

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOTECNIA**

TESE

**Efeito dos Ácidos Húmicos Sobre as H⁺-ATPase,
Transportadores de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺, e Sobre o
Crescimento em Arroz**

Orlando Carlos Huertas Tavares

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**EFEITO DOS ÁCIDOS HÚMICOS SOBRE AS H⁺-ATPASE,
TRANSPORTADORES DE N-NO₃⁻ E N-NH₄⁺, E SOBRE O
CRESCIMENTO EM ARROZ**

ORLANDO CARLOS HUERTAS TAVARES

Sob a Orientação do Professor
Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação do Professor
Leandro Azevedo Santos

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor**, em
Fitotecnia, Área de Concentração em
Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ
Setembro de 2014

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T231e	<p>Tavares, Orlando Carlos Huertas, 1979- Efeito dos Ácidos Húmicos sobre as H^+-ATPase, Transportadores de $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$, e Sobre o Crescimento em Arroz / Orlando Carlos Huertas Tavares – 2014. 132 f.</p> <p>Orientador: Manlio Silvestre Fernandes. Coorientador: Leandro Azevedo Santos. Tese (Doutorado) -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Fitotecnia, 2014.</p> <p>1. Ácidos húmicos. 2. Transportadores de nitrato. 3. PM H^+-ATPase. 4. Expressão gênica. 5. Morfologia radicular. I. Fenandes, Manlio Silvestre, 1939-, oriente. II. Santos, Leandro Azevedo, 1981-, coorient. III. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós- Graduação em Fitotecnia. IV. Título.</p>
-------	--

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

ORLANDO CARLOS HUERTAS TAVARES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Fisiologia da Produção.

TESE APROVADA EM 30/09/2014.

Manlio Silvestre Fernandes. PhD. UFRRJ
(Orientador)

Arnoldo Rocha Façanha. Dr. UENF

Ricardo Luis Louro Berbara. Dr. UFRRJ

Ednaldo da Silva Araújo. Dr. EMBRAPA

André Marques dos Santos. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

À minha filha Patrycia Atiara Scavello Huertas, “meu fio de luz”,
pelo amor, paciência e compreensão.
A qual torna todo dia um presente,
e por proporcionar os momentos
mais felizes de minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

Ao meu orientador, Professor PhD. Manlio Silvestre Fernandes, pela orientação, por compartilhar seu conhecimento e experiência sobre ciência, pelos ensinamentos e oportunidade dada para minha formação, e por todo apoio que me foi dado para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo e Professor Dr. Leandro Azevedo Santos, pela co-orientação e amizade, conhecimento e colaboração na construção deste trabalho e de minha formação pessoal e profissional.

À professora Dr^a. Sonia Regina de Souza, pela co-orientação, e contribuições para realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ricardo L. L. Berbara, pela amizade, conhecimento e colaboração para minha formação na área de substâncias húmicas, ecologia e biologia do solo.

Ao Dr. Andrés Calderín García e Dr. Osmário Araújo, pela amizade, conhecimento e colaboração direta neste trabalho.

Ao Professor Dr. Everaldo Zonta, pela amizade, e colaboração com o Winrhizo.

Aos Professores dos cursos de Pós-graduação em Fitotecnia e Ciência do Solo pela troca de conhecimentos durante as aulas.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Bucher, pela amizade e sugestões.

Aos amigos doutorandos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas/UFRRJ: Leilson Arruda, Leandro Ferreira, Marcus Sperandio, Vinicius Miranda, Rafael Rangel e Cassia Coelho pela ajuda incondicional. Muito obrigado.

Aos amigos da pós-graduação, Janiélio da Rocha, Vinicius Miranda, Natália Ribeiro, Cristiana Maia, Marcela Jacques, Luiziene Soares, Yara Rangel, Sabrina Dhamer, Renan e Camila Nobre.

A todos os bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas pela amizade e colaboração.

Ao PPGF/UFRRJ e sua coordenação especialmente a Lili e Tati pela atenção com que sempre fui tratado.

Aos meus pais Dilma Maria Huertas e Ismael Tavares, pelo amor, educação, incentivo e compreensão incondicional. Muito obrigado.

À bisá e aos avós da Paty, Dona Raquel Scavello, Prof. João Barreto e Prof^a. Joelia Barreto. Pelo cuidado e amor que dedicam à minha princesa e pelo carinho com que sempre fui tratado. Muito obrigado.

Especialmente ao meu fio de luz, a pequena Patrycia Atiara S. Huertas e Ysaac Carlos S. Huertas, pela existência, compreensão, carinho e amor.

À UFRRJ e EAF-SGC, por me proporcionar o convívio com pessoas tão especiais, além de proporcionar ensino público, gratuito e de qualidade. Eterna gratidão.

À CAPES, CNPq e FAPERJ pelo suporte financeiro.

BIOGRAFIA

Orlando Carlos Huertas Tavares, nasceu à 25 de setembro de 1979, na cidade de Villavicencio-CO, naturalizado de São Gabriel da Cachoeira-AM. Formou-se em Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de SGC-AM em 1998. Em seguida, iniciou o curso de graduação de Licenciatura em Ciências Agrícolas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Foi estagiário do Departamento de Botânica-UFRRJ de março de 2000 a julho de 2000, e bolsista de iniciação científica do CNPq junto ao Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ), na área de Anatomia Vegetal, no período de 2001 a 2002. Membro do Colegiado e do Diretório Acadêmico DARF-UFRRJ do Curso em Lic. em Ciências Agrícolas, membro do Conselho Departamental do Instituto de Educação-UFRRJ, membro do Grupo Nortista Ajurí/UFRRJ. Gradou-se em Lic. em Ciências Agrícolas pela UFRRJ em 2003, exercendo o magistério pelo Estado do RJ na Escola Agrícola Almirante Ernani do Amaral Peixoto-Magé/RJ de 2004 a 2005. Em julho de 2007 recebeu o título de Mestre em Agronomia-Ciências do Solo sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Lima. Foi bolsista da CAPES, e membro do Colegiado do CPGA-CS como representante dos discentes. Além de ser contemplado com mestrado “sanduíche” na FAUBA-Argentina por dois meses. No período de 2008-2010 foi professor concursado-docente I no Colégio Técnico Agrícola de Nova Friburgo/RJ (CEFA-Rei Aberto I) e participou do Levantamento de Solos e Simulação de Chuvas na Amazônia sob a coordenação do Prof. Dr. Marcos B. Ceddia. Nesse período também desenvolveu atividades de pesquisa no Laboratório de Biologia do Solo/UFRRJ sob orientação do Prof. Dr. Ricardo L. L. Berbara. Em 2010 ingressou no Doutorado em Fitotecnia pela UFRRJ, sob a orientação do Prof. PhD. Manlio Silvestre Fernandes e coorientação do Prof. Dr. Leandro A. Santos. Foi bolsista da CAPES durante os três primeiros anos e bolsista de Doutorado NOTA 10 da FAPERJ durante o restante do curso.

RESUMO GERAL

TAVARES, Orlando Carlos Huertas. **Efeito dos Ácidos Húmicos Sobre as H⁺-ATPase, Transportadores de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺, e Sobre o Crescimento em Arroz.** 2014. 132f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Muitos estudos têm demonstrado a capacidade das substâncias húmicas (SH) em afetar o crescimento e desenvolvimento de diversas espécies de plantas modelo e cultivadas em hidroponia, substratos inertes e vários tipos de solo. No entanto, os principais mecanismos responsáveis pelos efeitos da SH sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas permanecem como foco de intensa investigação. Em geral três principais hipóteses têm sido propostas para explicar as ações da SH sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, a “hipótese nutricional”; a de efeito semelhante a hormonal; e a de promoção de estresse coloidal nas raízes. Na presente tese, abordamos o efeito direto de ácidos húmicos (AHs) sobre a nutrição das plantas. Os AHs podem promover uma melhoria na nutrição das plantas proporcionando um estímulo para o crescimento a partir do aumento da atividade das bombas de prótons levando ao aumento da força próton motriz e aumento dos níveis de transcritos para transportadores, exercendo influência significativa sobre os parâmetros cinéticos de absorção de nutrientes e metabolismo das plantas de arroz, afetando a produção de raízes e a produção de biomassa. O objetivo geral foi estudar o efeito de ácidos húmicos oriundos de vermicomposto sobre a expressão das H⁺-ATPases de membrana plasmática e expressão dos transportadores de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺, sobre o metabolismo e cinética de absorção desses nutrientes e as mudanças nos parâmetros morfológicos das raízes, em plantas de arroz. A Tese foi dividida em quatro capítulos, onde o Capítulo I, apresenta a caracterização espectroscópica e elementar dos ácidos húmicos de vermicomposto extraído com água, KOH e NaOH. No Capítulo II, foi intitulado: a aplicação de ácidos húmicos de vermicomposto em plantas de arroz modifica a expressão gênica (*OsAMTs*, *OsNTRs* e *OsAs*), a absorção e o metabolismo do nitrogênio. No capítulo III foi estudado como os ácidos húmicos modificam a morfologia da raiz de plântulas de arroz. E no capítulo IV, o estudo dos efeitos dos ácidos húmicos e do baixo suprimento de nitrato, sobre a expressão e atividade das bombas de prótons e metabolismo de N em plântulas de arroz. Foi observado no Capítulo I, que os AHs extraídos com água são mais alifáticos e funcionalizados e menos aromáticos do que os extraídos com KOH. No Capítulo II, a indução prévia com AH em solução nutritiva promoveu aumento na afinidade por NO₃⁻ nas doses de 0,2 e 2,0 mM. Para NH₄⁺, o AH promoveu estímulos na dose de 2,0 mM, aumentando o influxo líquido de NH₄⁺. O AH aumenta a expressão dos transportadores de alta afinidade para NO₃⁻ e das isoformas de H⁺-ATPase (*OsA1* a *OsA8*) melhorando a performance da planta em condições de baixo suprimento de N. No Capítulo III, foi observado que a dose de 150 mg L⁻¹ de AH extraídos com água e 80 mg L⁻¹ de AH extraídos com KOH promovem maior estímulo sobre o crescimento e mudanças profundas da morfologia radicular nas plântulas de arroz. No Capítulo IV, as plantas pré-tratadas com AH estavam adaptadas para absorver e metabolizar nitrato em baixas concentrações (200 µM) quando comparadas ao controle, promovendo uma maior eficiência no crescimento radicular, absorção e metabolismo de N.

Palavras chave: Ácidos húmicos. Transportadores de nitrato. PM H⁺-ATPases. Expressão gênica. Morfologia radicular.

GENERAL ABSTRACT

TAVARES, Orlando Carlos Huertas. **Effect of Humic Acids on H⁺-ATPase, N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺ Transporters, and On Rice Growth.** 2014. 132f. Tesis (Doctor Science). Institute of Agronomy, Department of Fitotecnia, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Many studies have demonstrated of humic substances (SH) ability to affect the growth and development of several model and cultivated plants species in hydroponics, inert substrates and various types of soil. However, the main mechanisms responsible for the effects of SH on plant growth and development remain the focus of intense research. In general, three main hypotheses have been proposed to explain SH's actions on plant growth and development, the “nutritional hypothesis”; a hormonal-like effect; and the promotion of colloidal stress in the roots. In the present thesis we address the direct effect of humic acids (AHs) on plant nutrition. AHs can promote an improvement in plant nutrition by providing a stimulus for growth from increased proton pump activity leading to increased proton power, exerting significant influence on kinetic parameters of nutrient uptake and metabolism rice plant, affecting root and biomass production. The general objective was to study the effect of humic acids from vermicompost on the expression of plasma membrane H⁺-ATPases and expression of N-NO₃⁻ and N-NH₄⁺ transporters, on the metabolism and kinetics of absorption of these nutrients and the changes in morphology of roots in rice plants. The thesis was divided into four chapters, where Chapter I presents a spectroscopic and elemental characterization of humic acids from vermicompost extracted with water, KOH and NaOH. In Chapter II, it was titled: the application of humic acids of vermicompost in rice plants modifies the gene expression (*OsAMTs*, *OsNTRs* and *OsAs*), nitrogen absorption and metabolism. In chapter III it was studied how the humic acids modify the morphology of the root rice seedlings. And in Chapter IV, the study of humic acids and the low supply of nitrate effects on the expression and activity of the proton pumps and N metabolism in rice seedlings. It was observed in chapter I that the humic acids extracted with water are more aliphatic and less aromatic, have a higher N content than those extracted with KOH. In Chapter II, previous induction with AH in nutrient solution promoted increase in NO₃⁻ affinity at 0.2 and 2.0 mM. For NH₄⁺, vermicompost AH promoted stimuli only at the 2.0 mM dose, increasing the influx of NH₄⁺ in relation to the control. The AH application increases the expression of the high affinity transporters for NO₃⁻ and H⁺-ATPase isoforms (*OsA1* to *OsA8*), improving the plant performance under N low supply conditions. In Chapter III, multivariate analysis techniques were used to identify the treatment with 150 mg L⁻¹ of AH extracted with water and 80 mg L⁻¹ of AH extracted with KOH to promote greater growth stimulus and profound changes in root morphology in rice seedlings. In Chapter IV, under the cultivation conditions in which the plants were submitted, they were adapted to absorb and metabolize nitrate in low concentrations (200 μM) when compared to the control. This induced a greater efficiency in the root growth, N absorption and metabolism.

Key words: Humic acids. Nitrate transporters. PM H⁺-ATPases. Gene expression. Root morphology.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Atividade biológica de diferentes frações húmicas em diferentes espécies de plantas, e hipótese relacionada entre estrutura e atividade.	15
Tabela 2. Distribuição relativa de carbono (%) em regiões de deslocamento químico (ppm) dos espectros de ¹³ C-CPMAS-RMN, grau de aromaticidade e alifaticidade, índice de hidrofobicidade e quantidade relativa (%) de carbono, nitrogênio e hidrogênio em base seca de ácido húmico extraído com KOH.	27
Tabela 3. Parâmetros cinéticos de absorção aparente: Velocidade máxima de absorção (<i>Vmax</i>), concentração de N em que a absorção atinge a metade da <i>Vmax</i> (<i>Km</i>), concentração do ion na solução a partir da qual não se observa absorção líquida (<i>Cmin</i>), da variedade de arroz Piauí, sob dois níveis de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ (0,2 e 2,0 mM), pré-tratadas com ou sem ácido húmico (AH).	41
Tabela 4. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) para 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 24h até 144h em plântulas de arroz var. Piauí sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água (AHa) e extraído com KOH (AHk).	65
Tabela 5. Matriz de Distância de Mahalanobis (D2) para 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 48h até 144h, em plântulas de arroz var. Piauí sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água.	66
Tabela 6. Coeficiente de Correlação COFENÉTICO (CCC) entre a matriz de Distância de Mahalanobis (D2) e os métodos de agrupamento, das variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 48h até 144h, em plântulas de arroz sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk).	67
Tabela 7. Consistência via Mantel (estatística de Mantel) entre a matriz de Distância de Mahalanobis (D ²) e os métodos de agrupamento (Single linkage-S, Complete linkage -C, UPGMA-A e Ward-W) das variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 48h até 144h, em plântulas de arroz sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk).	67
Tabela 8. Média das taxas de incremento das 18 variáveis radiculares mensuradas nas plantas controle e nas plantas tratadas com a melhor dose de ácido húmico extraído com água (AHa) e extraído com KOH (AHk) as 144h.	72
Tabela 9. Coeficientes estimados e R ² dos ajustes, obtidos pelo modelo de Richards, para as cinco variáveis radiculares mensuradas nas plantas tratadas com a melhor dose de ácido húmico extraído com água (AHa) e extraído com KOH (AHk) e plantas controle (ctr), às 144h.	74
Tabela 10. Sequências dos “primers” (“forward e reverse”) usados nas reações de PCR em tempo real para as isoformas de PM H ⁺ -ATPases (<i>OsA1</i> a <i>OsA8</i>) desenhados por Sperandio (2011) e três isoformas de transportadores de nitrato (<i>OsNRT2.1</i> e <i>OsNRT2.2</i> e <i>OsNAR2.1</i>). A actina (<i>OsAct11</i>) e o fator de alongamento 1- α (<i>eEF-1α</i>) de arroz e respectivos acessos nos bancos de dados TIGR e NCBI.	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extração de ácidos húmicos com KOH e com água.	24
Figura 2. Espectros de ¹³ C CP-MAS NMR no estado sólido dos ácidos húmicos de vermicomposto extraídos com (a) NaOH (b) KOH 0,1 mol L ⁻¹ , (c) extraídos com água. 26	26
Figura 3. Análise de componentes principais para os tipos de carbono dos ácidos húmicos de vermicomposto extraídos com NaOH, KOH e água. (A) Porcentagem das variâncias retidas nas componentes principais (CP). (B) Contribuição dos carregamentos (loadings) na CP1. (C) Contribuição dos carregamentos na CP2. (E) Biplot da análise de componentes principais com os loadings e scores.	29
Figura 4. Representação esquemática do experimento realizado para avaliação da absorção de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ sob dois níveis (0,2 e 2,0 mM) com ou sem pré-tratamento com ácido húmico.	35
Figura 5. Curso-tempo do pH na solução nutritiva, quando as plantas de arroz foram supridas somente com NO ₃ ⁻ e somente NH ₄ ⁺ numa concentração inicial de 0,2 mM e 2,0 mM de N L ⁻¹ . Com (AH) e sem adição (Cont) de ácido húmico de 0 às 28h do início do experimento. Teste F, ** <i>p</i> <0,01, * <i>p</i> <0,05, barra = ± erro padrão.	39
Figura 6. Taxa de absorção líquida de NH ₄ ⁺ (A e B) e NO ₃ ⁻ (C e D) sob dois níveis (0,2 e 2,0 mM) em plantas de arroz induzidas com pré-tratamento de privação de N, com e sem adição de ácido húmico, numa solução nutritiva. Cada ponto de um total de trinta corresponde a 3 repetições.	40
Figura 7. Concentrações de N-NH ₄ ⁺ na raiz (A, B) e parte aérea (C, D). N-NO ₃ ⁻ na raiz (E, F) e parte aérea (G, H) da variedade de arroz Piauí, sob dois níveis de nitrato ou amônio (0,2 e 2,0 mM), com e sem ácido húmico (AH), numa solução nutritiva.	42
Figura 8. Concentrações de N-amino na raiz (A, B) e parte aérea (C, D). Açúcar solúvel na raiz (E, F) e parte aérea (G, H), da variedade de arroz Piauí, sob dois níveis de nitrato e amônio (0,2 e 2,0 mM), com e sem pre-tratamento com ácido húmico (AH), numa solução nutritiva.	43
Figura 9. Massa fresca de raiz (A, B) e parte aérea (C, D) da variedade de arroz Piauí, sob dois níveis de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ (0,2 e 2,0 mM), pré-tratadas com ou sem ácido húmico (AH).	44
Figura 10. Análise de Componentes principais para frações solúveis e peso fresco da raiz e parte aérea da variedade de arroz Piauí, sob 0,2 (a) e 2,0 (b) mM de nitrato com (●) sem (○) ácido húmico e amônio com (■) e sem (□) adição de ácido húmico numa solução nutritiva.	45
Figura 11. Expressão relativa dos transportadores de NO ₃ ⁻ de baixa (<i>OsNRT1.1</i>) e alta afinidade (<i>OsNRT2.1</i> e <i>OsNRT2.2</i>), e transportadores de NH ₄ ⁺ de alta afinidade (<i>OsAMT1.1</i> , <i>OsAMT1.2</i> e <i>OsAMT1.3</i>) em raízes de arroz da variedade Piauí, pré-tratadas com ou sem ácido húmico (AH), seguidas de ressuprimento com de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ , às 6, 9, 24, 48 e 72 h.	46
Figura 12. Expressão relativa das isoformas de PM H ⁺ -ATPases às 24 e 48h, nas raízes de arroz da variedade Piauí, pré-tratadas com ou sem ácido húmico (AH), seguidas de ressuprimento com NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺	47
Figura 13. Esquema do experimento dose-resposta para AH extraído com água (AHa) e KOH (AHk) em plântulas de arroz com 1mM de CaSO ₄	57
Figura 14. Esquema do experimento para análise do crescimento das plântulas arroz crescidas em solução com 1mM de CaSO ₄ e com AH extraído com água (AHa) e KOH (AHk).	58
Figura 15. Gráfico de dispersão e curva estimada pelo modelo de regressão linear com as bandas de confiança para as variáveis comprimento total de raiz, área de superfície total,	

- volume total e número total de pontas de raiz, e dentro das classes de raízes superfínas, finas e grossas, das plântulas de arroz em função das doses de ácido húmico extraído com água (AHa). Mensuradas em intervalos de 48 até 144h após aplicação..... 62
- Figura 16.** Gráfico de dispersão e curva estimada pelo modelo de regressão linear quadrático com as bandas de confiança para a variável comprimento total, área de superfície total, volume total de raiz e número total de pontas de raiz, e dentro das classes de raízes superfínas, finas e grossas, das plântulas de arroz em função das doses de ácido húmico extraído com hidróxido de potássio (AHk). Mensuradas em intervalos de 24 até 144h após aplicação. 64
- Figura 17.** Dendrogramas para as 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 24h até 144h, em plântulas de arroz var. Piauí sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água..... 69
- Figura 18.** Dendrogramas para as 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 24h até 144h, em plântulas de arroz var. Piauí sob doses crescentes de ácido húmico extraído com KOH..... 70
- Figura 19.** Análise de Componentes Principais para as 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 24h até 144h, em plântulas de arroz var. Piauí sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água..... 71
- Figura 20.** Crescimento, taxa de crescimento absoluto (TCA) e relativo (TCR) para o comprimento, área de superfície, volume, n° de bifurcações e de pontas das raízes de plântulas de arroz numa solução com ácido húmico extraído com água (AHa), extraído com KOH (AHk) e controle (Ctr). TAG- tempo após germinação de AH..... 73
- Figura 21.** Esquema do experimento para avaliação do crescimento, absorção de 0,2 mM de NO_3^- , com ou sem pré-tratamento com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk)..... 82
- Figura 22.** Curso-tempo do pH na solução nutritiva, quando as plantas de arroz foram ressupridas com N-NO_3^- numa concentração inicial de 0,2 mM de N L^{-1} . O pre-tratamento foi sem (C) e com adição de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk). 88
- Figura 23.** Depleção de NO_3^- numa concentração inicial de 0,2 mM de N L^{-1} na solução nutritiva com a variedade de arroz Piauí, em função do tempo. As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk), e ressupridas com 0,2 mM de NO_3^- . Barras representam o erro padrão das médias. 89
- Figura 24.** Massa fresca de raiz (a), parte aérea (b) e r/pa (c), da variedade de arroz Piauí. As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk). As plantas foram coletadas às 3, 6, 9 e 24 horas após o ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- 90
- Figura 25.** Teor de N-NO_3^- (a), N-NH_4^+ (b), N-amino (c) e açúcar solúvel (c) em raiz de plântulas de arroz Piauí. As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com adição de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk), e ressupridas com 0,2 mM de NO_3^- . Coletadas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de NO_3^- 91
- Figura 26.** Atividade de Glutamina sintetase (GS) (a), isocitrato desidrogenase NADP^+ -dependente (IDH) (b) e proteínas totais (c), das raízes de plântulas de arroz var. Piauí. As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk). Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o ressuprimento com 0,2 mM de NO_3^- 92
- Figura 27.** Atividade das PM H^+ -ATPases (a) e H^+ -PPases totais (b), H^+ -PPase dependente de K (c), e H^+ -PPase independente de K (d), das raízes de plantas de arroz (var. Piauí). As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com adição de ácido húmico extraído com

