos de extrato aquoso de tiririca sobre a germinação de alface, pimentão e jiló e sobre a divisão celular na radícula de alface. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 49, p. 1-11, 2002.
- CIMRIN, K. M. *et al.* *Phosphorus and humic acid application alleviate salinity stress of pepper seedling.* **Afr J Biotechnol**, v. 9, p. 5845–5851, 2010.
- CONCI, F. R. **Utilização de extrato aquoso e alcoólico de *Cyperus rotundus* (tiririca) como fitorregulador de enraizamento de *Lagerstroemia indica* (Extremosa) e da *Hydrangea macrophila* (Hortênsia).** 44 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Comunitária Regional de Chapecó, Chapecó, 2004.
- COSTA G. *et al.* *Effects of humic substances on the rooting and development of woody plant cuttings.* **Acta Hort**, v. 779, p. 255–261, 2008.
- DE MICHELIS, M. I.; SPANSWICK, R. M. *H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots.* **Plant Physiol.**, v. 81, p. 542-547, 1986.
- DIAS, J. R. M. *et al.* Enraizamento de estacas de cafeeiro imersas em extrato aquoso de tiririca. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 3, p. 259-266, set./dez. 2012.
- DOBBS, L. B. *et al.* *Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth.* **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 3681–3688, 2010.

- EYHERAGUIBEL, B. *et al.* Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4206-4212. 2008.
- FAÇANHA, A. R. *et al.* Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1301-1310, set. 2002.
- FAÇANHA, A.R.; DE MEIS, L. Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. **Plant Physiol.**, v. 108, p. 241-246, 1995.
- FANTI, F. P. **Aplicação de extratos de folhas e de tubérculos de *Cyperus rotundus* L. (*Cyperaceae*) e de auxinas sintéticas na estaquia caular de *Duranta repens* L. (*Verbenaceae*).** 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- FERREIRA, Daniel Furtado. *Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons.* **Ciênc. agrotec.** [online], vol.38, n.2, p. 109-112, 2014.
- FERREIRA, G. *et al.* Enraizamento de estacas de atemoieira ‘gefner’ tratadas com auxinas. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, v. 30, n. 4, p. 1083-1088, Dezembro, 2008.
- FISKE, C. F.; SUBBAROW, L. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, v. 66, p. 375-400, 1925.
- FRIEDMAN, T.; HOROWITZ, M. Phytotoxicity of subterranean residues of three perennial weeds. **Weed Research**, New York, v. 10, p. 382-385, 1970.
- GARCÍA A.C. *et al.* Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). **Journal of Geochemical Exploration**, v. 136, p. 48-54, 2014.
- GIANNOPOLITIS, C. N. *et al.* Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.** V. 59, p. 309-314, 1977.
- GUIMARÃES, P. T. G. *et al.* A produção de mudas de cafeeiros em tubetes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 98-109, maio/jun. 1998.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIS JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices.** Ed. 7, 880p. New York: Englewood Clippis, 2002.
- HAVIR, E. A.; MC HALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol**, v. 84(2), p. 450-455. Jun 1987.
- HUNT, R. **Basic growth analysis.** London: Unwin Hyman, 112 p., 1990.

- JINDO, K. *et al.* Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant Soil*, v. 353, p. 209-220, 2012.
- JORGE, L. A. de C.; RODRIGUES, A. F. de O. Safira: sistema de análise de fibras e raízes. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento EMBRAPA**. São Carlos, p. 20. 2010.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.
- LULAKIS, M. D.; PETSAS, S. I. Effect of humic substances from vine-canecan mature compost on tomato seedling growth. *Bioresour Technol* v. 54, p. 179–182, 1995.
- MAHMOUD, T. S. *et al.* Avaliação do efeito de hormônio natural, sintético e indutor no desenvolvimento da primeira fase de brotação das estacas de *Manihot esculenta* Crantz. In. XIII Congresso Brasileiro de Mandioca. **RAT - Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, p. 621-625, 2009.
- MORA V. *et al.* 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. *J Plant Physiol* v. 167, p. 633–642, 2010.
- MORARD, P. *et al.* Direct effects of humic-like substance on growth, water, and mineral nutrition of various species. *Journal of Plant Nutr.* v. 34, p. 46–59, 2011.
- NARDI, S. *et al.* Biological activities of humic substances. In: Senesi N, Xing B, Huang PM (eds) **Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems**. Wiley, Hoboken, p 305–339, 2009.
- OLIVEIRA, D. H. *et al.* Influência do comprimento de estacas e ambientes, no crescimento de mudas cafeeiras obtidas por enraizamento. *Coffee Science*, Lavras, v. 5, n. 2, p. 183-189, maio/ago. 2010.
- OLIVEIRA, D. M. *et al.* Estaquia para propagação vegetativa do mofumbo. **Revista Verde** (Mossoró – RN - Brasil), v 9. , n. 1 , p. 163 – 167, 2014.
- PAULINO, A. J. *et al.* Cultura do café conillon: instruções técnicas sobre a cultura do café no Brasil. Rio de Janeiro: **MIC- IBC-DIPRO**, 43 p, 1987.
- PENG, A. *et al.* The effect of fulvic acid on the dose effect of selenite on the growth of wheat. *Biol Trace Elem Res*, v. 83, p. 275–279, 2001.
- PIRES, E. J. P.; BIASI, L. A. Propagação da videira. In: POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 295-350, 2003.