água (AHa) e KOH (AHk). Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o ressurgimento com 0,2 mM de NO_3^- . As mesmas letras que seguem dados para os tratamentos não diferem significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$). Barras são desvios padrão. 94

Figura 28. Expressão relativa das isoformas de PM H^+ -ATPases das raízes das plantas de arroz (var. Piauí). As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk). Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o ressurgimento de 0,2 mM NO_3^- . Os tratamentos com letras diferentes diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras representam média \pm EP (erro padrão). 97

Figura 29. Expressão relativa dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade *OsNRT2.1* (a) e *OsNRT2.2* (b) e proteína NAR *OsNAR2.1* (c), nas raízes das plantas de arroz (var. Piauí). As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk). Foram feitas coletas às 3, 6, 9 e 24 horas após o ressurgimento com 0,2 mM de NO_3^- . As barras representam média \pm EP (erro padrão). 98

Figura 30. Matrix de correlação de Pearson da expressão relativa dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade e bombas de protons, atividade enzimática e metabolitos das raízes das plantas de arroz (var. Piauí). Foram feitas coletas às 3h (A), 6h (B), 9h (C) e 24h (D) após o ressurgimento com 0,2 mM de NO_3^- 99

Figura 31. Análise de componentes principais da expressão relativa dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade e bombas de protons, atividade enzimática e metabolitos das raízes das plantas de arroz (var. Piauí). As plantas foram pré-tratadas sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHw) e KOH (AHk). Foram feitas coletas às 3h (A), 6h (B), 9h (C) e 24h (D) após o ressurgimento com 0,2 mM de NO_3^- 100

Figura 32. Análise de agrupamentos da expressão relativa dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade e bombas de protons, atividade enzimática e metabolitos das raízes das plantas de arroz (var. Piauí). As plantas foram pré-tratadas sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHw) e KOH (AHk). Foram feitas coletas às 3h (A), 6h (B), 9h (C) e 24h (D) após o ressurgimento com 0,2 mM de NO_3^- 101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Substâncias Húmicas	2
2.2. Substâncias Húmicas na Rizosfera	2
2.3. Efeito das Substâncias Húmicas sobre a Morfologia do Sistema Radicular	3
2.4. Ação Direta de Substâncias Húmicas sobre a Absorção de Nutrientes e Crescimento das Plantas.....	9
2.5. A Hipótese da Ação Tipo Hormonal das Substâncias Húmicas	12
2.6. A Proteção das Substâncias Húmicas contra Estresse	16
2.7. Absorção de Nitrogênio pelas Plantas	16
3. CAPÍTULO I CARACTERIZAÇÃO ESPECTROCÓPICA DOS ÁCIDOS HÚMICOS DE VERMICOMPOSTO.....	19
3.1. RESUMO.....	20
3.2. ABSTRACT.....	21
3.3. INTRODUÇÃO	22
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.4.1. Extração das frações AH.....	23
3.4.2. Análise de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (13C-NMR)	24
3.4.3. Análise elementar (CHN).....	24
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.5.1. Ressonância magnética nuclear de 13C	25
3.5.2. Análise elementar (CHN).....	29
3.6. CONCLUSÕES	30
4. CAPÍTULO II A APLICAÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS DE VERMICOMPOSTO EM PLANTAS DE ARROZ MODIFICA A EXPRESSÃO GÊNICA (OsAMTS, OsNTRS E OsAs), A ABSORÇÃO E O METABOLISMO DO NITROGÊNIO	31
4.1. RESUMO.....	32
4.2. ABSTRACT.....	33
4.3. INTRODUÇÃO	34
4.4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.4.1. Extração e caracterização dos AH de vermicomposto.....	35
4.4.2. Condição experimental e de crescimento das plantas	35
4.4.3. Expressão gênica das isoformas de ATPase e transportadores de N	36
4.4.4. Extração de RNA e síntese de cDNA	36
4.4.5. PCR em tempo real	37
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.5.1. Variações de pH na solução nutritiva.....	38
4.5.2. Influxo de N-NO ₃ ⁻ e N-NH ₄ ⁺ (0,2 e 2,0 mM) com e sem adição de AH.....	39
4.5.3. Parâmetros cinéticos aparentes da absorção de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺	40
4.5.4. Quantificação das formas de N nos órgãos das plantas arroz	42
4.5.5. Expressão gênica de transportadores de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ e das bombas de prótons ..	45
4.6. CONCLUSÕES	51

5. CAPÍTULO III OS ÁCIDOS HÚMICOS MODIFICAM A MORFOLOGIA DA RAIZ DE PLÂNTULAS DE ARROZ	52
5.1. RESUMO	53
5.2. ABSTRACT	54
5.3. INTRODUÇÃO	55
5.4. MATERIAL E MÉTODOS	57
5.4.1. Experimento dose-resposta com ácido húmico	57
5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.5.1. Efeito dose-resposta dos ácidos húmicos sobre os parâmetros radiculares	61
5.6. CONCLUSÕES	77
6. CAPÍTULO IV EFEITOS DOS ÁCIDOS HÚMICOS E DO BAIXO SUPRIMENTO DE NITRATO SOBRE A EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E METABOLISMO DE N EM PLÂNTULAS DE ARROZ	78
6.1. RESUMO	79
6.2. ABSTRACT	80
6.3. INTRODUÇÃO	81
6.4. MATERIAL E MÉTODOS	82
6.4.1. Descrição experimental	82
6.4.2. Extração alcoólica do material fresco e dosagem das frações solúveis	83
6.4.3. Determinação dos teores de N-NO_3^-	83
6.4.4. Determinação dos Teores de N-NH_4^+	83
6.4.5. Determinação dos teores de açúcares solúveis	83
6.4.6. Determinação dos teores de N-amino livre	84
6.4.7. Avaliação da atividade das bombas de prótons (PM H^+ -ATPases e H^+ -PPases) ..	84
6.4.8. Extração das vesículas microssomais	84
6.4.9. Quantificação da proteína	84
6.4.10. Atividade da PM H^+ -ATPase de Hidrólise de ATP	85
6.4.11. Atividade da H^+ -PPase de Hidrólise de ATP	85
6.4.12. Determinação da atividade de glutamina sintetase (GS)	85
6.4.13. Determinação da atividade da isocitrato desidrogenase NADP^+ -dependente	85
6.4.14. Avaliação da expressão gênica da PM H^+ -ATPase (Osa1 a OsA8) e transportadores de nitrato (OsNRT2.1 e OsNRT2.2 e NAR2.1)	85
6.4.15. Análise estatística	87
6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
6.5.1. Variações de pH e NO_3^- na solução nutritiva	88
6.5.2. Massa fresca das plantas de arroz	89
6.5.3. Metabolitos nitrogenados nas plantas	90
6.5.4. Atividade da enzima glutamina sintetase e isocitrato desidrogenase	91
6.5.5. Atividade das bombas de prótons (PM H^+ -ATPases e H^+ -PPases) nas raízes de arroz	93
6.5.6. Expressão relativa das isoformas de PM H^+ -ATPases	96
6.5.7. Expressão relativa dos genes de transportadores de NO_3^- de alta afinidade e proteína acessória NAR	98
6.6. CONCLUSÕES	104

7. CONCLUSÕES GERAIS.....	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
9. ANEXOS	130

1. INTRODUÇÃO GERAL

Muitos estudos têm demonstrado a capacidade das substâncias húmicas (SH) em afetar o crescimento e desenvolvimento de diversas espécies de plantas modelos e cultivadas em vários tipos de solo, substratos inertes e hidroponia (CHEN et al., 2004b; TREVISAN et al., 2010). No entanto, os principais mecanismos responsáveis por estes efeitos da SH sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas permanecem obscuros e em discussão. Em geral tres principais hipóteses têm sido propostas para explicar as ações do SH sobre o desenvolvimento das plantas: (i) a “hipótese nutricional”, que defende que a ação das SH é principalmente indireta, agindo sobre as propriedades do solo e sobre o “pool” de nutrientes disponíveis as plantas no solo (principalmente nitrato, fósforo e enxofre e os micronutrientes, tais como Fe e Zn) (CHEN et al., 2004a, b.), e (ii) a hipótese do efeito semelhante a hormonal que defende que, além de uma ação sobre o solo, a SH pode agir diretamente sobre o metabolismo e sinalização das plantas através da interação com as células da raiz (TREVISAN et al., 2010b, 2011; JANNIN et al., 2012). Recentemente alguns estudos têm relatado que ambas as teorias podem ser compatíveis. Assim, Aguirre et al. (2009) relataram que a SH ativou as principais respostas fisiológicas da raiz envolvidos na aquisição Fe sob privação de Fe, mesmo sob condições suficientes de Fe. Esta ação foi expressa tanto em nível transcricional e pós-transcricional (AGUIRRE et al., 2009). Neste sentido, outro trabalho complementar mostrou que a ação da SH no crescimento da parte aérea é provavelmente mediada por um efeito que melhora a absorção radicular de nitrato e mais a translocação da raiz para a parte aérea (MORA et al., 2010). Este efeito foi relacionado com uma promoção da translocação de citocinina radicular para a parte aérea que seria responsável pela bioestimulação do metabolismo e crescimento da parte aérea (MORA et al., 2010). Estes resultados foram confirmados por outro estudo em canola, incluindo tanto, abordagens fisiológicas e moleculares por microarranjos (JANNIN et al., 2012). (iii) a hipótese do efeito da promoção de um estresse coloidal nas raízes (ASLI & NEUMANN, 2010) defendendo que, os AH podem agrupar-se na raiz afetando a transpiração e condutividade hidráulica. Adicionalmente os AH atuam em nível celular ativando algumas enzimas do sistema de defesa antioxidativo com estímulo das catalases (CAT) (GARCIA et al, 2012) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que atuam como intermediários do crescimento vegetal (CORDEIRO et al, 2011), bem como a expressão de genes IRE e PHS1 fortemente regulados por várias condições de estresse (TREVISAN et al, 2011) sugerindo que a SH também pode interagir com as vias de sinalização que regulam a resposta das plantas aos diferentes estresses como constatado por Jannin et al, (2012). Todos esses resultados mostram que as principais hipóteses propostas para explicar os efeitos da SH sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas são provavelmente interligadas.

Na presente tese abordamos o efeito direto de ácidos húmicos (AHs) sobre a nutrição das plantas. Os AHs podem promover uma melhoria na nutrição das plantas proporcionando um estímulo para o crescimento a partir do aumento da atividade das bombas de prótons levando ao aumento da força próton motriz, exercendo influência significativa sobre os parâmetros cinéticos de absorção de nutrientes e metabolismo das plantas de arroz, afetando a produção de raízes e a produção de biomassa. O objetivo geral foi estudar o efeito de ácidos húmicos oriundos de vermicomposto sobre a expressão das H^+ -ATPases de membrana plasmática e expressão dos transportadores de $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$, sobre o metabolismo e cinética de absorção desses nutrientes e as mudanças na morfologia das raízes em plantas de arroz.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Substâncias Húmicas

As Substâncias Húmicas (SH) são componentes chave da fertilidade do solo e controlam as propriedades químicas e biológicas da rizosfera. São substâncias de coloração escura compostas por macromoléculas de massa molecular relativamente elevada formada através de reações de síntese secundária a partir de resíduos orgânicos de plantas, animais e microrganismos (STEVENSON, 1994). Andreux (1996) as considera como polímero aleatório, e estrutura formada por pontes de blocos poli aromáticos e cada uma por éster, éter e ligações de C com proporções variáveis de carboxila, hidroxila, amino e outros grupos hidrofílicos. Entretanto, alguns estudos têm sugerido uma nova concepção para a estrutura destas complexas substâncias húmicas (ORLOV et al., 1975; PICCOLO, 2002; PICCOLO 2001; SUTTON & SPOSITO 2005), em que algumas evidências sugerem que os ácidos húmicos são formados por uma mistura heterogênea de pequenas moléculas, reunidas num arranjo supramolecular, estabilizado por forças relativamente fracas (ligações do tipo van de Waals, π - π , CH- π). Além disso, essas ligações podem ainda, serem quebradas reversivelmente na presença de ácidos orgânicos em baixas concentrações (NARDI et al., 2000; COZZOLINO et al., 2001; CANELLAS et al., 2010). Esse menor agregado, corresponderia à célula estrutural mínima das substâncias húmicas, sobre a qual vai se desenvolvendo o microagregado do solo (PAUL, 2014) e paulatinamente a macroestrutura através da adição de camadas sobre esta célula básica, num arranjo semelhante ao supraestrutural (ORLOV et al. 1975). Assim, os processos de floculação propostos para a matéria orgânica com metais, tal como Fe, e os mecanismos que levam a um estável carbono do solo são relatados abaixo. Esse menor agregado (flocos) eventualmente interagem com matéria orgânica e sobre os minerais e agregados. O processo é dinâmico com flocos e matéria orgânica em estado de equilíbrio. A MO associada ao mineral interage formando camadas de diferentes propriedades químicas: (1) a superfície mineral interage onde ocorrem interações de van der Waals e a ligação química; (2) uma camada anfílica em que a ligação covalente e as interações hidrofóbicas ocorrem simultaneamente; e (3) um limite externo ou superfície onde a porção carregada de compostos reage com o meio aquoso (PAUL, 2014). A área limite externa é o local onde os flocos provavelmente interagem. Piccolo (2001) forneceu evidências para indicar como as associações moleculares podem ser interrompidas, liberando moléculas de estruturas pseudo-macromoleculares de tamanhos muito menores.

2.2. Substâncias Húmicas na Rizosfera

As condições químicas, bioquímicas e microbiológicas na rizosfera, diferem bastante daquelas presente na massa de solo, o que pode conduzir a alterações na estrutura e na dinâmica da matéria orgânica humificada. Por outro lado, pouco se sabe sobre a estrutura molecular e do grau de agregação das moléculas húmicas na rizosfera (PINTON et al., 2009). Entretanto, estudos usando técnicas de análises de espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e Espectro de luminescência total com espectroscopia de matriz de emissão-excitação por fluorescência (TLS-EEM), verificou-se que os ácidos húmicos separados de acordo com os métodos convencionais (dissolução alcalina, precipitação ácida) da massa de solo e da rizosfera apresentaram pequenas diferenças nas propriedades estruturais (GRASSO et al., 2004 apud PINTON et al., 2009). Diferenças nos espectros de FT-IR e nos valores de FI dos espectros de EEM foram interpretados pelos autores como uma indicação da incorporação em ácidos húmicos extraídos de componentes de exsudato de raiz do solo rizosférico, tais como ácidos alifáticos e aromáticos, aminoácidos, amidas, e compostos fenólicos. As características

químicas dos ácidos húmicos isolados a partir da rizosfera e da massa de solo foram estudadas em função do genótipo da planta cultivada no solo. Foi mostrado que a presença da canola, uma espécie altamente acidificante, e uma espécie nodulada, como a fava, determinaram as maiores diferenças entre os ácidos húmicos rizosférico e não rizosférico, em comparação com plantas de trigo, especialmente com relação à acidez total e aromaticidade (TARTARO et al., 1999 apud PINTON et al., 2009).

Têm sido feitas tentativas para verificar se os ácidos orgânicos liberados pelas raízes das plantas podem alterar a estrutura das moléculas húmicas (ALBUZIO & FERRARI, 1989; GARCÍA et al., 2012). A análise por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) revelou que as frações de massa molecular elevada, tratadas com soluções ácidas ou ácidos orgânicos liberam moléculas húmicas de baixa massa molecular, com uma atividade biológica maior do que das moléculas de origem. Resultados semelhantes também foram obtidos com exsudatos radiculares de milho (NARDI et al., 1997). O processo de desagregação pode ser explicado por um comportamento micelar das substâncias húmicas em solução (PICCOLO et al., 1996, 2001). Este mecanismo pode ser particularmente pronunciado sob condições de estresse ambiental, como escassez nutricional (P e Fe), capaz de induzir a liberação maciça de carboxilatos oriundos das raízes (JAYMAN & SIVASUBRAMANIAN, 1975). Outras condições peculiares da rizosfera como a concentração de íons, podem influenciar a complexidade molecular das substâncias húmicas, devido à possibilidade de formação de ligações de cadeias internas produzindo macromoléculas insolúveis (SEQUI et al., 1975). Este último aspecto reforça a necessidade de uma avaliação dinâmica dos processos que ocorrem na rizosfera em relação à atividade e o estado fisiológico das plantas (PINTON et al., 2009).

Uma das características mais importantes na relação planta/solo é a extensão da rizosfera. Este fator é muito variável, variando de <1mm a vários milímetros e fortemente dependente dos gradientes que se desenvolvem na rizosfera em consequência de diferentes processos. Nestes processos um papel crucial é desempenhado por pelos radiculares, excrescências das células epidérmicas da raiz. O desenvolvimento de pelos radiculares são dependentes do genótipo e é afetado pelas condições ambientais por exemplo, a disponibilidade de água, nutrientes, estresses abióticos, hormônios, AHs (PINTON et al., 2009; CANELLAS et al., 2010).

A presença de substâncias húmicas interagindo com os processos fisiológicos de raiz (VARANINI & PINTON, 2001) pode afetar a extensão da rizosfera, por exemplo, modulando a liberação de prótons e exsudados orgânicos de baixo peso molecular, atividades redox presente na superfície da raiz, taxas de absorção de íons e “pools” de nutrientes disponíveis, e a atividade de ectoenzimas (PINTON et al., 2009).

Substâncias húmicas podem atuar também por meio de um estímulo do crescimento da raiz e proliferação de pelos radiculares (SCHMIDT et al., 2007; CANELLAS et al., 2010). Estes efeitos são particularmente importantes para a adaptação das plantas às condições adversas do solo e pode ser útil para a definição de práticas de manejo da rizosfera que visam melhorar o crescimento das plantas e promover eficiência no uso de nutrientes (RÖMHELD & NEUMANN, 2006; PINTON et al., 2009).

2.3. Efeito das Substâncias Húmicas sobre a Morfologia do Sistema Radicular

O desenvolvimento do sistema radicular tem uma função central para a planta atingir o crescimento ideal e contribui para os níveis de rendimento obtidos nos cultivos (DEN HERDER et al., 2010; LYNCH, 1995). A distribuição espacial de todo o sistema radicular no seu meio de crescimento é conhecida como arquitetura do sistema radicular (RSA) (LYNCH, 1995) e podem afetar muitas funções fisiológicas como aquisição da água (DOUSSAN et al., 1998; SKAGGS & SHOUSE, 2008), nutrientes (LAMBERS et al., 2006) a distribuição de carbono

(COLL et al., 2008), fixação das plantas (FANG et al., 2012) a capacidade de adaptação a estresses ambientais (AL-GHAZI et al., 2003), e são o local de interação com os microrganismos na rizosfera (DEN HERDER et al., 2010) e SHs (PINTON et al., 2009; GARCIA et al., 2012).

Os efeitos mais evidentes exercida por SH são as respostas no crescimento das plantas. Muitos estudos nos últimos anos têm confirmado as observações feitas por VAUGHAN & MALCOLM (1985), que apresentaram resultados considerando diferentes parâmetros e diferentes tratamentos com SH extraídos de muitas fontes naturais e antropogênicas, e testado em várias espécies de plantas superiores (NARDI et al, 2009).

O crescimento do sistema radicular no solo, são expostas a uma ampla faixa de componentes orgânicos e inorgânicos. Uma considerável parte do componente orgânico é representado pelas substâncias húmicas. Essas moléculas são caracterizadas por grandes diferenças em estrutura, propriedades, tamanho molecular e solubilidade.

Muitos estudos tem relatado a capacidade das substancias húmicas (SH) obtidas de diversas origens modificar o crescimento, morfologia e arquitetura radicular (PINTON et al., 1999; CANELLAS et al., 2002, 2009; DOBBS et al., 2007, 2010; SCHMIDT et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007; TREVISAN et al., 2010).

Humatos de sódio derivados de carvão, estimulou o crescimento da raiz primária de plântulas de melão (*Cucumis melo* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e cebola (*Allium cepa* L.) (VAN DE VENTER et al. 1991). Os autores constataram que a intensificação do crescimento não foi devido à liberação de nutrientes pelo humatos de sódio, e, no caso de alface e cebola, não foi devido à maior disponibilidade ou absorção de elementos minerais. Em outro artigo, sementes de alface e tomate foram tratadas em condições de anaerobiose com ácidos húmicos derivados de carvão oxidado (PICCOLO et al., 1993). Foi observado que o peso fresco de todas as plântulas e por plântulas aumentou nos tratamentos para ambas as espécies.

Os efeitos das SHs sobre as raízes, poderiam ser divididos dentro de dois diferentes tipos principais: efeitos morfológicos sobre a raiz individual (número de células, tamanho celular, tipo de célula, raiz lateral, ou pelos absorventes) (VAUGHAN & MALCOLM, 1985; CANELLAS et al., 2002; SCHMIDT et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007) e efeitos morfológicos sobre a raiz inteira (arquitetura radicular, ramificação e densidade de raízes principais secundárias, e espessura da raiz) (PINTON et al., 1999; CANELLAS et al., 2002, 2009; DOBBS et al., 2007, 2010; ZANDONADI et al., 2007; LIMA, 2008; TREVISAN et al., 2010).

O número e o crescimento de raízes finas são estimulados pela ação de ácidos húmicos (CANELLAS et al., 2002). Há muito se considera que as substâncias húmicas podem regular o desenvolvimento das plantas como se fossem hormônios (BOTTOMLEY, 1917). Inúmeros trabalhos têm demonstrado que a formação do complexo ligante-húmico com íon metálico favorece a absorção de íons, como Fe (PINTON et al, 1999), nitrato (QUAGGITOTI et al., 2004; MORA et al., 2010) e outros, favorecendo assim o crescimento e o desenvolvimento das raízes (CANELLAS et al, 2005).

Vários autores levantaram a hipótese de que SH podem ser adsorvidas pelas raízes das plantas, ainda que frações de alta massa molecular (HMW) e de baixa massa molecular (LMW) parecem ter comportamento diferentes (VAUGHAN et al., 1981; VAUGHAN et al. 1974; VAUGHAN, 1986; NARDI et al; 2001, MUSCOLO et al; 2007a). Ainda hoje, não está completamente claro os mecanismos pelos quais as SH interatuam com as células das raízes e podem subsequentemente influenciar o crescimento e a fisiologia da planta (TREVISAN et al., 2010). Entre as modificações induzidas pela SH nas plantas tratadas, as mudanças em tamanho e desenvolvimento foram os primeiros parâmetros as serem estudados analiticamente (TREVISAN et al., 2010). Sob condições particulares, a SH pode estimular o crescimento da planta em termos de aumento do comprimento da planta e massa seca e fresca (BLANCHET,

1958, GUMINSKI, 1968). Esses efeitos parecem depender da concentração (ELGALA et al., 1978, DOBBSS et al., 2007; AGUIAR et al. 2009; CANELLAS et al., 2010; GARCÍA et al., 2012 e 2014) e da fonte da SH (HERNANDO et al, 1977), da idade e espécie da planta (BLANCHET, 1958; GUMINSKI, 1968), bem como das condições de cultivo do experimento (Lima 2008; TREVISAN et al., 2010). Recentemente, muitos estudos têm confirmado a hipótese de um efeito direto da SH na fisiologia da planta, em particular no que diz respeito à formação de pelos radiculares (SCHMIDT et al., 2004, 2007) e desenvolvimento de raízes laterais (CANELLAS et al., 2002; 2008; ZANDONADI et al., 2007). Indução de uma proliferação de pelos da raiz nas regiões subapical (CONCHERI et al., 1996) e uma taxa mais elevada de diferenciação das células de raízes (CONCHERI et al., 1994). Ácidos húmicos extraídos de diferentes fontes aumentaram o crescimento das raízes e a proliferação de raízes laterais em plântulas de milho (ZANDONADI et al., 2007) e *Arabidopsis* (DOBBSS et al., 2007).

Mais recentemente, uma série de artigos avaliaram as respostas de crescimento a vermicompostos e SH extraído do mesmo. Em diferentes espécies vegetais (ARANCON et al., 2004; ATIYEH et al., 2000, 2001, 2002a, b; LIMA 2008; NOBRE et al., 2013), os resultados encontrados apoiam a atividade conhecida dos compostos húmicos. Além disso, em plântulas de milho (*Zea mays* L.) tratadas por 7 dias, com diferentes concentrações de AH, o alongamento das raízes foi estimulado, resultando em maior área de superfície radicular (CANELLAS et al., 2002). Na concentração de 40 mg L⁻¹, tanto o ácido húmico de lodo de estação de tratamento (AHL) como ácido húmico extraído de vermicomposto (AHV) exibiram o melhor desempenho na indução do desenvolvimento em comprimento e área radicular, observado nas plântulas de milho e café (FAÇANHA et al., 2002).

Outras evidências sobre modificações morfológicas atribuídas ao tratamento SH dizem respeito ao desenvolvimento de pelos radiculares. Neste sentido, CONCHERI et al. (1994) identificou uma forte proliferação de pelos radicular em relação as plantas controles, em raiz de trigo suplementado com SH ate uma concentração de 10 mg C L⁻¹, com melhores resultados para HMS e LMS obtidos com 5 e 0,1 mg C L⁻¹, respectivamente. Além disso, Schmidt et al. (2005, 2007) encontraram um aumento significativo na densidade de pelos radiculares, trabalhando com *Arabidopsis thaliana*, que foram tratados com substâncias húmicas extraída em água (WEHS), sugerindo que essas substâncias induzem a uma "resposta de aquisição de nutrientes" que favorece a absorção de nutrientes através de um aumento na área de superfície de absorção. Contudo, uma análise fenotípica de uma construção de mutantes com defeitos no padrão epidérmico da raiz revelou que a densidade dos pelos radiculares dos mutantes, com defeito na especificação celular, foi significativamente alterada, indicando um efeito e/ou a jusante (downstream) da determinação das células.

Em experimento de Pinton et al., (1999) com plântulas de milho expostas por 24h em uma solução nutritiva contendo 200µM de NO₃⁻ na presença (WEHS) ou ausência (controle) de substância húmica extraída com água com uma concentração final de 5mg de Corg L⁻¹. O sistema radicular das plantas controle consistiu de um sistema radicular primário e um secundário. Além disso foi evidente, na zona basal da raiz primária, a presença de raízes laterais na fase inicial de desenvolvimento. Assim, quando a WEHS estava presente junto com nitrato na solução nutritiva, o desenvolvimento de raízes das plântulas foi modificado. Com uma maior proliferação de raízes secundárias e um maior número de raízes laterais desenvolvidas em comprimento em relação daquelas observadas nas plantas controle. Um efeito similar ao da WEHS na morfologia da raiz foi observado quando as plantas foram colocadas em contato com uma solução contendo 5mM de CaSO₄ na presença da fração húmica (PINTON et al., 1999).

Este comportamento foi confirmado em um estudo com base na análise do número de primórdio de raiz lateral em plântulas de *Arabidopsis* tipo selvagem tratadas por 48 horas com uma concentração de SH que variaram entre 0 e 1mg C L⁻¹. Os resultados mostraram um

aumento do número de primórdios de raiz lateral, com valores quatro vezes maior em plantas tratadas com 1 mg C L^{-1} comparado ao controle (PIZZEGHELLO et al, 2006). Nas plântulas de milho tratadas por 7d com diferentes concentrações, tanto o alongamento como proliferação de raízes secundárias foram estimuladas, resultando no aumento da área superficial radicular, e o aumento no comprimento total radicular, CANELLAS et al. (2002).

Na avaliação do crescimento em área de raízes transformadas de manjerição em placas de petri com diferentes concentrações de ácido húmico (10, 20, 40, 80 e 160 mg C L^{-1}) e controle (LIMA, 2008), foram observadas diferenças significativas somente a partir de 45 dias após a repicagem, onde o tratamento com 20 mg C L^{-1} foi superior ao tratamento controle (sem ácido húmico), mas não houve diferenças entre os demais tratamentos. Estes resultados evidenciam que os benefícios no crescimento em área das raízes podem necessitar de maiores períodos de tempo para que possam ser significativos como em Jannin et al, (2012). No estudo de Lima (2008), o tratamento com 20 mg C L^{-1} proporcionou o maior comprimento radicular quando comparado aos demais tratamentos em todas as épocas de avaliação, exceto para os tratamentos 80 e 160 mg C L^{-1} aos 15 dias de crescimento. A correlação entre o comprimento e a área radicular dos diferentes tratamentos com ácido húmico (10, 20, 40, 80 e 160 mg C L^{-1}) e controle (sem AH) nos quatro períodos de avaliação (15, 30 e 45 dias) foram positivas e altas (LIMA, 2008). Segundo o autor, a menor correlação encontrada no tratamento com 20 mg C L^{-1} aos 15 dias poderia ser consequência da maior indução na formação de sítios mitóticos e de raízes laterais pré-emergidas nesta concentração como relatado por CANELLAS et al. (2002), resultando em comprimento radicular maior que a área radicular.

Além disso, os ácidos húmicos induziram aumentos na área de acidificação em relação ao tamanho da raiz, até a adição da concentração de 20 mg C L^{-1} e decresceu com as concentrações de 40 e 80 mg C L^{-1} . Na concentração de 160 mg C L^{-1} foi observado uma alcalinização da rizosfera, o que foi atribuído como uma resposta adaptativa das raízes ao meio de cultivo com alta concentração de ácido húmico, e essa alcalinização do pH na rizosfera provocou alterações na absorção de íons da solução acarretando em menor crescimento radicular (LIMA, 2008).

Investigações sobre a morfologia das células da raiz destacou-se em níveis mais elevados de diferenciação as raízes tratadas com AH (NARDI et al., 1996). Nas micrografias de raízes de trigo, usando tanto a microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão, foram observados nas células do cilindro central da raiz apresentando paredes mais espessas em relação às paredes das células das raízes do controle. Em outro estudo usando micrografia de epifluorescência (onde a lignina se torna auto-fluorescente sobre absorção de luz UV, e a intensidade autofluorescente da parede celular indica o grau de lignificação e diferenciação dos vasos do xilema) sobre *Pinus sylvestris* tratadas com HMS e LMS de um “rendzic leptosol” revelou que as raízes tratadas mostraram uma taxa mais elevada de diferenciação em comparação ao controle (NARDI et al., 2000).

O padrão das células epidérmicas da raiz é afetado por vários efeitos ambientais contribuindo para a adaptação das plantas às mudanças das condições do ambiente. Schmidt et al., (2007) afim de monitorar possíveis mudanças na arquitetura ou morfologia da raiz induzida por substâncias húmicas, plantas de arabidopsis foram crescidas em meio estéril contendo Substancia Humica Extraída com Agua ($\text{SH}_{\text{H}_2\text{O}}$) em concentrações variando de 1 a $20 \text{ mg Corg L}^{-1}$. A aplicação de $\text{SH}_{\text{H}_2\text{O}}$ aumentou significativamente o número e comprimento de pelos radiculares. O estímulo máximo de densidade de pelos radiculares foi observado em 5 mg Corg L^{-1} . Nessa concentração a densidade de pelos radiculares aumentou em 22% ($p < 0.001$) quando comparado a plantas crescendo na ausência de $\text{SH}_{\text{H}_2\text{O}}$ em unidade de comprimento de raiz. Os pelos da raiz formado foram marcadamente mais longos que aquelas crescidas no meio sem adição de substância húmica. Além disso, a $\text{SH}_{\text{H}_2\text{O}}$ também afetou sua posição em relação a células corticais básicas (SCHMIDT et al., 2007). Aplicação de $\text{SH}_{\text{H}_2\text{O}}$ ao meio de crescimento

frequentemente induziu a divisão de células periclinais na camada de células da endoderme/córtex, resultando na formação de camadas supranumerárias no tecido fundamental. O número de paredes celulares tangenciais adicionais foram significativamente aumentadas, em resposta a adição de ácido húmico extraído com água (SCHMIDT et al., 2007). Segundo os autores, o aumento na densidade de pelos radiculares não foi devido a um suprimento extra de nutrientes. Como a concentração total de nutrientes essenciais na quantidade de SHEA que foi fornecido ao meio de crescimento foi cerca de 1 μM . Não foi observado mudanças no número raízes laterais em resposta a aplicação da fração húmica.

Assim os compostos libertados pelas raízes das plantas podem alterar a estrutura de moléculas húmicas (Albuzio e Ferrari, 1989). O processo de desagregação com soluções ácidas ou ácidos orgânicos da raiz liberam moléculas húmicas de baixo peso molecular, com uma atividade biológica maior (Pinton et al, 2009; Nardi et al, 2009).

Em estudo realizado por Aguiar et al. (2009), utilizando diferentes concentrações de cinco subfrações (SF) de AH obtidas por cromatografia (simulando essa desagregação de moléculas húmicas), foram testadas quanto à sua capacidade de estimular o crescimento radicular de plantas de *A. thaliana*. A indução de raízes laterais, ajustaram-se a um modelo quadrático com concentração ótima das diferentes frações variando entre 0,00468 e 0,00535 mol C L⁻¹. Em estudo de bioatividade com diferentes concentrações de AH e subfrações (SF) sobre o número de raízes laterais tanto em Arabidopsis como milho também apresentaram modelo quadrático (CANELLAS et al., 2010). Embora os maiores efeitos tenham sido observados nas concentrações de 4,51 e 1,73 mM de C L⁻¹ para Arabidopsis e milho.

O número de raízes laterais emergidas foi 100 a 160 % superior nas plantas tratadas, em comparação com as plantas controle (AGUIAR et al. 2009). O comprimento total das raízes também foi alterado apresentando comportamento diferencial a adição dos AH e suas SF na solução de cultivo. Onde as SF1, SF3 e SF5 estimularam o crescimento do eixo principal em relação ao controle. Porém o AH e as SF2 e SF4 promoveram uma redução do comprimento da raiz primária (AGUIAR et al. 2009). Redução também observada em outro estudo no comprimento do eixo principal em milho para SF1, SF2, SF4 e SF6, enquanto a SF3 aumentou o comprimento da raiz em 25% (CANELLAS et al., 2010). O mesmo não ocorreu em Arabidopsis, onde a concentração ótima para AH e suas SF aumentarem o comprimento da raiz principal de 7% para 33%, com exceção da SF6 que reduziu o comprimento radicular em 5%.

Demais características morfológicas como número e comprimento de raízes laterais, e a densidade de raízes laterais foram aumentadas tanto por AH como todas as suas SF em ambas espécies de plantas (CANELLAS et al., 2010). Contudo, todos os tratamentos estimularam a formação de pelos radiculares em comparação ao controle. Além disso, o bombeamento de prótons foi estimulado pelas diferentes subfrações de substâncias húmicas. Sendo demonstrado que o padrão de ativação das H⁺-ATPase foram correlacionados com as mudanças no desenvolvimento da raiz (CANELLAS et al., 2010). A indução de raízes laterais e comprimento é o resultado da influência das SH sobre o crescimento radicular, já demonstrada para plântulas de milho (CANELLAS et al., 2002; PINTON et al, 1999; ZANDONADI et al., 2006) e Arabidopsis (DOBBSS et al., 2007, SCHMIDT et al., (2007).

É sabido que o incremento na indução de raízes laterais está diretamente relacionado com o fitormônio auxina, pois este atua nos estádios iniciais de formação do primórdio radicular, ativando a divisão das células do periciclo (CASIMIRO et al., 2001). A ação do tipo auxínica presente na SH previamente demonstrada (O'DONNELL, 1973; CANELLAS et al., 2002; MUSCOLO et al., 2013), bem como a expansão celular promovida por AH (VAUGHAN et al., 1974). Esses eventos podem ser relacionados com a teoria do crescimento ácido promovido por auxinas (HAGER et al., 1991; RAYLE & CLELAND, 1992). Nesse sentido, concentrações elevadas de auxinas (menores que 10⁻⁶ mol L⁻¹) induzem o encurtamento da raiz principal e o aumento das laterais (BLAKELY et al., 1988). No estudo de ZANDONADI et al.

(2006), verificaram que concentrações muito pequenas de auxinas (menores que 10^{-10} mol L⁻¹) promovem o crescimento do eixo principal. A presença de auxina nas SH foi previamente demonstrada por diferentes técnicas (MUSCOLO et al., 1998, 2013; CANELLAS et al., 2002; QUAGGIOTTI et al., 2004).

Estímulo da atividade das H⁺-ATPase também foram induzidos pelo tratamento com AH, sugerindo que as modificações não estão restritas a arquitetura radicular, mas também são estendidas a maioria dos componentes bioquímicos e moleculares. Na verdade, a impulsão da força para a absorção de nutrientes é o gradiente eletroquímico através da membrana plasmática, é que primeiramente gerada pela H⁺-ATPase. Em consonância com a teoria de que os pelos radiculares são especializadas na absorção de nutrientes, altos níveis de expressão de genes das H⁺-ATPase nos pelos radiculares tem sido demonstrado (MORIAU, 1999), bem como na raiz inteira de plantas de arroz (SPERANDIO et al, 2011; 2013), com forte expressão ocorrendo nos pelos radiculares em desenvolvimento e reduzida expressão nos pelos radiculares maduros (GILROY & JONES, 2000). Esses resultados corroboram a hipótese de que o efeito de estimulação sobre o crescimento radicular vegetal. Como ocorre na presença de auxinas, a aplicação de AH resulta em indução de raízes e expansão celular, associada ao aumento da atividade bioquímica e expressão dos genes que codificam para as ATPases (CANELLAS et al., 2002; ZANDONADI et al., 2006, ELENA et al, 2009).

Muscole et al. (2007) postulou que, a interação entre o sistema radicular e material húmico na rizosfera é possível quando, moléculas húmicas na solução do solo são bastante pequenas para fluir dentro do apoplasto e alcança a membrana plasmática. Portanto, várias evidências sugerem que moléculas húmicas de baixa massa molecular, poderia alcançar a superfície e fluir no apoplasto (VAUGHAN & ORD, 1981), ou atravessar a membrana para o interior da célula, induzindo sua permeabilidade (OJWANG & COOK 2013), representando assim uma plausível interação com a membrana plasmática (PINTON et al., 1999a). Uma vez que, SH de pequeno tamanho molecular geralmente são mais biologicamente ativas do que material de maior tamanho (PICCOLO et al., 1992; NARDI et al., 2007).

Foi observado a mobilidade dos constituintes químicos das SH de alta para baixa massa molecular, quando em contato com ácidos orgânicos (PICCOLO et al., 1996; SIMPSON et al., 2002). Nardi et al. (2004) observaram elevada bioatividade em SH isoladas com ácidos orgânicos de cadeia curta. Além disso, as SHs apresentam hidrofobicidade e Canellas et al. (2008c) encontraram correlação significativa entre o grau de hidrofobicidade de AH e sua capacidade de promoção do crescimento radicular. Façanha et al. (2002) e Canellas et al. (2008a) verificaram ainda que, plântulas de milho e café têm capacidade de modificar o perfil de exsudação de ácidos orgânicos em resposta à adição de AH, sugerindo a presença de um “diálogo químico” ainda não muito claro entre a planta e a solução com SH.

2.4. Ação Direta de Substâncias Húmicas sobre a Absorção de Nutrientes e Crescimento das Plantas

Uma das questões ainda não definida refere-se aos mecanismos que conduzem a uma alteração na absorção de íons nas plantas, após tratamento com SH (NARDI et al., 2009). A influência do húmus do solo na absorção de íons, e mais geralmente, sobre o crescimento das plantas, foi examinado e revisado por Vaughan & Malcolm, (1985); Chen & Aviad (1990), Varanini & Pinton (1995, 2001); Nardi et al. (1996, 2002, 2009); Clapp et al. (2001); Tan (2003); Chen et al. (2004a); Zandonadi et al., (2013).

Os efeitos da SH na absorção de íons parecem ser mais ou menos variável e seletiva, dependendo das SH envolvidas, a sua concentração, as espécies vegetais, e a composição e pH do meio. Estudos sobre cinética de absorção o uso de inibidores da síntese de proteínas e diferentes condições experimentais sugerem que o efeito da SH na nutrição das plantas, podem ser mediados pela modulação da síntese e funcionalidade de proteínas da membrana (NARDI et al., 2009).

Estudos têm sido realizados sobre a quantidade e funcionalidade de H^+ -ATPases de membrana plasmática. O papel central dessa enzima no crescimento vegetal e nutrição mineral tem sido claramente estabelecido (PALMGREN, 1998, DUBY & BOUTRY, 2009; PALMGREN et al, 2011). Vários estudos realizados sobre raízes excisadas ou plantas inteiras mostraram que a absorção de macronutrientes catiônicos e aniônicos é geralmente maior quando as raízes estão em contato com as concentrações adequadas de substâncias húmicas (VARANINI & PINTON, 1995; ZANDONADI et al., 2013). Considerando que a membrana plasmática da célula de raiz é a principal barreira entre o citoplasma e a rizosfera, é razoável acreditar-se que a própria membrana (e atividades associadas) é um dos alvos primários do efeito das substâncias húmicas (MUSCOLO et al., 2007; VAUGHAN & ORD, 1981; OJWANG & COOK, 2013). Entre outras proteínas de transporte de membrana plasmática (PM), é reconhecida que a H^+ -ATPase desempenha um papel primário nos processos fisiológicos da planta, tais como o crescimento e nutrição. Na verdade, esta enzima é responsável pelo transporte eletrogênica de prótons ao apoplasto celular e a consequente formação do gradiente eletroquímico, que pode ser utilizada para energizar o transporte ativo secundário de nutrientes através da membrana plasmática ou favorecer os processos uniporte de acordo com o gradiente de potencial (PALMGREN, 2001, FERNANDES & SOUZA, 2006).

Estímulo da extrusão ativo de H^+ a partir de raízes (CESCO, 1995; PINTON et al, 1997; ZANDONADI et al., 2007) e hiperpolarização potencial transmembranar (SLESACK & JUREK, 1988) indicaram o envolvimento da PM H^+ -ATPase no aumento da absorção de nutrientes geralmente observado na presença de substâncias húmicas (PINTON et al., 1999; PINTON et al., 2009). Uma prova direta de uma interação entre as moléculas húmicas e PM H^+ -ATPase foi obtido inicialmente por Varanini et al. (1993); e confirmado por trabalhos posteriores de Pinton et al. (1999); Façanha et al. (2002); Canellas et al. (2002) e Zandonadi et al. (2007), demonstrando que as moléculas húmicas em concentrações compatíveis com as presentes na rizosfera podem estimular a atividade fosfohidrolítica desta enzima nas vesículas isoladas de membrana plasmática, determinando assim um aumento do gradiente eletroquímico de prótons que pode ser, pelo menos em parte, responsável por uma estimulação da absorção de NO_3^- (PINTON et al., 1999a; QUAGGIOTTI et al., 2004).