- QUAYYUM, H. A., MALLIK, A. U., LEACH, D. M., GOTTARDO, C. *Growth inhibitory effects of nutgrass (Cyperus rotundus L.) on rice (Oryza sativa) seedlings. Journal of Chemical Ecology*, 26: 2221-2231. 2000.
- REZENDE, F. P. F. *et al.* Aplicação de extratos de folhas e tubérculos de *Cyperus rotundus* L. e de auxinas sintéticas na estaquia caulinar de *Duranta repens* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.4, supl.I, p.639-645, 2013.
- RONCATTO, G. *et al.* Enraizamento de estacas de espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) no inverno e no verão. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 4, p. 1089- 1093, 2008.
- SILVA, C. D. **Enraizamento de estacas de pinhão manso (*Jatropha curcas* L).** 36p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, 2007.
- SIMPSON, A. J. *et al.* *Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. Naturwissenschaften* vv. 89, p. 84– 88, 2002.
- SOUZA, M. F., *et al.* Efeito do extrato de *Cyperus rotundus* na rizogênese. **Revista de Ciências Agrárias**, vol. 35, 1, 15: 157-162, jan/jun 2012.
- STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions.** Wiley, New York, 1994.
- SUZUKI N. *et al.* *ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. Plant Cell Environ* v. 35, p. 259–270, 2012
- TAHIR, M. M. *et al.* *Lignite-derived humic acid effect on growth of wheat plants in different soils. Pedosphere* v. 2, p. 124–131, 2011.
- TOFANELLI, M. B. D. *et al.* Método de aplicação de ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, p. 363-364, 2003.
- TREVISAN, S. *et al.* *Humic substances biological activity at the plant-soil interface. Plant Signaling Behav*, v. 5, p. 635–643, 2010.
- VAN OVERBEEK, J. *et al.* *An analysis of the function of the leaf in the process of root formation in cuttings. American Journal of Botany*, Lancaster, v.33, p.100- 107, 1946.
- VANDENABEELE, J. D. S. *et al.* *Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Science*, v. 57, n. 5, p. 779-795, jan. 2000.
- WANG, L. *et al.* *Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. Journal of proteomics*, China, v. 75, p. 2109-2127, jan. 2012

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Tendo em vista os resultados satisfatórios encontrados em diversas culturas, O primeiro artigo mostrou que no café arábica da cultivar Topázio MG1190 as substâncias húmicas não apresentou os resultados esperados para a maioria das características avaliadas, não sendo recomendadas como um possível tratamento de sementes nestas condições avaliadas.

No segundo artigo, na parte aérea a melhor dose de substâncias húmicas foi a 0 mg/dm³. Na parte radicular houve benefícios com a dose de 10 mg/dm³, preferencialmente de ácido húmico na presença do extrato de tiririca. Os menores estresses oxidativos foram vistos na dose de 10 mg/dm³ dos tratamentos com ácido húmico ou fúlvico, independente da utilização do extrato.

Em cima destes experimentos é possível tirar uma série de hipóteses para a explicação dos resultados. Bem como realizar vários outros experimentos para analisar o real efeito das substâncias húmicas e do extrato de tiririca no enraizamento e desenvolvimento de cafeeiro arábica.