A primeira evidência para um efeito de SH em proteínas de transporte diz respeito ao estímulo causado pelas frações HMS e LMS na atividade estimulada da K^+ -ATPase (acreditava-se ser coincidente como H^+ -ATPase de membrana plasmática) de frações microssomais (MAGGIONI et al, 1987; NARDI et al, 1991; PINTON et al, 1992). Evidência de que a bomba de prótons de membrana plasmática estaria diretamente envolvido no aumento da absorção de nutrientes devido à presença da SH, também é dado pela estimulação de extrusão de prótons

ativa a partir de raízes intactas, o que ficou evidente após 2-4 h de incubação (PINTON et al., 1997). Este efeito tem sido interpretado como uma consequência de um estímulo direto da SH sobre a bomba de prótons (H^+ -ATPase). Mais uma prova da ação das moléculas húmicas sobre PM H^+ -ATPase e sobre os mecanismos de absorção de nutrientes foi obtida quando se estudou o efeito dessas moléculas sobre a absorção de NO_3^- . O transporte desse nutriente é um processo substrato/induzível e envolve co-transporte de H^+ . Em taxas de absorção mais elevadas de NO_3^- , os níveis e a atividade da PM H^+ -ATPase de raiz aumentam (SANTI et al, 1995; SANTOS, 2006, LIMA, 2008). O contato das raízes por curto prazo (4 h) com substâncias húmicas de baixa massa molecular (SH_{H_2O}) na presença ou ausência de NO_3^- causou um desenvolvimento mais rápido da capacidade de absorção de NO_3^- e um aumento na atividade da PM H^+ -ATPase, medida nas vesículas isoladas de membrana plasmática a partir de raízes de milho (PINTON et al, 1999a;.), sem aumento na quantidade de proteína, este efeito foi atribuído à regulação pós-traducional da PM H^+ -ATPase.

Os efeitos estimulantes da fração LMS na absorção de NO_3^- as vezes requerem longos períodos de incubação (ALBUZIO et al., 1986; LIMA, 2008; JANNIN et al, 2012). Esses mecanismos poderiam ser explicados através de uma regulação do tipo “grosseira”. Na verdade, a partir do bombeamento de prótons por ATPase (H^+ -ATPase) sensíveis ao vanadato, que se acumula um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática (MORSOMME & BOUTRY, 2000) e modula o transporte ativo primário de células vegetais. Este gradiente energiza o transporte ativo secundário, realizado por proteínas transportadoras via simporte ou antiporte. Neste contexto, NO_3^- é ocupado por um simporte induzível H^+/NO_3^- com uma estequiometria de 2:1 (MILLER & SMITH, 1996; GLASS et al., 1992; EPSTAEIN & BLOOM, 2006). Outra linha de evidência, reforça a hipótese de que a fração LMS poderia interagir com essas proteínas de transporte (regulação “fina”), levando a uma modulação de absorção de NO_3^- (NARDI et al., 2009). Esta afirmação é reforçada pela observação da fração LMS pode chegar ao apoplasto e interagir com a membrana plasmática de raízes (VAUGHAN, 1986) e em células de cenoura em meio de cultura (MUSCOLO et al., 2007a), e mais recentemente nos estudos das interações dos AHs com biomembranas modelos (large unilamellar vesicle-LUV) mostrando que ocorre a adsorção superficial e a passagem de fragmentos húmicos através da membrana para o interior da célula, induzindo sua permeabilidade (OJWANG & COOK, 2013).

A bioatividade das substâncias húmicas também tem sido relacionada à acidificação da parede celular, causada pela ativação da H^+ -ATPase de membrana plasmática. Ação tida como o evento inicial da expansão celular (CANELLAS et al, 2005). Atividade essa verificada com o aumento na hidrólise de ATP pela H^+ -ATPase da fração microsomal devido à ativação das bombas de H^+ pelas substâncias húmicas isoladas de vermicomposto obtida de raízes de milho (NARDI et al., 1991). O mesmo ocorreu com plântulas de milho tratadas com substâncias húmicas solúveis em água isoladas de turfas, associada a um aumento na absorção de NO_3^- (PINTON et al., 1999; QUAGGIOTTI et al., 2004).

Aliado a atividade da PM H^+ -ATPase, observou-se um aumento nos níveis de transcrição da isoforma mHA2 de PM H^+ -ATPase em raízes de milho tratadas por 48h com uma fração húmica de baixo peso molecular de vermicomposto, dotado de AIA (QUAGGIOTTI et al., 2004). Vale ressaltar também que a ação de moléculas húmicas sobre as PM H^+ -ATPase, pode afetar positivamente a aquisição de nutrientes moderadamente solúveis, tais como Fe (VARANINI & PINTON, 2006). Aumentando a atividade da PM H^+ -ATPase, pode contribuir para nutrição de Fe de diversas maneiras: (a) por solubilização de Fe no apoplasto e na rizosfera, (b) mantendo as condições favoráveis para a atividade do Fe(III) quelato redutase (baixo pH no apoplasto e homeostase de potencial elétrico transmembrana), e (c) favorecendo a absorção de Fe (II) livre ou complexos Fe(III) (por exemplo, Fe-

fitosideroforos), bem como os transportadores de Fe de alta afinidade (PINTON et al., 2009; AGUIRRE et al., 2009).

Outra evidência é relatada no artigo de CANELLAS et al. (2002), em que ocorreu um estímulo da atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática, aparentemente, associada a uma capacidade de promover a expressão desta enzima, como confirmado pela análise de *western blot*. Sendo a isoforma de H⁺-ATPase PMA2 de *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. (MORSOMME et al., 1996), que apresentou quantidade de proteínas imunorreativas no locus PMA, em que aumentou quase três vezes mais na membrana das vesículas isoladas de raízes de milho tratadas com AH (CANELLAS et al., 2002).

Em outro estudo de Canellas et al. (2010), o AH aumentou em mais de quatro vezes a atividade da H⁺-ATPase sensível a vanadato, enquanto o estímulo da subfração de ácido húmico (SF) estimulou mais essa enzima do que a outras subfrações, podendo até reprimi-las. Os autores sugeriram que a ativação da ATPase parecia estar relacionada com o aumento do desenvolvimento radicular em plântulas de milho (QUAGGIOTTI et al., 2004; ZANDONADI et al., 2006). Promovendo parte do fenômeno responsável pelo aumento do número de sítios de mitose e raízes laterais, conferindo em maior área radicular (CANELLAS et al. 2010).

Sobre a absorção de nitrogênio, estudos fisiológicos demonstraram a existência de pelo menos três diferentes Sistemas de absorção de NO₃⁻ em plantas, com um sistema de transporte de baixa afinidade (LATS) ativos em alta concentração de NO₃⁻ externo e dois sistemas de transporte de alta afinidade, um destes sendo constitutiva (cHATS), enquanto o outro é induzida por nitratos (iHATS), que são ativos em baixas concentrações externas (GLASS & SIDDIQI, 1995; FORDE & CLARKSON, 1999). Assim, a absorção e assimilação de nitrato (ALBUZIO et al., 1986) em plântulas de cevada incubadas com SH e respectivas frações de um solo de pastagem a atividades da nitrato redutase (NR), glutamato desidrogenase (GDH) e glutamina sintetase (GS) foram analisados em conjunto com a taxa de absorção de nitrato. As atividades enzimáticas foram estimuladas pelo tratamento de extrato de húmus não-fracionado com aumentos em comparação aos controles em 65%, 35% e 45%, respectivamente.

Cacco et al., (2000) relataram que em experimentos de absorção de NO₃⁻, onde plântulas de trigo foram induzidas por frações húmicas de baixo peso molecular (LMS), aumentaram a V_{max} e reduziram o K_m em 60% quando comparado ao extrato de substância húmica sem sofrer fracionamento. Enquanto frações de alto peso molecular inibiram fortemente a taxa de absorção. Quaggiotti et al. (2004) encontraram para plântulas de milho pré-tratadas com LMS por 48h e transferidas para 1,5mM de NO₃⁻, maior influxo (70%) do que nas plantas controle. Este efeito foi atribuído a um aumento na atividade dos transportadores ou no aumento do gradiente de potencial eletroquímico, como verificado em plântulas de milho expostas a NO₃⁻ e ácidos húmicos extraídos com água promovendo maior atividade da PM H⁺-ATPase e levando ao aumento da força próton motriz para absorção de NO₃⁻ (PINTON et al., 1999).

Em outro estudo com suspensões de células de cenoura (MUSCOLO et al., 1999, 2013) a atividade das enzimas glutamato desidrogenas (GDH), glutamina sintetase (GS), e malato desidrogenase (MDH) também foram estudados. Todas as enzimas testadas foram positivamente afetados pela fração ácidos húmicos de baixo peso molecular. Considerando (HEf) como constituinte húmico solúvel em água de baixa massa molecular (abaixo de 3.5 kDa), compatível com a absorção radicular. E (HSp) como constituinte húmico de alta massa molecular, acima de 3.5 kDa (NARDI et al., 1991; MUSCOLO et al., 1999, 2013). A atividade da GDH, GS, e MDH foram aumentadas pelo tratamento Hef. Como conseqüência do aumento da atividade dessas enzimas, também foram encontrados um aumento na quantidade de metionina, treonina, isoleucina e lisina, derivados de aminoácidos da via do oxaloacetato.

Nas raízes, a atividade da nitrato redutase (NR) teve um efeito positivo, induzido por SH proveniente de diferentes materiais: D, L e R-HL. Para GS e glutamato sintase (GOGAT), os altos incrementos dependeram da fonte do AH. Em particular, D-HL mostrou os maiores

incrementos da atividade das enzimas GS e GOGAT com valores três vezes maiores em relação ao controle (ERTANI et al., 2013). Assim a redução do conteúdo de nitrato e o estímulo da atividade enzimática foi internamente transformada num incremento do conteúdo de proteína tanto na raiz e folha. HL induziu um incremento do nitrogênio orgânico como relatado para outros bioestimulantes e substâncias húmicas (CHEN et al., 2003; ERTANI et al., 2009; QUAGGIOTTI et al., 2004).

Abordagens genéticas, bioquímicas e fisiológicas foram realizadas para confirmar o efeito benéfico do extrato de ácido húmico (HA7) sobre o metabolismo e expressão de transportadores de N e S em canola por Jannin et al. (2012). Esses autores observaram que o nível de expressão do gene *BnNRT2.1* foi aumentado nas plantas tratadas por 1 dia e permaneceu superexpresso até 3 dias, mas não foi detectável após 30 dias de tratamento, enquanto a expressão de *BnNRT1.1* foi mais fortemente induzida posteriormente aos 3 e 30 dias. Observaram ainda que, a quantidade total de N, nas plantas tratadas, após 1 e 30 dias, mostraram que o HA7 afetou significativamente o conteúdo de N das raízes e aumento de massa seca, quando comparadas as plantas controle. Isto mostra que, a absorção de N foi seguida do estímulo de crescimento (JANNIN et al. 2012). A quantidade de S total nas plantas tratadas com HA7 resultou em significativo maior conteúdo de S após 30 dias de tratamento na parte aérea ($76 \pm 30,8\%$) e nas raízes ($137 \pm 13,7\%$). Além disso, os genes que codificam para transportadores de S na membrana plasmática, *BnSULTR1.1* e *BnSULTR1.2* foram induzidos após 1 e 3 dias de tratamento com HA7, bem como, os genes *BnSULTR4.1* e *BnSULTR4.2* que codificam para os transportadores de tonoplasto envolvidas nos fluxos vacuolares de sulfato, foi induzida apenas depois de 3 dias de tratamento (JANNIN et al. 2012).

Portanto, este compilado mostra como as substâncias húmicas tem uma ação direta sobre absorção e assimilação dos nutrientes, afetando sobremaneira a nutrição mineral e o crescimento das plantas. Contudo, os transportadores de Nitrogênio por exemplo, são específicos para amônio e para nitrato, tanto em alta como em baixas concentrações, necessitando de mais estudos para melhorar nossa compreensão sobre a participação das SHs na modulação da absorção e assimilação de nitrogênio e demais nutrientes.

2.5. A Hipótese da Ação Tipo Hormonal das Substâncias Húmicas

Além da controvérsia sobre a estrutura da SH também há um debate sobre suas propriedades funcionais no desenvolvimento e na fisiologia da planta (TREVISAN et al., 2009). Vários estudos têm mostrado que certos tipos de SHs (principalmente aqueles obtidos a partir de vermicompostagem) são capazes de afetar o crescimento da planta em hidroponia e sem limitações de nutrientes (TREVISAN et al., 2010; MORA et al., 2010, 2012). No entanto, estes efeitos foram expressos por faixas específicas de concentração, normalmente mais elevados do que aqueles envolvidos em complexos húmico-micronutrientes.

O estudo da relação entre a estrutura e atividade das substâncias húmicas é complicada devido a presença de outras moléculas, como AIA de origem microbiana, e a grande variedade dessas, por exemplo, Ferro et al., (2006) descreveram a existência de mais de 240 moléculas tipo auxina. E ainda hoje não está completamente claro se os mecanismos de ação através do qual a SH interage com as células das raízes pode subsequentemente influenciar a fisiologia e crescimento da planta (MUSCOLO et al., 2013).

Muitos autores (BOTTOMLEY, 1914a, 1914b, 1917; CACCO AND DELL'AGNOLA, 1984; VAUGHAN & MALCOLM, 1985; DELL'AGNOLA & NARDI, 1987; NARDI et al., 1988; O'DONNELL, 1973; PICCOLO et al., 1992; NARDI et al., 1996; MUSCOLO et al., 2013; NARDI et al., 2002) sugerem que o efeito biológico positivo da SH sobre a planta poderia ser devido a uma atividade tipo auxina, mas os dados que sustentam esta hipótese ainda estão em debate. Pois vários resultados de imunoprecipitação ou espectrométricas demonstraram a

identificação de ácido indol acético (AIA) no interior de várias SH (MUSCOLO et al., 1998; 1999; 2013; NARDI et al., 2000; CANELLAS et al., 2002; QUAGGIOITTI et al., 2004).

Muscole et al. (1998) testou a especificidade de AIA nas substâncias húmicas com várias preparações de anticorpos anti-AIA. Os dados sugeriram que AIA estava presente nas substâncias húmicas. Os resultados foram confirmados no estudo sobre o crescimento radicular de agrião. Tanto AIA e material húmico afetou significativamente a inibição radicular. A inibição foi parcialmente removida quando o anticorpo foi adicionado à solução demonstrando que o anticorpo se ligou ao antígeno de AIA ou fração húmica. A existência de mais de 240 moléculas tipo auxina descrito por Ferro et al. (2006), e tal número de auxinas e seus efeitos pleiotropicos poderia promover a diversidade de crescimento radicular e padrões de ativação das bombas de prótons induzidas por diferentes tamanhos das frações de AH (CANELLAS et al., 2010).

Atualmente, duas abordagens têm sido empregadas para sobrepor as limitações envolvidas no estudo com hormônios. Uma delas é a dosagem do conteúdo hormonal endógeno nos tecidos (PERES et al., 1997) com técnicas analíticas muito sensíveis como a cromatografia do tipo HPLC, e o uso de anticorpos em ensaio do tipo ELISA, além de espectrometria de massas (MS) acoplada à cromatografia gasosa ou líquida, e a outra abordagem é através do uso de plantas transgênicas nas quais se introduzem genes que alteram o metabolismo ou a sensibilidade hormonal. Assim, mutantes nos genes envolvidos no transporte polar de auxina ou ação com AUX1 e TIR1 ou tratamentos com químicos inibindo os mesmos processos, como 1-NOA e PCIB, resultaram em um número reduzido de primórdios de raiz lateral. O gene repórter de auxina DR5::GUS e a transcrição de genes responsivos a auxina *IAA5* e *IAA19*, mostraram que as SHs induzem a formação de raízes laterais principalmente através de sua atividade tipo auxina (TREVISAN et al., 2009).

Um número de estudos tem mostrado que esta capacidade da SH em afetar o crescimento e morfologia da raiz poderia envolver a ação de diferentes fitorreguladores, tal como ácido indol acético (AIA), citocininas, giberelinas e óxido nítrico (ON) (MUSCOLO et al., 1998, 2013; ZANDONADI et al., 2007, 2010; DOBBS et al., 2010; QUAGGIOTTI et al., 2004; VACCARO et al., 2009; PIZZEGHELLO et al., 2013).

Em muitos desses estudos a possível função do AIA e ON na ação da SH sobre o desenvolvimento da raiz foi associada com a presença de AIA na estrutura húmica supramolecular (MUSCOLO et al., 1998; CANELLAS et al., 2002; ZANDONADI et al., 2007). Estudos têm demonstrado que as substâncias húmicas extraídas de diferentes fontes podem reagir com anticorpos dirigidos contra AIA (MUSCOLO et al., 1998; PIZZEGHELLO et al., 2001) membranas celulares de cenoura marcadas com fluoresceína também foram observados com coloração fluorescente semelhante para o AIA e substâncias húmicas de baixo peso molecular (MUSCOLO et al., 2007). Além disso, a presença de grupos auxínicos trocáveis em substâncias húmicas extraídas de húmus de vermicomposto foi revelado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CANELLAS et al., 2002).

Em geral, os mecanismos propostos para explicar estes efeitos baseiam-se na presença potencial de auxina ou compostos semelhantes à auxina (Tabela 1) nas estruturas agregadas na SH-supramolecular (NARDI et al., 2002; CANELLAS et al., 2005; TREVISAN et al., 2010). No entanto, outros estudos que empregam substâncias húmicas sedimentares purificadas, sem concentrações detectáveis dos principais fitorreguladores em sua composição, mostrou que o AH é capaz de afetar a raiz e a funcionalidade da parte aérea (PA), tanto em nível transcricional e pós-transcricional (AGUIRRE et al., 2009; MORA et al., 2010, 2012; JANNIN et al., 2012). Neste sentido, os resultados de (MORA et al., 2010; JANNIN et al., 2012) indicam que o AH provavelmente afeta o crescimento de PA, melhorando a absorção radicular de nitrato e sua translocação da raiz para PA. Esta ação promove a translocação de citocininas ativas da raiz para a parte aérea, aumentando assim o estado dos nutrientes da parte aérea e seu

desenvolvimento (MORA et al., 2010). Essas relações funcionais entre absorção radicular de nitrato, bem como a funcionalidade de citocininas na parte aérea envolvida na ação das substâncias húmicas sobre o desenvolvimento da parte aérea foi apoiada por estudos fisiológicos e de transcrição gênica realizadas em canola (JANNIN et al., 2012). Quanto aos efeitos dos AH sobre a raiz, o qual pode estar por trás dos efeitos acima mencionados sobre a parte aérea, alguns estudos mostraram que o AH é capaz de afetar a concentração radicular de etileno, o ácido indol-acético (IAA), ácido abscísico (ABA) e óxido nítrico (NO) (MORA et al., 2012). Esses autores mostraram ainda que, a ação macro-morfológico do AH na arquitetura da raiz não foi dependente de efeitos do AH sobre o equilíbrio hormonal na raiz.

Tabela 1. Atividade biológica de diferentes frações húmicas em diferentes espécies de plantas, e hipótese relacionada entre estrutura e atividade.

Culturas	Materiais	Efeito Biológico	Atividade-estrutura	Hipótese	Ref
Agrião	Fração de matéria orgânica < 3500 Da	Aumento no crescimento da raiz	Presença de moléculas de AIA nos SH	SH com atividade tipo auxina	Muscolet al., 1998; 2013
<i>Pinus sylvestris</i>	Fração de matéria orgânica de pinus, de baixo (LMS) e alto (HMS) tamanho molecular.	Maior grau de lignificação, taxa de diferenciação dos vasos do xilema, e atividade de invertases, peroxidases e esterases	Conteúdo alto de moléculas de AIA nas frações LMS e HMS	SH com atividade tipo auxina	Nardi et al., 2000
Tomate	AH de vermicomposto de resíduo orgânico	Aumento no crescimento da planta	Presença de reguladores de crescimento no vermicomposto	AH com atividade tipo hormônio	Atiyeh et al., 2002
Tomate	Fração tipo-AH extraído com água	Ativação de mecanismos de aquisição de Fe operando em nível foliar	Estrutura química de AH de baixo peso molecular extraído com água com complexo de Fe	AH extraído com água sem efeito tipo-auxina	Tomasi et al., 2009
Tomate	SH de vermicomposto, tratado quimicamente para causar mudanças estruturais e conformacionais	Efeito na arquitetura radicular e ativação de ATPase de tomate e milho	Domínio hidrofóbico, e componentes bioativos	SH com atividade tipo auxina	Dobbss et al., 2010
Arabidopsis e Milho	AH de vermicomposto e separado em frações com redução de peso molecular	Crescimento radicular de plântulas, com diferentes efeitos em relação às plantas e tamanhos moleculares	Conteúdo específico de moléculas bioativas	Frações AH com resposta exógena clássica tipo auxina	Canellas et al., 2010
Milho	AH extraído de diferentes solos	Estímulo de crescimento de raiz, PRL e V H ⁺ -ATP-ases	Estrutura química de AH condensada	AH com atividade tipo auxina	Zandonadi et al., 2007
<i>Lepidium Papilliferum</i>	AH isolado de três camadas de um perfil de solo de deserto	Aumento no crescimento de raiz e parte aérea	Característica química de estrutura hidrofóbica	Efeito induzido por grupos funcionais e composição química	Loffredo et al., 2010
Pepino	AH de leonardita	Aumento no crescimento da PA, atividade da H ⁺ -ATPase da raiz e concentração de NO ₃ ⁻ na PA, e redução de crescimento da raiz.	Conformação molecular do AH	AH sem atividade tipo auxina	Mora et al., 2010

2.6. A Proteção das Substâncias Húmicas contra Estresse

Grandes avanços têm ocorrido nos últimos anos em relação aos estudos sobre os efeitos das substâncias húmicas nas plantas, o que possibilitou a descoberta de novos efeitos dos AHs sobre diferentes mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares. Os AHs tem demonstrado ter efeitos sobre o metabolismo dos fenilpropanoides induzindo a atividade PAL/TAL (SCHIAVON et al., 2010). Também tem sido proposta uma ação direta sobre a distribuição de NO_3^- da raiz à planta inteira, promovendo um efeito na distribuição dos conteúdos de citocininas e transporte de nutrientes, o qual se vincula com a atividade das H^+ -ATPases exercida pelos AHs (MORA et al., 2010). Nesse sentido tem sido comprovado que o NO funciona como mediador na atividade tipo auxina dos AHs, induzindo a atividade das H^+ -ATPases e ratificando os mecanismos de crescimento mediante a extrusão de H^+ na raiz (ZANDONADI et al., 2010).

Recentemente se propôs um novo modo de ação dos AHs através da sua interação com as raízes das plantas, onde se explica que os AHs são capazes de aglomerar-se nas raízes afetando sua transpiração e, portanto sua condutividade hidráulica por meio de um estresse coloidal (ASLI & NEUMANN, 2010). Outros autores têm encontrado efeitos sobre os mecanismos de defesa antioxidativos, reportando-se um estímulo das catalases (CAT) e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), que atuam como intermediários no crescimento das plantas (CORDEIRO et al., 2011). Mesmo assim, tem-se reportado estímulos do crescimento, baseados em SH, promovendo a atividade do superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APOX) em plantas submetidas ao estresse por déficit de água (VASCONCELOS et al., 2009).

Esta relação AH-ERO como mecanismo de defesa antioxidativo, é fundamental para o entendimento nos modos de ação dos AHs, devido a importância das ERO e as enzimas de defesa antioxidativo na regulação dos processos bioquímicos. A produção de ERO nas plantas superiores é inerente à fotossíntese e à respiração (GILL & TUTEJA, 2010) e estimulam-se em resposta a maioria dos processos mais importantes, entre eles, estresse, sinalização hormonal, crescimento polar, gravitropismo (MORI & SCHROEDER, 2004). As ERO são capazes de induzir hiperpolarização da membrana induzindo o Ca^{2+} citossólico (PEI et al., 2000) ao mesmo tempo que as auxinas também lideram os eventos de polarização em nível celular (KRAMER, 2009). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma das mais estáveis ERO nas plantas que se difunde através das membranas (HENZLER & STEUDLE, 2000) e em baixas concentrações funciona como molécula sinalizadora para a adaptação a vários estresses abióticos e bióticos (QUAN et al., 2008) e atua sobre os processos de crescimento e desenvolvimento (Foreman et al., 2003). Recentemente Garcia et al. (2012) mostrou que plantas de arroz submetidas ao estresse hídrico aumentaram sua proteção contra estresse oxidativo a partir da aplicação do AH. Em adição, Aydin et al. (2012) sugeriram que o AH tem grande potencial em aliviar o estresse salino sobre o crescimento das plantas de feijoeiro em condições de solo salino de áreas áridas e semiáridas. O AH parece ser altamente efetivo como condicionador de solo no crescimento vegetal, melhorando a tolerância e crescimento das culturas em condição salina.

Trevisan et al. (2011), aplicou estudos de sequenciamento para estudar os efeitos destas substâncias em *Arabidopsis thaliana*, no entanto, estes estudos foram feitos mediante técnica de cDNA-AFLP, e Jannin et al. (2012) em *Brassica napus* por meio de microarranjo. Em estudo combinando análises fisiológicas e microarranjo para explicar os efeitos do AH em canola de inverno, esses autores verificaram que o aumento na assimilação de N, C e S poderiam explicar o aumento em crescimento das plantas tratadas com AH, além do mais, alguns genes envolvidos em diferentes vias metabólicas (responsivas ao estresse e a senescência) foram reprimidas e expressas em resposta ao AH.

2.7. Absorção de Nitrogênio pelas Plantas

Nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) são as principais formas de nitrogênio disponível para as plantas, entretanto, vale ressaltar as altas perdas de N (lixiviação, desnitrificação, erosão do solo, volatilização e imobilização) direcionaram as pesquisas para entender os mecanismos envolvidos na absorção de N pelas plantas (GLASS, 2003).

A absorção de NO_3^- é um processo ativo, via simporte com 2 prótons ($\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$) (SONDERGAARD et al. 2004; SOUZA & FERNANDES, 2006), enquanto a absorção de NH_4^+ é passivo e acontece através de um transportador do tipo uniporte (SOUZA & FERNANDES, 2006). A força próton-motriz usado no simporte de NO_3^- é gerada pela H^+ -ATPase de membrana plasmática (PM H^+ -ATPase) (SONDERGAARD et al., 2004) que hidrolisa ATP, bombeando H^+ para fora da célula, o que cria um gradiente de potencial eletroquímico, que é composto do potencial elétrico através da membrana ($\Delta\Psi$) e da diferença de potencial químico para o ion NH_4^+ ou NO_3^- ($\Delta\mu_{\text{NH}_4^+}$ ou $\Delta\mu_{\text{NO}_3^-}$) entre o interior e o exterior da célula (SOUZA & FERNANDES, 2006). O gradiente de prótons gera uma força próton motriz, direcionando os H^+ do exterior da célula para o citossol (SOUZA & FERNANDES, 2006). O gradiente de potencial eletroquímico contribui favoravelmente para a entrada de cátions na célula, enquanto que os ânions são absorvidos acompanhando o fluxo de prótons (SOUZA & FERNANDES, 2006). A assimilação de NH_4^+ é seguida pela produção de um equimolar de prótons que são extrusados do citossol no apoplasto (VON WIRÉN, 2000). Vale ressaltar que o processo de absorção de nitrogênio pelas plantas ocorre com a translocação do nitrato pela membrana plasmática por um sistema de simporte com dois prótons, enquanto o amônio segue através dessa membrana por um sistema de transporte caracterizado como uniporte (SOUZA & FERNANDES, 2006). Assim, em uma concentração de 1 mM de NH_4^+ ou NO_3^- , as proteínas transportadoras desses íons podem ter maior ou menor afinidade durante o processo de absorção, sendo denominado de HATS (High affinity transport system) quando a concentração deste nutriente está abaixo de 1 mM, e LATS (Low affinity transport system), quando a concentração está acima de 1 mM (SANTOS, 2009; DECHORGNAT et al, 2011).

A absorção de nitrato é mediada pela família NRT (transportadores de nitrato) enquanto a absorção de amônio é mediado, pela família AMT (transportadores de amônio) (MAATHUIS, 2009). Ambos os tipos de transportadores operam em alta e baixa afinidade de acordo com a disponibilidade do íon no solo (SPERANDIO, 2011). As isoformas *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* (alta afinidade) são expressas somente nas raízes (LOQUE, 2007). Em arroz, os transportadores de NO_3^- de alta afinidade *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* são induzidos por NO_3^- e são controlados por genes que podem ser considerados candidatos em ter uma função no uso eficiente do N (ARAKI, 2006).

A indução dos genes que codificam para as proteínas transportadoras de NO_3^- do sistema iHATS, é estimulada pela presença de NO_3^- no meio, enquanto que os sistemas transportadores de NH_4^+ são induzidos pela ausência de NH_4^+ no meio externo. As proteínas transportadoras de NH_4^+ são codificadas por uma família multigênica, e apresentam ampla variação de padrões de cinética de absorção, este fato demonstra a plasticidade das plantas, para a aquisição de formas reduzidas de N, que devem ter sido abundantes durante certo período na evolução das plantas superiores (SOUZA & FERNANDES, 2006).

O sequenciamento do genoma do arroz revelou a existência de 10 isoformas de PM H^+ -ATPase (SPERANDIO, 2011). Baxter et al. (2003) propôs três explicações para esse alto número de isoformas: diferentes isoformas podem estar envolvidos em alguns tipos celulares com uma propriedade bioquímica somente; eles apresentam expressão em tecidos específicos com níveis de expressão apropriadas para cada tecido; ou múltiplas isoformas tem funções redundantes. Algumas isoformas PM H^+ -ATPase tem sido identificadas como sendo

relacionadas a nutrição mineral de plantas, tal como a isoforma OsA8 envolvida na aquisição e translocação de fósforo em arroz.

O nitrogênio pode ser encontrado no solo nas formas prontamente disponíveis às plantas (NH_4^+) e (NO_3^-), sendo transportados até as raízes por meio da solução aquosa do solo. Mas, algumas culturas têm preferência pela absorção de N na forma amoniacal (MALAGOLI et al., 2000). As formas amoniacais e nítricas apresentam diferentes efeitos na planta, influência no crescimento, no vigor do vegetal, produção de biomassa e até na reprodução (LANE & BASSIRIRAD, 2002).

Para algumas famílias de plantas, o íon NH_4^+ mostra efeito negativo sobre o crescimento da planta, isso é atribuído à necessidade de utilização dos carboidratos produzidos, prioritariamente, para a rápida assimilação do amônio absorvido, evitando seu acúmulo e consequentes problemas de toxicidade relacionados a alterações no pH celular e desbalanços iônico e hormonal, entre outros (BRITTO & KRONZUCKER, 2002).

3. CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROCÓPICA DOS ÁCIDOS HÚMICOS DE VERMICOMPOSTO

3.1. RESUMO

O conhecimento da estrutura e composição das substâncias húmicas e da sua relação com a propriedade e função é de grande interesse. O objetivo deste capítulo foi elucidar as diferentes características estruturais e de composição elementar dos ácidos húmicos, extraídos com diferentes extratores (NaHO, KOH e água), por meio de CHN e por ^{13}C CP-MAS RMN. Além de conhecer suas propriedades, os quais podem definir funções de bioatividade. As frações do tipo húmico foram obtidas a partir do vermicomposto de esterco bovino. A fração, ácido húmico (AHw) foi obtida utilizando apenas água como extrator, a fração AH foi extraída seguindo o método recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) tanto com KOH como NaOH. Após a extração, os AHs foram caracterizados usando a técnica espectroscópica de ^{13}C CP-MAS NMR e de composição elementar (CHN). A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para encontrar um padrão de agrupamento entre as variáveis estruturais avaliadas e suas propriedades. As frações de ácido húmico (AH) isoladas de vermicomposto usando a metodologia da IHSS e o método de extração com água (AHw) apresentaram diferentes características estruturais. O AHw possui uma relação C/N mais baixa em sua composição elementar e uma maior quantidade relativa de estruturas alifáticas (C_{Alkyl-H,R}) observada por ^{13}C CP-MAS RMN. Em contrapartida, o AH tem uma quantidade relativa maior de estruturas aromáticas (C_{Ar-H,R}; C_{Ar-O,N}). As frações HAw apresentaram ainda, maior quantidade de grupos carboxila (C_{COO-H,R}) quando comparada a fração AH. Estas evidências sugerem que, o AH tem propriedade mais aromática do que a fração AHw, que por sua vez, tem maior alifaticidade e hidrofobicidade.

Palavras chave: Ácido Húmico. Extração com água. Alifaticidade. ^{13}C CP-MAS RMN.

3.2. ABSTRACT

Knowledge of humic substances structure and composition and their relationship to property and function is of great interest. The objective of this chapter was to elucidate the different characteristics structural and elemental composition of the humic acids extracted with different extractors (NaOH, KOH and water), by CHN and by ^{13}C CP-MAS NMR. In addition to knowing their properties, which can define bioactivity functions. Humic type fractions were obtained from bovine manure vermicompost. The fraction, humic acid (HAw) was obtained using only water as an extractor, the HA fraction was extracted following the method recommended by the International Humic Substances Society (IHSS) with both KOH and NaOH. After extraction, the HAs were characterized using the ^{13}C CP-MAS NMR spectroscopic technique and elemental composition (CHN). Principal component analysis (PCA) was used to find a standard of grouping between the structural variables evaluated and their properties. The humic acid fractions isolated from vermicompost using the IHSS methodology (HA) and the water extraction method (HAw) showed different structural characteristics. The AHw has a lower C/N ratio in its elemental composition and a greater relative amount of aliphatic structures ($\text{C}_{\text{Alkyl-H,R}}$) observed by ^{13}C CP-MAS-NMR. In contrast, HA has a greater relative amount of aromatic structures ($\text{C}_{\text{Ar-H,R}}$; $\text{C}_{\text{Ar-O,N}}$). The HAw fractions also had a higher carboxyl groups ($\text{C}_{\text{COO-H,R}}$) amount when compared to the HA fraction. These evidences suggest that HA has a more aromatic property than the HAw fraction, which in turn has greater aliphatic and hydrophobicity.

Key-words: Humic Acid. Extraction with water. Aliphaticity. ^{13}C CP-MAS-NMR.

3.3. INTRODUÇÃO

As Substâncias Húmicas (SH) são componentes chave da formação de alguns solos, da fertilidade do solo e controlam as propriedades químicas e biológicas da rizosfera. São substâncias de coloração escura compostas por macromoléculas de massa molecular relativamente elevada formada através de reações de síntese secundária a partir de resíduos orgânicos de plantas, animais e microrganismos (STEVENSON, 1994). A fertilidade dos solos geralmente é muito influenciada pelas características moleculares da fração alcalino solúvel do carbono. As substâncias húmicas são dinâmicas e refletem as mudanças do uso do solo. (LIMA, 2008). É também responsável pelo seu acúmulo na forma de matéria orgânica no solo. Aproximadamente 90% (m/m) da estrutura da matéria orgânica (MO) morta do solo é composta de C (52-58%) e O (34-35%), seguido de N e H (3,3 a 7%) (DICK, 2009). Em relação a distribuição dos compostos orgânicos nitrogenados, identificados em maior proporção no solo, encontram-se os aminoácidos, como monômeros de proteínas, e os açúcares aminados, bem como pequenas quantidades de ácidos nucleicos (CAMARGO et al, 1999). A composição da matéria orgânica particulada (MOP) é fortemente influenciada pelo resíduo vegetal que a originou e, para avaliar a qualidade química do resíduo, a relação C/N é considerada uma característica interessante, pois resíduos provenientes de leguminosas tendem a apresentar uma relação C/N por volta de 20 e de gramíneas em torno de 40-80.

Andreux (1996) considera as substâncias húmicas como polímero aleatório, e estrutura formada por pontes de blocos poliaromáticos e cada uma por Ester, éter a ligações de C com proporções variáveis de carboxila, hidroxila, amino e outros grupos hidrofílicos. Entretanto, alguns estudos têm sugerido uma nova concepção para a estrutura destas complexas substâncias húmicas (ORLOV et al., 1975; PICCOLO, 2002; PICCOLO 2001; SUTTON & SPOSITO 2005). Foi postulado por Piccolo et al. (1999) que os ácidos húmicos são formados por uma mistura heterogênea de pequenas moléculas reunidas num arranjo supramolecular estabilizado por forças relativamente fracas (ligações do tipo van de Waals, π - π , CH- π). Essas ligações podem ser quebradas reversivelmente na presença de baixas concentrações de ácidos orgânicos (NARDI et al., 2000; COZZOLINO et al., 2001; CANELLAS et al, 2005). Esse agregado menor corresponderia à célula estrutural mínima das substâncias húmicas sobre a qual vai se desenvolvendo paulatinamente a macroestrutura através da adição de camadas sobre esta célula básica, num arranjo semelhante ao supraestrutural (Orlov et al. 1975).

É de grande interesse o conhecimento da estrutura e composição das substâncias húmicas e da sua relação com a propriedade e função. Principalmente no que se refere a sua ação sobre as plantas, atualmente debatidos (CANELLAS et al., 2005; GARCIA et al., 2012). Assim o objetivo deste capítulo foi elucidar as diferentes características estruturais e de composição elementar dos ácidos húmicos, extraídos com diferentes extratores (NaHO, KOH e água), por meio de CHN e por ^{13}C CP-MAS RMN. Para conhecer suas propriedades, os quais podem definir funções de bioatividade nos estudos posteriores com plantas.

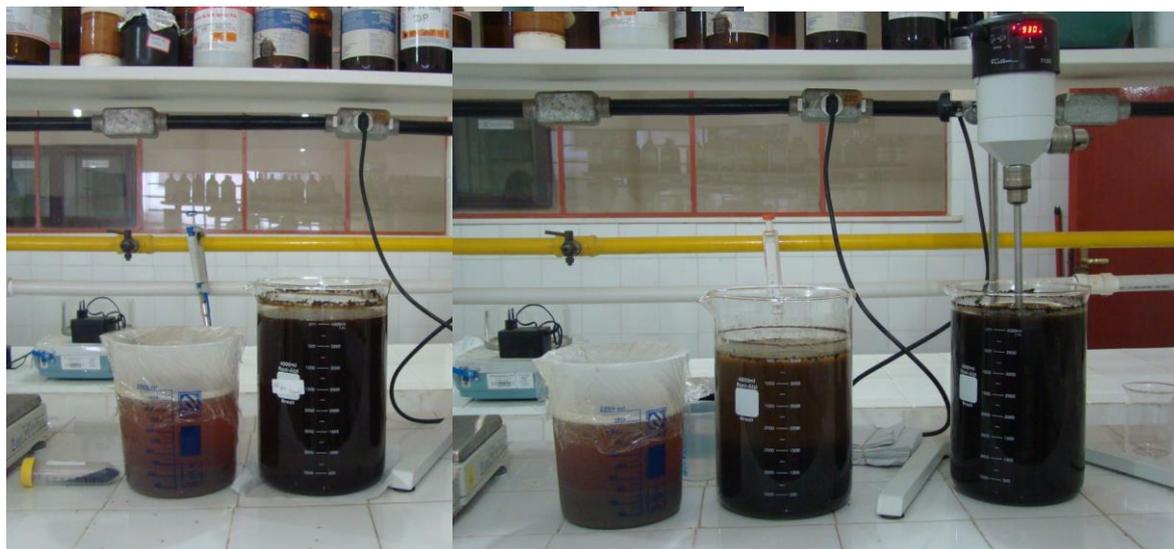
3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Extração das frações AH

O primeiro AH foi doado pelo professor Leonardo Dobbs. Este foi extraído com NaOH e caracterizado espectroscopicamente no departamento de química da UFRRJ.

O vermicomposto (VC) foram obtidos da Fazenda Agroecológica da Embrapa (Fazenda Agroecologica da Embrapa, estado do Rio de Janeiro-RJ, Brasil). O AH foi isolado e purificado de vermicomposto de acordo com a metodologia recomendada pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2013) e de acordo com o protocolo relatado por Swift (1996). Os ácidos húmicos foram extraídos usando KOH 0,1 mol L⁻¹, na razão vermicomposto:extrator de 1:10 (v/v) sob agitação por 24h e permanecendo em repouso por mais 24h para solubilização das SH, sob atmosfera inerte de N₂. O sobrenadante foi coletado através de centrifugação e filtrado. A separação do ácido húmico (precipitado) dos ácidos fúlvicos (sobrenadante) foi conseguida pela diminuição do pH da solução até 1,0 com HCl 6 mol L⁻¹ e a suspensão foi resfriada e mantida em repouso por 16 horas (Figura 1). O precipitado foi coletado através de centrifugação. Em seguida, o precipitado de ácido húmico extraído em meio alcalino foi resuspenso em 200 mL de uma solução aquosa diluída contendo HF 0,3 mol L⁻¹ e HCl 0,1 mol L⁻¹ em frasco plástico agitando a amostra em temperatura ambiente por uma noite. O precipitado foi coletado através de centrifugação. Em seguida, os ácidos húmicos foram transferidos para membrana de diálise (Spectra/Por® 7 dialysis tubing, MWCO 3500) para retirar o excesso de íons através de diálise contra água deionizada até o teste negativo com AgNO₃. O extrato contendo o AH solúvel foi congelado em -80°C e seco por liofilização, em seguida realizada sua caracterização por técnicas de alta resolução como ¹³C RMN e composição elementar (Tabela 1).

A fração, ácido húmico, obtido utilizando apenas água como extrator (HAa), foi isolada com algumas modificações. Resumidamente, uma massa de VC foi adicionada a um volume de água deionizada (H₂O)_d numa razão VC/(H₂O)_d de 1:10 m/v, que foi mantida num agitador mecânico durante 48 h sob atmosfera de N₂ (g). O sobrenadante foi decantado, centrifugado a 10.000 rpm por 30 min e filtrado através de papel de filtro. Este sobrenadante foi ajustado para pH 1,5 por adição de HCl (6 mol L⁻¹) para precipitar o AHw. Após 10 h, a fração de ácidos fúlvicos na fração líquida foi decantada e removida por centrifugação. O AHw foi agitado por 24 h em contato com uma solução de HCl/HF/H₂O na proporção de 1:1:98 (v/v) para aproximadamente 100 mL g (AHw), para remover os elementos minerais. A suspensão foi novamente centrifugada para remover a solução e, o AHw foi lavado com água destilada. Em seguida, o AHw foi transferido para uma membrana de diálise (14 kDa), e o procedimento foi realizado em água destilada até se obter um teste negativo para os íons Cl⁻ usando AgNO₃ (0,1 mol L⁻¹). Em seguida, o AHw foi congelado a -80° C e liofilizado e armazenado em um dessecadora e purificada a partir da VC seguindo a metodologia descrita por Pinton et al. (1998) com a.



Extração com KOH

Extração com água

Figura 1. Extração de ácidos húmicos com KOH e com água.

3.4.2. Análise de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C -NMR)

Foi verificado por RMN que o ácido húmico extraído com água não necessitou ser submetido ao processo de purificação. Entretanto o AH extraído com KOH necessitou ser submetido ao processo de purificação.

A análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico (^{13}C CP MAS NMR) foi realizada no aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm *Narrow MAS* e operando em sequência de ressonância de ^{13}C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, as amostras dos materiais humificados foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO_2) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8 ± 1 kHz. Os espectros foram obtidos pela coleta de 2048 *data points* para igual número de *scans* a um tempo de aquisição de 34 ms e com *recycle delay* de 5 s. O tempo de contato para a sequência em rampa de 1H ramp foi de 2 ms. A coleta e elaboração espectral são realizadas utilizando o Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (FID) são transformados aplicando um zero *filling* igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (*line broadening*) de 70 Hz. A razão entre os Índices de hidrofobicidade e hidrofilicidade (HB / HL) foi calculada como se segue: $\text{HB/HL} = [(0-46 \text{ ppm}) + (110-142 \text{ ppm})] / [(46-110 \text{ ppm}) + (142-230 \text{ ppm})]$. A aromaticidade e alifaticidade foram calculadas de acordo com o procedimento detalhado em Song et al., (2008).

3.4.3. Análise elementar (CHN)

A análise elementar foi obtida utilizando um analisador elementar Perkin Elmer 2400 CHN. As análises foram realizadas utilizando-se $1,1 \pm 0,1$ mg de amostras pesadas em micro balança acoplada ao aparelho (GARCIA et al., 2014).

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para encontrar um padrão de agrupamento entre as variáveis estruturais avaliadas e suas propriedades.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Ressonância magnética nuclear de ^{13}C

A técnica de ^{13}C CP-MAS NMR (ressonância magnética nuclear de ^{13}C com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico) tem sido intensamente utilizada para o estudo da matéria orgânica do solo tanto para avaliar sua composição e estrutura (KÖGEL-KNABER et al., 1991; NOVOTNY et al., 2004), quanto para acompanhar suas transformações (LEINWEBER et al., 1993) e avaliar os efeitos de diferentes sistemas de manejo do solo (PRESTON et al., 1994; NOVOTNY et al., 2004). Os espectros de ^{13}C CP-MAS NMR das amostras analisadas foram semelhantes (Figura 4) e típicos de ácidos húmicos com perda de resolução (PRESTON et al., 1994; NOVOTNY et al., 2004). Entretanto é possível observar que as amostras extraídas em meio alcalino apresentaram grande ruído devido, segundo Novotny et al. (2004), possivelmente devido à presença de grandes quantidades de íons paramagnéticos (especialmente Fe^{3+} e Mn^{2+}), sendo necessária a etapa de purificação (Figura 4b), o que não ocorre naquelas extraídas somente com água (Figura 4c). Embora os espectros sejam semelhantes visualmente, ao se calcular as áreas referentes a cada grupo funcional (Tabela 1) pôde-se identificar diferenças entre as amostras analisadas a partir dos principais intervalos de ressonância que são atribuídos a diferentes tipos de carbono segundo Song et al., 2008: 0-46 ppm, C alquílico; 46-59 ppm, C Metoxil e N-alquílico; 59-91 ppm, C O-alquílico; 91- 110 ppm, C di-O- alquílico e alguns aromáticos; 110-142 ppm, C aromático; 142-156 ppm., C O-aromático; 156-186 ppm, C carboxílicos, amidas e ester; 186-230 ppm, C carboxílico.

De um modo geral, os ácidos húmicos apresentam características similares ao da literatura (AGUIAR et al., 2013 a,b; DOBBSS et al., 2010). A Figura 2 mostra o espectro obtido para os ácidos húmicos através da técnica ^{13}C CP MAS NMR. O espectro mostra uma assinatura semelhante aos reportados na literatura para ácidos húmicos isolados de vermicomposto (Dobbss et al., 2010; Canellas et al., 2013). Na Tabela 2 mostra-se um predomínio de estruturas do tipo C-alquil (0-45 ppm), C-alquil-O,N (45-65 ppm), C-alquil-O (65-95 ppm) e C-Aromático (110-142 ppm). Os ácidos húmicos apresentaram características alifáticas mais marcadas que as aromáticas. Estas características e o índice HB/HI foram semelhantes aos relatados na literatura (AGUIAR et al., 2012; AGUIAR et al., 2013).

Alguns destes picos predominantes entre 0-59 ppm, podem ser o resultados da presença de grupamentos - CH_3 terminais pertencentes a estruturas lipídicas de tecidos vegetais e poliésteres alifáticos. O pico entorno a 55 ppm pertence a grupamentos metoxilas ligados a anéis aromáticos de ligninas. O pico por volta de 72 ppm é resultado da superposição dos carbonos C_2 , C_3 e C_5 nas estruturas piranósicas de celulose e hemicelulose, assim como o sinal do carbono anomérico C_1 que aparece entorno de 104 ppm. Os picos em torno de 172 ppm podem ser assinalados a grupos carboxilas (SPACCINI & PICCOLO, 2007; AGUIAR et al. 2013).

A intensidade relativa dos picos varia entre as amostras de vermicomposto extraídas com KOH e água. Assim, na primeira região dos espectros 0-46 ppm, as amostras de ácido húmico de vermicomposto extraído com água possuem dois picos em 22 e 28 ppm, característicos de CH_2 e CH de cadeias alquila (GIOVANELA, 2002; MESSIAS, 2004), correspondendo a 40,6%. Já o ácido húmico de vermicomposto extraído com KOH possui 19,79% da composição do ácido húmico nessa região.

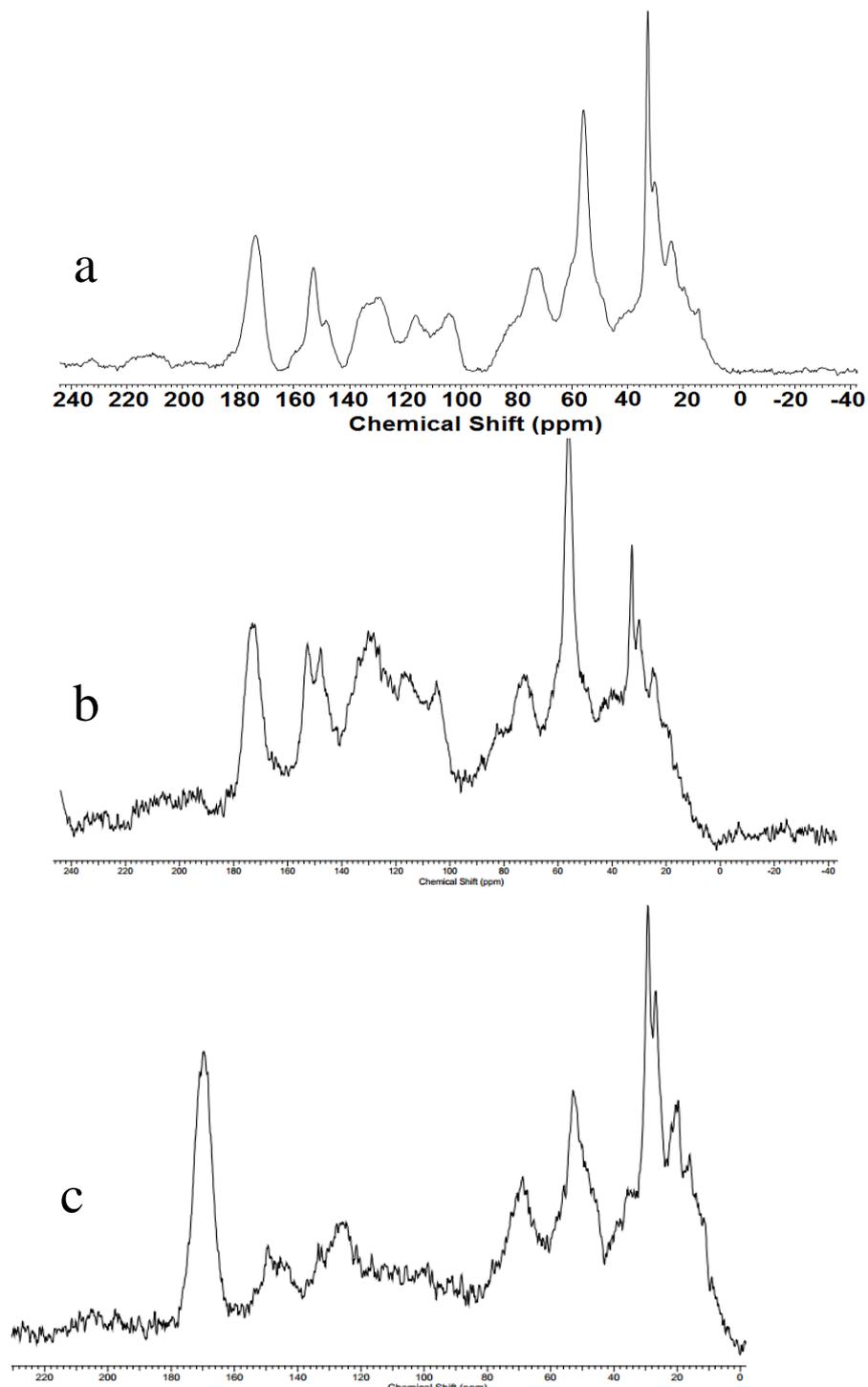


Figura 2. Espectros de ^{13}C CP-MAS NMR no estado sólido dos ácidos húmicos de vermicomposto extraídos com (a) NaOH (b) KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (c) extraídos com água.

A segunda região dos espectros (Figura 2 e (Tabela 2) é caracterizada por um pico bem definido a 55 ppm, típico de C com ésteres e éteres alifáticos (metóxi e etóxi) de lignina. A Terceira região dos espectros (59 -91) com 10,41% da composição do ácido húmico extraído com água e 13,5% em KOH, apresenta um pico em 71 ppm, característicos de C éteres de anéis de polissacarídeos. Esses picos estão presentes nas duas amostras extraído com KOH e água, mas com maior intensidade nos ácidos húmicos extraído com água. A região de 91-110 ppm, atribuído ao C ligado a dois átomos de oxigênio e a C anomérico em polissacarídeo

(GIOVANELA, 2002), corresponde a 4,1% da composição do ácido húmico extraído com água e 6,25% com KOH.

Na região característica de C aromáticos (110-142 ppm) com 11,4% da composição do ácido húmico extraído com água, e 19,79% extraídos com KOH, as amostras apresentam um pico em 128 ppm, atribuído a C aromáticos não substituídos ou alquil substituídos. Nas amostras extraídos com KOH (Figura 2b) esse pico apresenta maior intensidade em relação ao ácido húmico extraído com água (Figura 2c). Os espectros na região de 142-156 ppm refere-se a C aromáticos substituídos por O e N, como etéres aromáticos, fenóis e aminas aromáticas, nas amostras extraídos com KOH (figura 4b) essa faixa apresenta 8,33% e 4,1% nas com água.

Na região compreendida entre 156-186 ppm com 14,58% da composição do ácido húmico extraído com água e 10,42% com KOH, apresenta um pico em 172 ppm, que é normalmente associado a C carboxílico, C de ester e de amida. Esse pico está presente em ambos os ácidos húmicos com intensidades similares (Figura 2).

Na região compreendida entre 186-230 ppm com 3,12% da composição do ácido húmico extraído com água e 9,38% com KOH, essa região é associada a C carbonílico de aldeídos e cetonas (MESSIAS, 2004).

Tabela 2. Distribuição relativa de carbono (%) em regiões de deslocamento químico (ppm) dos espectros de ^{13}C -CPMAS-RMN, grau de aromaticidade e alifaticidade, índice de hidrofobicidade e quantidade relativa (%) de carbono, nitrogênio e hidrogênio em base seca de ácido húmico extraído com KOH.

Atribuição		Faixa de mudanças químicas (ppm)	Código	AH NaOH	AH KOH	AH H ₂ O
^{13}C -CPMAS NMR	C-alkil-H,R	0-46	C _{Alk-H,R}	29,29	19,79	40,6
	Metoxilas e C-alkil-O,N	46-59	C _{Alk-O,N}	19,19	12,5	10,41
	C-alkil-O	59-91	C _{Alk-O}	13,13	13,54	10,41
	C-alkil-di-O (anomérico)	91-110	C _{Alk-di-O}	5,05	6,25	4,1
	C-aromático- H,R	110-142	C _{Ar-H,R}	13,13	19,79	11,4
	C-aromático-O,N	142-156	C _{Ar-O,N}	7,07	8,33	4,1
	C-carboxila-H,R	156-186	C _{COO-H,R}	9,09	10,42	14,58
	C-carbonila	186-230	C _{C=O}	4,04	9,38	3,12
	Aromaticidade	-	Arom	20,2	28,13	15,62
	Alifaticidade	-	Alif	79,79	71,88	84,3
Índice de hidrofobicidade	-	HB/HL	0,73	0,66	0,88	
Elementar	Nitrogênio		N	-	3,39	4,17
	Carbono		C	-	34,9	35,0
	Hidrogênio		H	-	4,58	4,96
	Razão Carbono/Nitrogênio		C/N	-	10,31	8,38
	Matéria Orgânica		MO	-	60,2	60,33

Pode ser observado, na Figura 2 e Tabela 2, que as amostras de vermicomposto extraído com água apresentam maiores valores nas áreas das regiões compreendidas entre 0-110 ppm, atribuídas a C-O de metoxila e de carboidratos, e entre 156-186 ppm, normalmente associado a C carboxílico, C de ester e de amida. Essas amostras apresentam, porém, menores valores das áreas das regiões características de C ligado a dois átomos de oxigênio e a C anomérico em

polissacarídeo 91-110 ppm e áreas entre 140-160 ppm, que são atribuídas a grupos O-aromáticos e de C aromáticos não oxigenados (110-140 ppm). É sabido que, com o avanço da humificação, o conteúdo de grupos carboxílicos e aromáticos aumenta, enquanto o de O-aromáticos e metoxilas diminuem (KOGEL-KNABNER et al., 1991; PRESTON et al., 1994).

As amostras de vermicomposto extraído com água apresentam enfim, maiores valores nas regiões que caracterizam carbono alquilico não substituído e C carboxílico e em geral conferem as propriedades alifaticidade e hidrofobicidade do material (Figura 3 e Tabela 2). Entretanto, as amostras extraídas com KOH apresentam maiores valores nas regiões que caracterizam C alquilico substituído, carbonila, C anomérico, C aromático substituído por O e N e não-substituído, conferindo a sua propriedade de maior aromaticidade e conseqüente menor alifaticidade (Figura 3).

A análise de componentes principais (ACP) das frações ácidos húmicos, obtidos por meios de diferentes extratores explicou 100% da variabilidade total nas duas primeiras componentes (Figura 3A), sendo que 82,5% da variância estão explicados pela CP1, e 17,5% explicados pela CP2. A CP1 é explicado pelas contribuições positivas dos C-alkil-H,R, Alifaticidade, Índice de hidrofobicidade, C-carboxila-H,R, associados aos húmicos extraídos com água (AH_a) (Figura 3B, D). Em oposição, projeta-se negativamente na CP1, C-carbonila, C-aromático- H-R, Aromaticidade, C-alkil-di-O (anomérico), os quais estão associados aos húmicos extraídos com KOH (AH_k) (Figura 3B, D). A CP2 são explicados pelas contribuições negativas das Metoxilas e/ou C-alkil-O,N associados aos húmicos extraídos com NaOH (AH_{Na}) (Figura 3C, D). Em oposição, projeta-se positivamente na CP2, C-carboxila-H,R e C-carbonila.

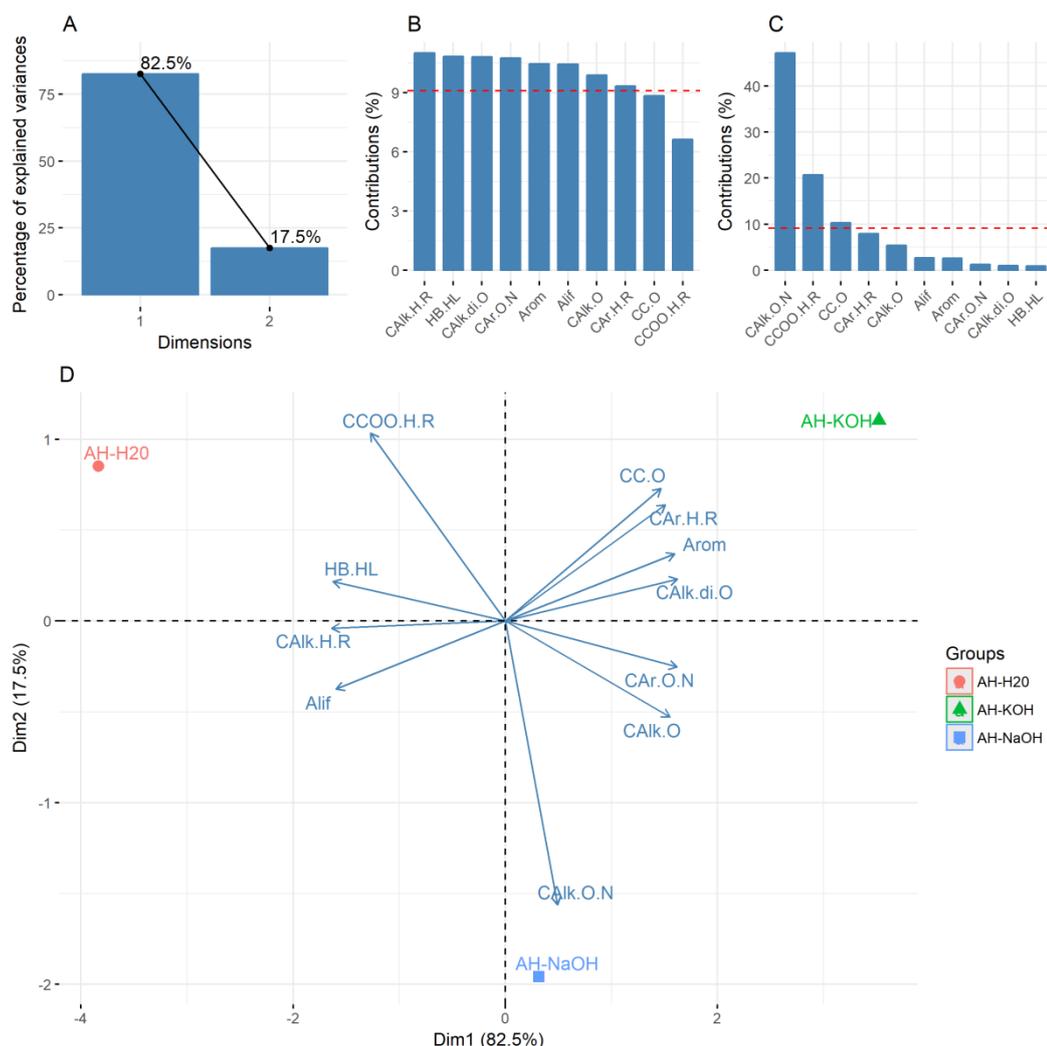


Figura 3. Análise de componentes principais para os tipos de carbono dos ácidos húmicos de vermicomposto extraídos com NaOH, KOH e água. (A) Porcentagem das variâncias retidas nas componentes principais (CP). (B) Contribuição dos carregamentos (loadings) na CP1. (C) Contribuição dos carregamentos na CP2. (E) Biplot da análise de componentes principais com os loadings e scores.

3.5.2. Análise elementar (CHN)

Na Tabela 2 são apresentados a caracterização elementar dos ácidos húmicos extraídos com água e KOH. As diferenças ocorreram somente para o teor de N nas amostras de ácidos húmicos extraídos com água e KOH, sendo maior para os extraídos com água. Entretanto, não foi possível fazer a análise elementar das amostras extraídas com NaOH, devido a pouca quantidade de material necessário para proceder a análise.

Esta análise foi importante na quantificação do N que poderia afetar os estudos posteriores de biatividades nas plantas sob diferentes níveis e fontes de nitrogênio.

3.6. CONCLUSÕES

As frações de ácido húmico isoladas de vermicomposto usando a metodologia da IHSS (AH) tanto com NaOH como KOH e o método de extração com água (AHa) apresentaram diferentes características estruturais. O AHa possui uma relação C/N mais baixa em sua composição elementar e uma quantidade relativa maior de estruturas alifáticas ($C_{Alkyl-H,R}$) observada por ^{13}C CP-MAS RMN. Em contrapartida, o AHk tem uma quantidade relativa maior de estruturas aromáticas ($C_{Ar-H,R}$; $C_{Ar-O,N}$). As frações AHa apresentaram ainda, maior quantidade de grupos carboxila ($C_{COO-H,R}$) quando comparada a fração AHk e AH_{Na} . Estas evidências sugerem que, o AHk tem propriedade mais aromática do que a fração extraída com água, que por sua vez, tem maior alifaticidade e hidrofobicidade. Por fim, a fração AH_{Na} possui mais C-alquil-O,N em sua estrutura.

4. CAPÍTULO II

A APLICAÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS DE VERMICOMPOSTO EM PLANTAS DE ARROZ MODIFICA A EXPRESSÃO GÊNICA (OSAMTS, OSNTRS E OSAS), A ABSORÇÃO E O METABOLISMO DO NITROGÊNIO

4.1. RESUMO

Os ácidos húmicos (AHs) têm um efeito importante sobre a absorção de nutrientes, o metabolismo, o crescimento e desenvolvimento das plantas. Aqui, nós avaliamos o efeito do pré-tratamento de AH aplicado numa solução nutritiva sobre a cinética de absorção de nitrato (N-NO_3^-) e amônio (NH_4^+), o metabolismo de nitrogênio (N) em plantas de arroz sob condições de alta e baixa disponibilidade de NO_3^- ou NH_4^+ . Além disso, os parâmetros cinéticos de absorção tanto de NO_3^- como NH_4^+ , metabólitos, a expressão dos genes dos transportadores de nitrato (NRTs) e amônio (AMTs), das bombas de prótons de membrana plasmática (PM) H^+ -ATPase foram examinados. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento com solução modificada de Hoagland e Arnon até 21 dias após a germinação (DAG), sendo então transferidas para uma solução sem N por 48 h, e depois, para outra solução sem N, porém, com e sem adição de AHs por mais 48 h. Após este período de privação de N, as plantas receberam novas soluções nutritivas contendo 0,2 e 2,0 mM de N-NO_3^- ou N-NH_4^+ . O tratamento das plantas de arroz com AH mais N-NO_3^- , promoveu a indução dos genes *OsNRT2.1-2.2/OsNAR2.1* e algumas isoformas PM H^+ -ATPase nas raízes. A aplicação de AHs modificou diferencialmente os parâmetros cinéticos de absorção de NO_3^- sob ambas as concentrações e para NH_4^+ na maior dose. Quando cultivadas com 0,2 mM de NO_3^- , as plantas pré-tratadas com AH apresentaram menores valores de *Km* e *Cmin*, bem como maior razão *Vmax/Km*. Quando cultivadas com 2 mM de NO_3^- , as plantas pré-tratadas com AH apresentaram maior valor de *Vmax*, maior massa radicular e de parte aérea e menor razão raiz/parte aérea. As frações nitrogenadas também foram alteradas pelo pré-tratamento com AH, e um maior acúmulo de NO_3^- e N-amino foi observado nas raízes e na parte aérea, respectivamente, das plantas pré-tratadas com AH. Os resultados sugerem que o pré-tratamento com AH modifica a morfologia radicular e a expressão gênica de transportadores de NO_3^- e das PM H^+ -ATPases, resultando em uma maior eficiência de aquisição de NO_3^- pelos sistemas de alta e baixa afinidade.

Palavras chave: Cinética de Absorção do Nitrogenio. Transportadores de N. Ácido Húmico. Bombas de Prótons. Crescimento.

4.2. ABSTRACT

Humic acids (HAs) have an important effect on nutrient uptake, metabolism, growth and development of plants. Here, we evaluated the effect of AH pretreatment applied in a nutrient solution on the absorption kinetics of nitrate (N-NO₃⁻) and ammonium (N-NH₄⁺), nitrogen (N) metabolism in rice plants under high and low availability of NO₃⁻ or NH₄⁺. In addition, the kinetic parameters for both NO₃⁻ and NH₄⁺ uptake, metabolites, expression of the nitrate (NRTs) and ammonium transporter (AMT) genes from proton pumps plasma membrane (PM) H⁺-ATPase were examined. The plants were grown in a growth chamber with modified Hoagland and Arnon solution until 21 days after germination (DAG), and they were then transferred to a solution without N for 48 hours and then to another solution without N and with and without the addition of HAs for another 48 hours. After this period of N deprivation, the plants received new nutrient solutions containing 0.2 and 2.0 mM N-NO₃⁻ or N-NH₄⁺. Treatment of rice plants with HA plus N-NO₃⁻ promoted the induction of the *OsNRT2.1-2.2/OsNAR2.1* genes and some PM H⁺-ATPase isoforms in the roots. The application of HAs differentially modified the kinetic parameters of NO₃⁻ absorption under both concentrations and for NH₄⁺ in the highest dose. When cultivated with 0.2 mM NO₃⁻, plants pretreated with HA had lower values of *Km* and *Cmin*. When cultivated with 2,0 mM NO₃⁻, the plants pre-treated with HA presented higher value of *Vmax*, greater root and shoot mass, and lower root/shoot ratio. Nitrogen fractions were also altered by pretreatment with HA, and a higher accumulation of NO₃⁻ and N-amino was observed in the roots and shoot, respectively, of the plants pretreated with HA. The results suggest that HA pretreatment modifies the root morphology and gene expression of NO₃⁻ and PM H⁺-ATPases transporters, resulting in a higher efficiency of NO₃⁻ acquisition by high and low affinity systems.

Key-words: Nitrogen Absorption Kinetics. N Transporters. Humic Acid. Pumps of Protons. Growth.

4.3. INTRODUÇÃO

Alguns pesquisadores consideram as substâncias húmicas (SHs) como macromoléculas, micelas e mais recentemente estas foram consideradas supramoléculas (STEVENSON, 1994; WERSHAW, 1993; PICCOLO, 2002). Devido a sua complexidade e diversidade ainda não foi possível uma descrição detalhada e inequívoca da base estrutural e por consequência da atividade biológica das SH (ZANDONADI et al, 2013). Considera-se, porém, a estrutura das SH como um arranjo supraestrutural de pequenas unidades bioativas estabilizadas através de forças relativamente fracas em pH baixo ou neutro, é possível que ácidos orgânicos exsudados das raízes de plantas desmontem a aparentemente complicada estrutura húmica e faça com que subunidades biologicamente ativas acessem a célula e promova incrementos tanto a biomassa quanto ao metabolismo energético vegetal (VAUGHAN & MALCOLM, 1985; VARANINI et al., 1993; PINTON et al, 1999; CANELLAS et al., 2002; ZANDONADI et al, 2006; CANELLAS et al., 2010).

Há muito tempo se sabe dos benefícios da matéria orgânica sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos. Entretanto, uma outra abordagem tenta estabelecer e explicar as interações benéficas de diferentes frações húmicas sobre o crescimento e metabolismo das plantas (VAUGHAN & MALCOLM, 1985; NARDI et al, 2002, CANELLAS et al, 2006; NARDI et al, 2009; TREVISAN et al., 2011; JANNIN et al., 2012).

Dentre as substâncias húmicas, os AH exercem efeito direto sobre o crescimento e metabolismo das plantas, especialmente sobre o desenvolvimento radicular (NARDI et al., 2002). Vários trabalhos vêm mostrando o efeito benéfico de diferentes materiais húmificados sobre o crescimento de diferentes espécies vegetais (CANELLAS et al., 2010; AGUIAR et al. 2009, ERTANI et al, 2013) do mesmo modo que alguns fitormônios (QUAGGIOTTI et al., 2004; DOBBS et al., 2010; PIZZEGHELLO et al, 2013; MUSCOLO et al, 2013). Entre os efeitos das SH ligados diretamente à nutrição de plantas e descritos em diferentes espécies, está a sua habilidade tanto para ativar a atividade da PM-ATPase das raízes (CANELLAS et al., 2002; FAÇANHA et al., 2002; CANELLAS et al., 2010) como estimular as taxas de absorção de alguns nutrientes como NO_3^- (PINTON et al, 1999; QUAGGIOTTI et al, 2004; MORA et al., 2010, ERTANI et al, 2013). Apesar de existirem muitos estudos sobre o efeito positivo de materiais húmicos na absorção de diversos nutrientes (VAUGHAN & MALCOLM, 1985; CHEN & AVIAD, 1990, VARANINI & PINTON, 1995, 2001; NARDI et al. 1996, 2002, 2009; CLAPP et al. 2001; TAN 2003; e CHEN et al. 2004a) são escassos relatos que envolvam fontes de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+) envolvendo os sistemas de absorção de baixa e alta afinidade (LATs e HATs) bem como nos mecanismos envolvidos nesse processo.

De acordo com o exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar em nível gênico e metabólico, o efeito do pre-tratamento com ácidos húmicos aplicados via radicular sobre as plantas de arroz, submetidas em seguida a condições de baixo e alto suprimento de N, determinando parâmetros cinéticos da absorção de NO_3^- e NH_4^+ e o metabolismo de nitrogênio.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Extração e caracterização dos AH de vermicomposto

O AH foi isolado e purificado de vermicomposto de acordo com a metodologia recomendada pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2014). A análise da A aromaticidade e alifaticidade foram calculadas de acordo com o procedimento detalhado em Song et al. (2008) e Capítulo I.

4.4.2. Condição experimental e de crescimento das plantas

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As plantas foram cultivadas com fotoperíodo de 14h de luz com aproximadamente $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxos de fótons fotossintéticos, umidade do ar relativa de 70% e temperaturas de $28^\circ\text{C}/24^\circ\text{C}$ (luz/escuro). Os tratamentos consistiram da combinação da aplicação ou não de ácido húmico e duas concentrações de NO_3^- e NH_4^+ (nas doses de 0,2 e 2,0 mM) abrangendo os sistemas de alta e baixa afinidade de absorção de N, (HATS e LATS, respectivamente). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 repetições.

Sementes de arroz da variedade Piauí foram inicialmente desinfetadas com hipoclorito 2% durante 15 min sob agitação orbital e em seguida lavadas dez vezes com água destilada. Depois de desinfetadas, as sementes foram colocadas para germinar na superfície da lâmina de água de um vaso, sustentadas por uma gaze. Seis dias após a germinação (DAG) as plântulas foram transferidas para potes de 0,7 L contendo solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) modificada a $\frac{1}{4}$ da força iônica (FI) com uma razão 3:1 de N-NO_3^- e N-NH_4^+ . Trocas de solução para $\frac{1}{2}$ FI foram realizadas a cada três dias. Aos 21 DAG as plantas foram submetidas para uma solução nutritiva, sem N por 96 h. Após as primeiras 48 h de privação de N, as plantas foram separadas em dois grupos com ou sem a aplicação de ácido húmico (AH) pelas 48 h restantes. Após o período de privação de N e tratamento com AH, os dois grupos de plantas foram submetidos a soluções nutritivas contendo as doses de 0,2 ou 2,0 mM de NO_3^- ou NH_4^+ (Figura 4).

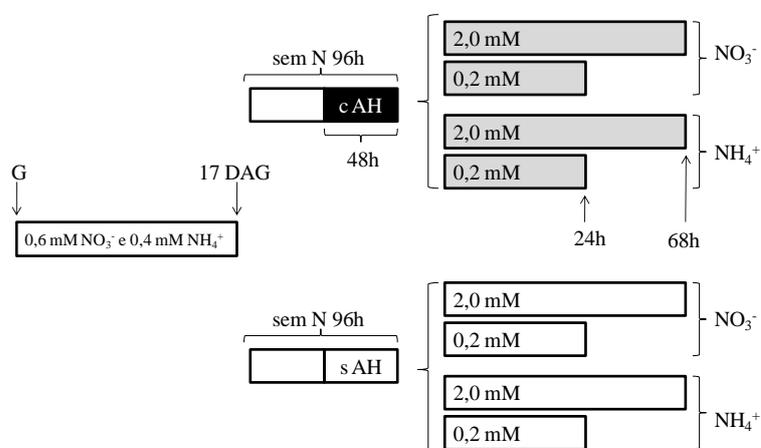


Figura 4. Representação esquemática do experimento realizado para avaliação da absorção de NO_3^- e NH_4^+ sob dois níveis (0,2 e 2,0 mM) com ou sem pré-tratamento com ácido húmico.

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos nos tratamentos com 0,2 mM de N-NO_3^- ou N-NH_4^+ , alíquotas de 1,0 mL da solução nutritiva foram coletadas a cada meia hora até 28 horas. No tratamento com 2,0 mM, alíquotas de 1,0 mL da solução nutritiva foram coletadas a cada

hora até às 12h, em seguida a cada duas horas até 24h, e finalmente coletadas a cada 4h até 56h. As amostras de solução nutritiva foram armazenadas em microtubos para posterior determinação das concentrações de N-NO₃⁻ (CATALDO et al., 1975) e N-NH₄⁺ (FELKER, 1977). Ao final dos experimentos, as raízes foram coletadas para obter-se a massa fresca e calcular os parâmetros cinéticos da absorção (V_{max} e K_M) de NO₃⁻ e NH₄⁺. Esses parâmetros foram determinados, em cada tratamento, a partir da diminuição da concentração destes íons na solução nutritiva em função do tempo, conforme método descrito por Claassen & Barber (1974). O ajuste das curvas de depleção desses nutrientes e os cálculos dos parâmetros cinéticos foram realizados empregando-se o processo gráfico matemático proposto por Ruiz (1985) e Cometti et al. (2006), com o software CINETICAWIN 1.0 (UFV). A relação entre a concentração de N (C) na solução e as taxas de absorção ou influxo líquido (I) foi representada graficamente pelo modelo de Michaelis-Menten modificado (BARBER, 1979; BRIX et al, 1994, JAMPEETONG et al, 2009):

$$I = \frac{V_{max}(C - C_{min})}{K_m + C - C_{min}}$$

Ao final das coletas de solução nutritiva as plantas foram coletadas e amostras de um grama raiz e parte aérea (folhas e bainhas) foram homogeneizadas em etanol (80%), e após partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984), a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação de N-NO₃⁻ (CATALDO et al. 1975), N-NH₄⁺ (FELKER, 1977), N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955) e açúcar solúvel (YEMM & WILLIS, 1957). Todas as medições foram quantificadas por colorimetria em placa de 96 poços utilizando um espectrofotômetro padrão (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlândia) e as leituras feitas em duplicatas para cada repetição em cada tratamento.

4.4.3. Expressão gênica das isoformas de ATPase e transportadores de N

Para o estudo da expressão dos transportadores de NO₃⁻ e NH₄⁺ bem como das isoformas de ATPases um segundo experimento foi realizado. As sementes foram germinadas apenas em água destilada. Aos cinco DAG, cinco plântulas foram transferidas para vasos de 0,3 litros, contendo solução de Hoagland (1950) modificada a 1/4 da FI e 1,5 mM de N (1,25 mM N-NO₃⁻ e 0,25 mM N-NH₄⁺). O pH foi mantido em 5,8. Trocas de solução foram realizadas a cada dois dias. Aos Treze DAG as plantas receberam solução, com ou sem adição de ácido húmico. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. As amostras de raízes foram coletadas às 6, 9, 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos e armazenadas em freezer -80 °C, para posterior extração de RNA e posterior análise da expressão gênica dos transportadores e bombas de prótons.

4.4.4. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de acordo com Gao et al. (2001) usando o tampão NTES (0.2 M Tris-HCl pH 8.0; 25 mM EDTA; 0.3 M NaCl; 2% SDS). Amostras de raízes foram primeiramente trituradas em N₂ líquido e homogeneizadas em uma mistura contendo 4,5 mL de tampão NTES e 3 mL de fenol:clorofórmio (1:1). Amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 12000 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O RNA total foi precipitado adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 2M pH 4,8 (NaOAc_{DEPC}) e 1 volume de isopropanol gelado. As amostras foram mantidas a -20°C por 2 h e centrifugadas a 12000 x g por 10min. Os Peletes foram ressuspensos em 2,5 mL de H₂O_{DEPC}

e precipitados de novo pela adição de 2,5 mL de cloreto de lítio 4M pH 4.8 (LiCl_{DEPC}). Após centrifugação a 12000 x g por 10 min, os peletes foram lavados com etanol 70% e dissolvidos em 0,1 mL de H₂O_{DEPC}.

O RNA total foi quantificado em duplicata em aparelho Thermo Scientific NanoDrop 2000c. Após a quantificação, a qualidade do RNA foi verificada em gel de agarose (1%) com brometo de etídio. Amostras de RNA total utilizadas para a síntese de cDNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Inc.) seguindo as recomendações do fabricante. A fita simples de cDNA foi sintetizada utilizando o kit High Capacity RNA to cDNA (Life Technologies) e primer oligo dT de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.5. PCR em tempo real

A análise da expressão gênica foi realizada por transcrição reversa em tempo real (RT)-PCR usando o kit Power SYBR[®] Green PCR Master Mix no sistema StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems[™]). O processo de amplificação foi realizado a 95 °C por 15 s e a 60 °C por 60 s. Os ensaios quantitativos foram realizados em duplicata para cada amostra de cDNA. Foram realizadas avaliações para determinar a expressão de sete isoformas de PM H⁺-ATPase detectada nas raízes das plântulas de arroz (SPERANDIO et al., 2011), bem como a expressão de NRTs [*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2*, *OsNAR2.1* e *OsNPF8.9* (anteriormente *OsNRT1.1*)]. O gene para o fator de alongamento 1- α (*eEF1- α*) foi usado como referência (JAIN et al., 2006) para normalizar os dados usados para calcular a expressão gênica relativa com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os primers para as PM H⁺-ATPases (*OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA4*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8*) foram os mesmos utilizados em Sperandio et al. (2011), e aqueles para os NRTs foram os mesmos utilizados em Bucher et al. (2014). Foram utilizados os “primers” desenhados por Duan et al. (2007) para os transportadores de amônio (*OsAMT1.1*; 1.2 e 1.3).

Foi realizado o teste de Lilliefors e Cochran em todos os parâmetros estudados para testar a normalidade dos erros e homocedasticidade das variâncias (NETER & WASSERMAN, 1974). Os resultados foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey utilizando-se o programa SAEG (UFV, 2000). A ordenação dos dados foi realizada pela análise de componentes principais utilizando o programa CANOCO (TER BRAAK & SMILAUER, 2002).

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1. Variações de pH na solução nutritiva

As variações de pH na solução nutritiva, quando as plantas de arroz foram supridas somente com NO_3^- ou NH_4^+ nas doses de 0,2 mM e 2,0 mM de N L^{-1} com e sem a aplicação de ácido húmico ($2,7 \text{ mg C L}^{-1}$) são mostrados na Figura 5. A absorção de NO_3^- aumentou o pH, enquanto a absorção de NH_4^+ o reduziu, principalmente em alta concentração (Figura 5).

Para as concentrações de 0,2 mM de N, a amplitude dessa variação foi menor, principalmente na solução nutritiva contendo somente NH_4^+ . O mesmo comportamento foi observado por Santos et al. (2011) em estudo avaliando os parâmetros cinéticos de absorção de NO_3^- (0,2 ou 2,0 mM). A absorção de NO_3^- ocorre em simporte com dois prótons ($\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$), promovendo a alcalinização da solução nutritiva (SANTOS et al., 2011), já a absorção de NH_4^+ é acompanhada pela extrusão de quantidade equimolar de H^+ , promovendo a acidificação da solução. Além disso, sabe-se também que variações de pH na solução nutritiva podem ser reflexos da absorção diferenciada de cátions e ânions (COMETTI et al., 2006).

Por outro lado, o tratamento prévio das plantas com AH e posterior contato das mesmas com a solução nutritiva contendo NH_4^+ , modificou ligeiramente a acidificação do meio. Em ambas as concentrações de NH_4^+ , o tratamento com AH parece tamponar o meio parcialmente e, conseqüente impedir acidificação do meio. Este comportamento também foi observado nas plantas pre-tratadas com AH e posterior contato com 2,0 mM de NO_3^- .

A influência na extrusão de prótons e conseqüentemente a acidificação do meio de cultivo dos AH em plantas tem sido relatada (LIMA, 2008; ZANDONADI et al., 2010), porém, ainda não existem estudos nas condições experimentais deste trabalho. O desenho experimental utilizado aqui, permite entender que esta ligeira modificação no valor de pH do meio de cultivo se deve ao tratamento prévio das plantas com AH e que o posterior contato das plantas com os diferentes níveis de N não é suficiente para reestabelecer o comportamento observado na extrusão de prótons em plantas tratadas somente com níveis diferentes de N.

O valor de pH medido na solução somente registra a quantidade de H^+ livres, sugere-se então que este ligeiro deslocamento no pH para uma faixa mais alcalina responde a uma condição adquirida nas plantas no tratamento prévio com os AH. Uma possível explicação para isso pode ser devido a uma possível associação entre fragmentos húmicos e as raízes das plantas (GARCÍA et al., 2012; 2014). Essas interações tem sido confirmadas tanto com biomembranas (OJWANG' & COOK, 2013) quanto com plantas (ASHLI E NEUMMAN, 2010) e a caracterização mediante ^{13}C NMR mostra que estes fragmentos são enriquecidos em estruturas oxigenadas (GARCÍA et al., 2012; 2014), como observado no espectros do CAPÍTULO 1, em que mostra um pico bastante expressivo na região em que caracteriza estruturas com presença de picos em torno de 172 ppm que assinalam para grupos carboxilas ($\text{C}(\text{COO}-\text{H},\text{R})$) (Figura 1a). Neste sentido, a extrusão de H^+ pelas raízes das plantas tanto pela ação dos AHs quanto na geração nos mecanismos de absorção de N, podem estar participando da protonação das estruturas húmicas associadas às raízes promovendo o tamponamento da solução.

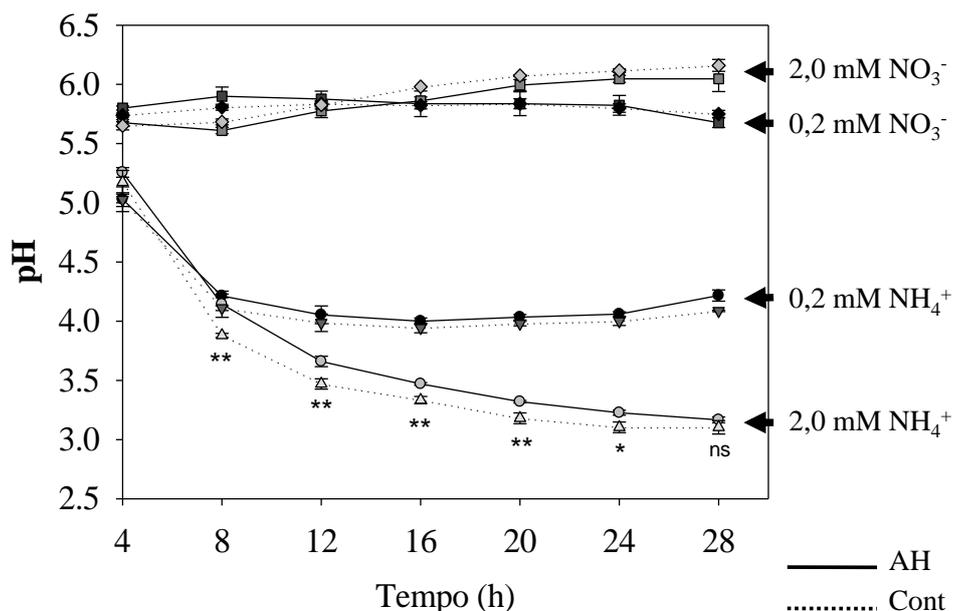


Figura 5. Curso-tempo do pH na solução nutritiva, quando as plantas de arroz foram supridas somente com NO_3^- e somente NH_4^+ numa concentração inicial de 0,2 mM e 2,0 mM de N L^{-1} . Com (AH) e sem adição (Cont) de ácido húmico de 0 às 28h do início do experimento. Teste F, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, barra = \pm erro padrão.

4.5.2. Influxo de N-NO_3^- e N-NH_4^+ (0,2 e 2,0 mM) com e sem adição de AH

Os resultados encontrados na extrusão de prótons nas plantas podem ser relacionados com o influxo das formas de N mostradas na Figura 6. O influxo de N-NH_4^+ (2,0 mM) foi estimulado pelo pré-tratamento das plantas com AH (Figura 6B), isto pressupõe uma maior extrusão de H^+ e por tanto menor valor de pH no meio quando comparado ao controle, o que não foi observado (Figura 5) e por tanto poderia reafirmar a nossa hipótese de uma possível protonação de estruturas húmicas nas raízes reduzindo uma maior acidificação quando comparado ao controle. Já o influxo de NH_4^+ (0,2 mM) se mostra maior para as plantas sem tratamento prévio com AH (Figura 6A), justificando os valores mais baixo de pH (Figura 5).

No caso do tratamento com NO_3^- (2,0 mM) (Figura 6D), foi encontrado um comportamento onde as plantas sob tratamento prévio com AH produzem um aumento do influxo de NO_3^- . Já para a o tratamento com 0,2 mM de NO_3^- , e o tratamento prévio das plantas com AH, proporcionou um aumento sobre o influxo com maior intensidade quando comparadas às plantas controle (Figura 6C). Neste caso, também não houve registros de um aumento do pH na solução, mesmo com este estímulo sobre o influxo de NO_3^- . A protonação de fragmentos húmicos aglomerados na superfície das raízes parece também ser adequada para explicar este fato.

Uma questão importante a se discutir atendendo à relação entre o estímulo no influxo de NO_3^- e NH_4^+ em plantas pré-tratadas com AH e a acidificação do meio que isto pressupõe, é o possível mecanismo pelo qual isto pode acontecer. Uma primeira explicação já foi proposta, tendo em conta a protonação de estruturas húmicas sobre as raízes, isto explicaria o registro da diminuição do valor de pH do meio, no entanto, o estímulo do influxo de N nas plantas tratadas previamente com AH pode ser o resultado do estímulo da atividade das H^+ -ATPases, como já

tem sido comprovado em outros trabalhos (VARANINI et al., 1993; ZANDONADI et al., 2007; CANELLAS et al., 2002; 2010).

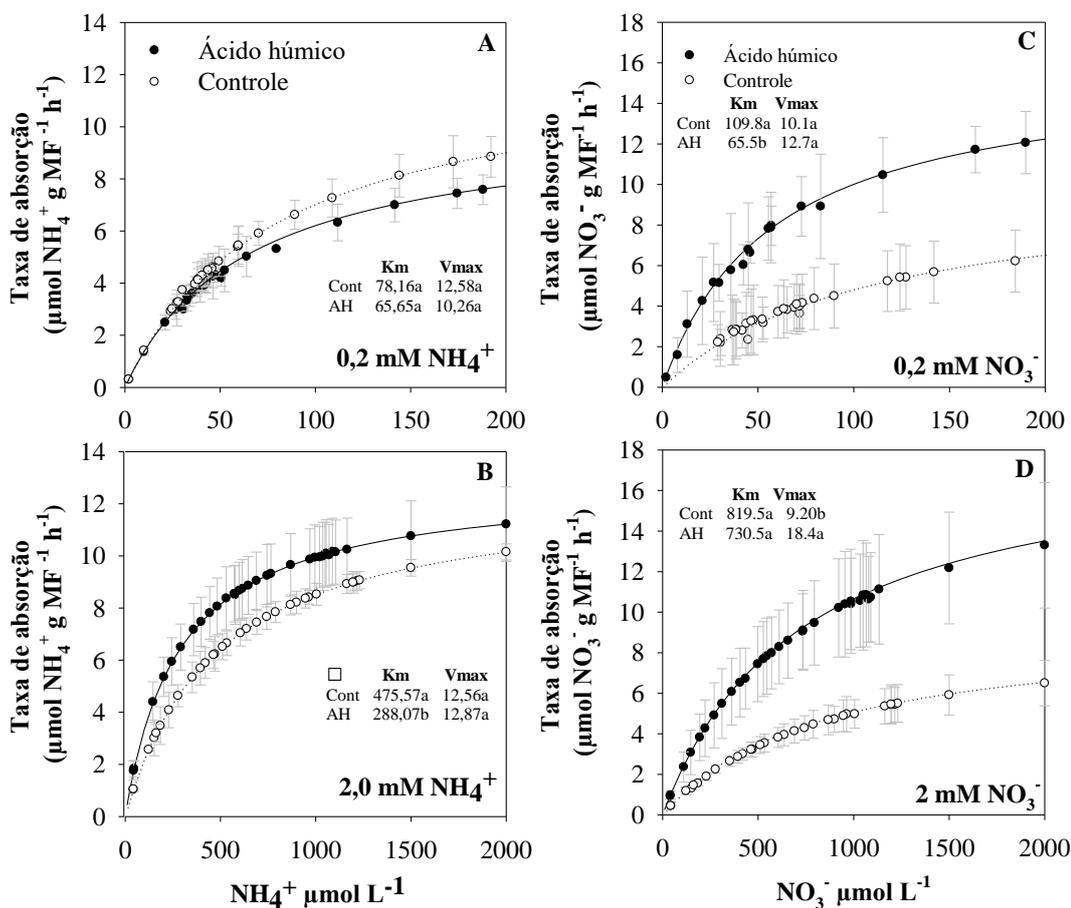


Figura 6. Taxa de absorção líquida de NH₄⁺ (A e B) e NO₃⁻ (C e D) sob dois níveis (0,2 e 2,0 mM) em plantas de arroz induzidas com pré-tratamento de privação de N, com e sem adição de ácido húmico, numa solução nutritiva. Cada ponto de um total de trinta corresponde a 3 repetições.

4.5.3. Parâmetros cinéticos aparentes da absorção de NO₃⁻ e NH₄⁺

Os parâmetros cinéticos que descrevem a absorção de N nas plantas de arroz submetidas a baixos e altos níveis de N são mostrados na Tabela 3. Em geral, o modelo de Michaelis-Menten modificada (BARBER, 1979) ajustou-se às relações e estima os parâmetros cinéticos de absorção com alta confiança estatística.

A V_{max} , parâmetro que descreve a velocidade de absorção máxima quando os sítios de ligação na raiz estão saturados (FERNANDES & SOUZA, 2006), não promoveram diferenças nas plantas tratadas previamente com AH quando comparadas às do controle para NH₄⁺ nas duas concentrações (0,2 e 2,0 mM) e 0,2 mM para NO₃⁻ (Figura 6A, B, C e Tabela 3). No entanto, para 2,0 mM de NO₃⁻, houve um maior valor de V_{max} nas plantas tratadas previamente com ácido húmico do que nas plantas controle.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos de absorção aparente: Velocidade máxima de absorção (V_{max}), concentração de N em que a absorção atinge a metade da V_{max} (K_m), concentração do íon na solução a partir da qual não se observa absorção líquida (C_{min}), da variedade de arroz Piauí, sob dois níveis de NO_3^- e NH_4^+ (0,2 e 2,0 mM), pré-tratadas com ou sem ácido húmico (AH).

		V_{max}		K_m		C_{min}	
		c AH	s AH	c AH	s AH	c AH	s AH
		---- $\mu\text{mol N g}_{\text{pf}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ----		----- $\mu\text{mol N L}^{-1}$ -----		- $\mu\text{mol N L}^{-1}$ -	
NH_4^+	0,2mM	10,26a	12,58a	65,65a	78,16a	41,7a	42,17a
	2,0mM	12,87a	12,56a	288,07b**	475,57a	-	-
NO_3^-	0,2mM	12,74a	10,12a	65,47b***	109,78a	8,55b***	64,31a
	2,0mM	18,4a*	9,20b	730,5b***	819,5a	-	-

Efeitos significativos são representados por letras diferentes a $p < 0,001$ ***; 0,05**; 0,1*.

O valor de K_m que descreve a concentração do íon na qual se atinge a metade da velocidade máxima de absorção (BARBER, 1979; COMETTI et al., 2006; FERNANDES & SOUZA, 2006; MASCHENER, 2012), mostrou menores valores para as plantas tratadas previamente com ácidos húmicos quando comparados com as plantas controle para as duas fontes de N nas duas concentrações utilizadas (Tabela 3). Estes resultados indicam que, o tratamento prévio das plantas com ácidos húmicos, aumentam a afinidade de absorção do sistema radicular pelos íons NO_3^- e NH_4^+ nos sistemas de baixa e alta afinidade de absorção. A concentração de N na solução onde não houve absorção líquida ou a concentração do íon na solução em que as taxas de influxo/efluxo tendem a zero (FERNANDES & SOUZA, 2006), C_{min} , foi significativamente afetado para NO_3^- , pelos tratamentos com AH, como mostrado pela análise da variância (Tabela 3). Em média, as plantas tratadas com e sem AH aclimatados a baixa disponibilidade de NO_3^- apresentaram um C_{min} de 8,55 e 64,31 $\mu\text{mol NO}_3^- \text{L}^{-1}$, respectivamente ($p < 0,001$). Contudo, o C_{min} das plantas tratadas com amônio não foi afetado pela indução prévia com AH.

Cacco et al., (2000) relataram que em experimentos de absorção de NO_3^- , com plântulas de trigo induzidas por frações húmicas de baixo peso molecular (LMS) aumentaram a V_{max} e reduziram o K_m em 60% quando comparado ao extrato de substância húmica sem sofrer fracionamento. Enquanto frações de alto peso molecular inibiram fortemente a taxa de absorção. Neste trabalho as plântulas de arroz após pré-tratamento por 48 com AH e submetidas em seguida a 2,0 mM de nitrato, apresentaram incremento da V_{max} , e reduziram bastante o K_m , confirmando o aumento da afinidade pelo NO_3^- . Quaggiotti et al. (2004) encontraram para plântulas de milho pré-tratadas com LMS por 48h e transferidas para 1,5 mM de NO_3^- , maior influxo (70%) que nas plantas controle. Esse efeito foi atribuído a um aumento na atividade dos transportadores ou no aumento do gradiente de potencial eletroquímico, como verificado em plântulas de milho expostas a NO_3^- e ácidos húmicos extraídos com água promovendo maior atividade da PM H^+ -ATPase, levando ao aumento da força próton motriz para absorção de NO_3^- (PINTON et al., 1999; QUAGGIOTTI et al., 2004). Neste trabalho, já foi enunciada a possibilidade de um aumento na atividade das H^+ -ATPase, produzido pelo pre tratamento das plantas com AH, isto condicionaria as plantas a uma absorção mais eficiente do N o que se reafirma através dos valores nos parâmetros cinéticos estudados e a maior expressão relativa das isoformas de PM H^+ -ATPases.

4.5.4. Quantificação das formas de N nos órgãos das plantas arroz

Em relação ao metabolismo das plantas de arroz da variedade Piauí, pré-tratadas com AH a 0,2 mM de NH_4^+ , foram observadas diferenças significativas na raiz entre os tratamentos com ou sem AH. Entretanto, os valores são muito baixos para caracterizar qualquer efeito biológico (Figura 7A). Porém, as plantas submetidas a 2,0 mM de NH_4^+ , acumularam significativamente mais NH_4^+ na raiz, no tratamento sem adição de AH (Figura 7B). Não havendo diferenças na parte aérea (Figura 7C e D). As plantas na solução contendo 0,2 e 2,0 mM de NO_3^- , não apresentaram diferenças significativas para o teor de NH_4^+ nas raízes e na parte aérea (Figura 7A e B).

Plantas sob 0,2 e 2,0 mM NO_3^- , apresentaram maior concentração de NO_3^- quando pre-tratadas com AH (Figura 7A e B), fruto do maior influxo de NO_3^- nesse órgão. Estes resultados estão de acordo com os parâmetros cinéticos e influxo encontrados para NO_3^- (Tabela 2, Figura 6).

Não houve diferenças entre os tratamentos no acúmulo de NO_3^- na parte aérea (Figura 7G e H), devido ao maior acúmulo e metabolismo de NO_3^- na raiz. Resultado divergente foi observado por Quaggiotti et al. (2004) em que, plântulas tratadas com substâncias húmicas de baixo peso molecular mostraram 50% mais NO_3^- nas folhas de milho quando comparadas as plantas controle.

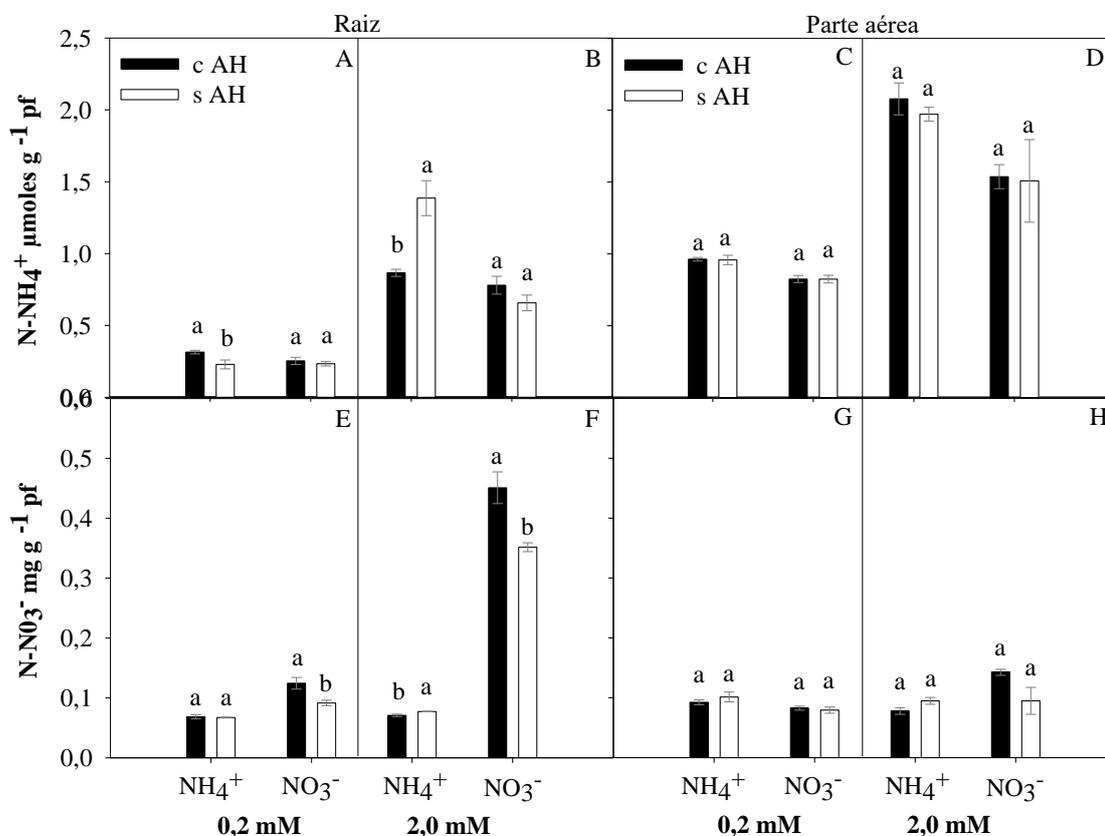


Figura 7. Concentrações de N-NH₄⁺ na raiz (A, B) e parte aérea (C, D). N-NO₃⁻ na raiz (E, F) e parte aérea (G, H) da variedade de arroz Piauí, sob dois níveis de nitrato ou amônio (0,2 e 2,0 mM), com e sem ácido húmico (AH), numa solução nutritiva.

De modo geral, nas doses de 0,2 e 2,0 mM de NO_3^- e NH_4^+ com ou sem AH, as plantas não apresentaram diferenças para N-amino livre nas raízes (Figura 8A, B). Contudo, houve um

pequeno aumento nos teores de N-amino na parte aérea no tratamento com 0, 2 mM de NH_4^+ sem AH (Figura 8C), em decorrência do menor teor de NH_4^+ encontrado na raiz (Figura 7A) no tratamento controle. O NO_3^- absorvido é preferencialmente reduzido e assimilado na parte aérea, enquanto o NH_4^+ é responsável por causar toxidez, devendo ser rapidamente assimilado em esqueletos de carbono e transportado na forma de aminoácidos, principalmente para a parte aérea (JAMPEETONG & BRIX, 2009). Diante disso, observou-se um maior teor de N-amino na parte aérea em todos os tratamentos analisados.

Com respeito ao teor de açúcares solúveis, nas plantas sob 0,2 e 2,0 mM de nitrato, apresentaram diferenças no teor de açúcares nas raízes, sendo menor com adição de ácido húmico sob 0,2 mM (Figura 8E) e maior com 2,0 mM (Figura 8F). As plantas sob 2,0 mM de nitrato ou amônio mostraram altos teores de açúcares solúveis na parte aérea. Contudo, apresentaram maior concentração de açúcare, somente quando foram tratadas com 2,0 mM de amônio sem AH (Figura 8H). Segundo Santos et al., (2009, 2011) os níveis de N-amino livre e açúcares solúveis na parte aérea após o período de privação de N na solução nutritiva são altos na variedade Piaui, indicando que essas plantas têm grande controle sobre a remobilização do NO_3^- estocado quando em deficiência de N.

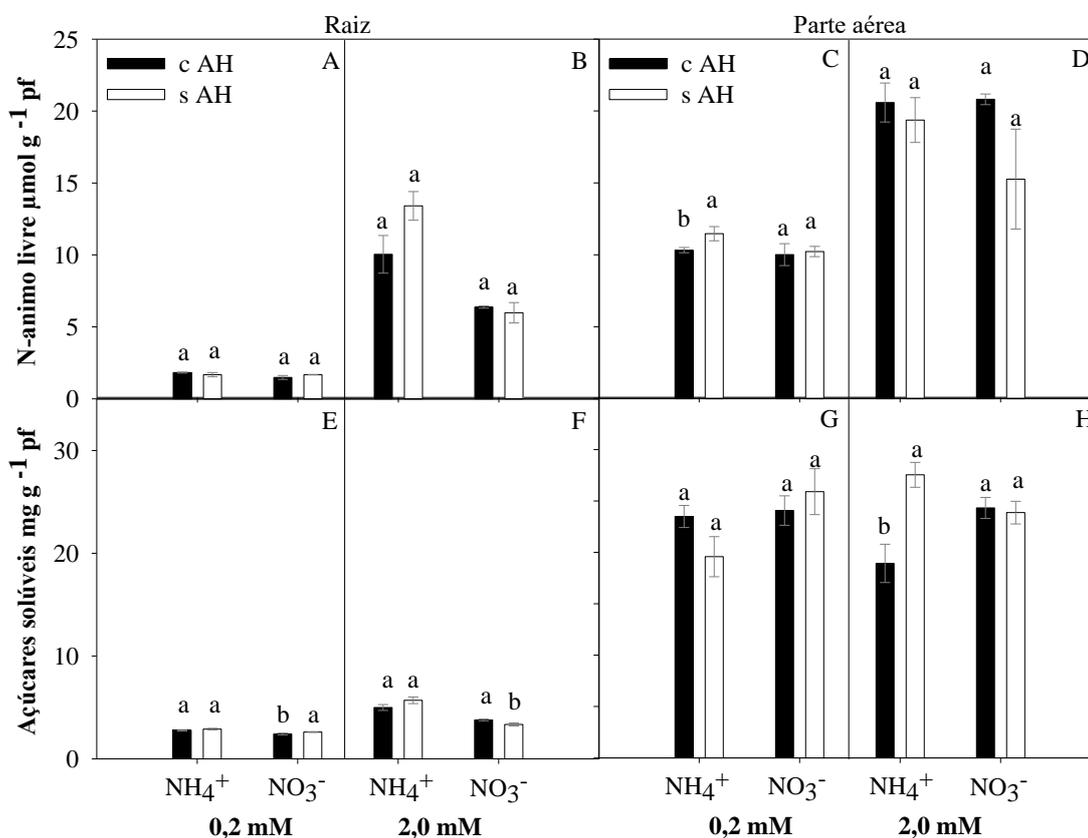


Figura 8. Concentrações de N-amino na raiz (A, B) e parte aérea (C, D). Açúcar solúvel na raiz (E, F) e parte aérea (G, H), da variedade de arroz Piaui, sob dois níveis de nitrato e amônio (0,2 e 2,0 mM), com e sem pre-tratamento com ácido húmico (AH), numa solução nutritiva.

As plantas produziram uma intensa quantidade de massa fresca de raiz e parte aérea em 48h (Figura 9B e D), quando foram pre-tratadas com AH e submetidas posteriormente a 2,0 mM de NO_3^- . Por outro lado, produziram menor massa fresca de raiz e parte aérea quando pré-tratadas com AH e posteriormente conduzidas na solução contendo 0,2 mM de NO_3^- (Figura 9A e C). Entretanto, a massa fresca tanto de raiz como parte aérea sob 0,2 mM de NH_4^+ não

apresentou diferença significativa entre AH e controle (Figura 9A e C). Contudo, quando pré-tratadas com AH e conduzidas posteriormente com 2,0 mM de NH_4^+ as plantas mostraram menor massa fresca de raiz e parte aérea (Figura 9B e D), evidenciando uma possível toxidez por NH_4^+ .

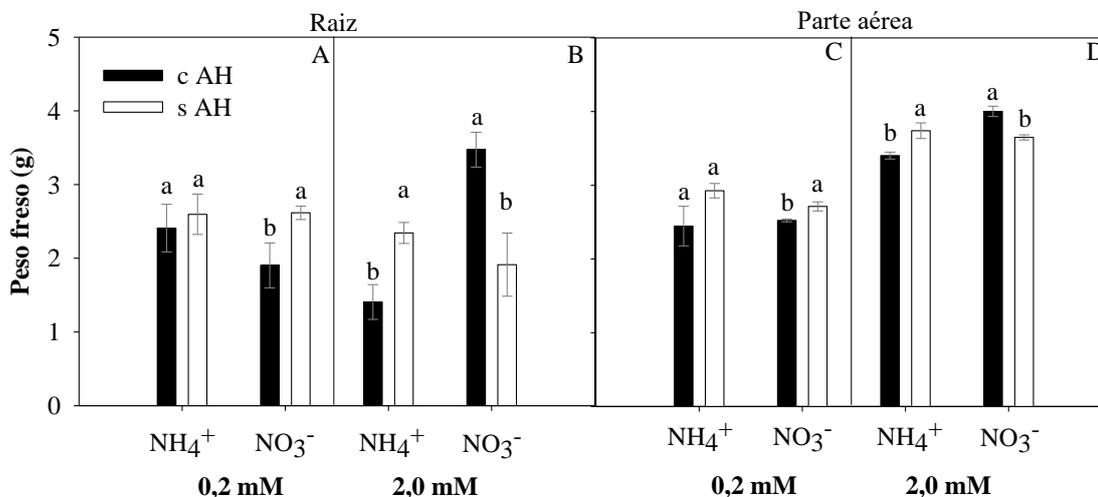


Figura 9. Massa fresca de raiz (A, B) e parte aérea (C, D) da variedade de arroz Piauí, sob dois níveis de NO_3^- e NH_4^+ (0,2 e 2,0 mM), pré-tratadas com ou sem ácido húmico (AH).

A análise de componentes principais baseada na biomassa e nas frações solúveis sob 2,0 mM de NO_3^- e NH_4^+ com e sem AH, explicou 72,1 % da variabilidade total nas duas primeiras componentes (Figura 10), sendo que 50,1 % da variância estão explicados pela CP1 estando positivamente ligado, aos carregamentos da massa fresca da raiz e parte aérea (PA), e ao NO_3^- da raiz e PA os quais estão associados aos *scores* dos tratamentos com 2,0 mM de NO_3^- . Em oposição, projetam-se negativamente na CP1 os teores de NH_4^+ da raiz e PA, bem como N-amino livre e açúcares solúveis da raiz no tratamento com 2,0 mM de NH_4^+ . Essa primeira componente principal sintetiza o efeito preponderante das condições da planta sob os diferentes tratamentos. A CP2 apresenta 22,0 % da variância, separando os grupos de acordo com ou sem a aplicação de AH (símbolos cheios e vazios, respectivamente). Sendo explicada, pelas contribuições positivas do N-amino livre da parte aérea, e a contribuições negativas do peso fresco da parte aérea.

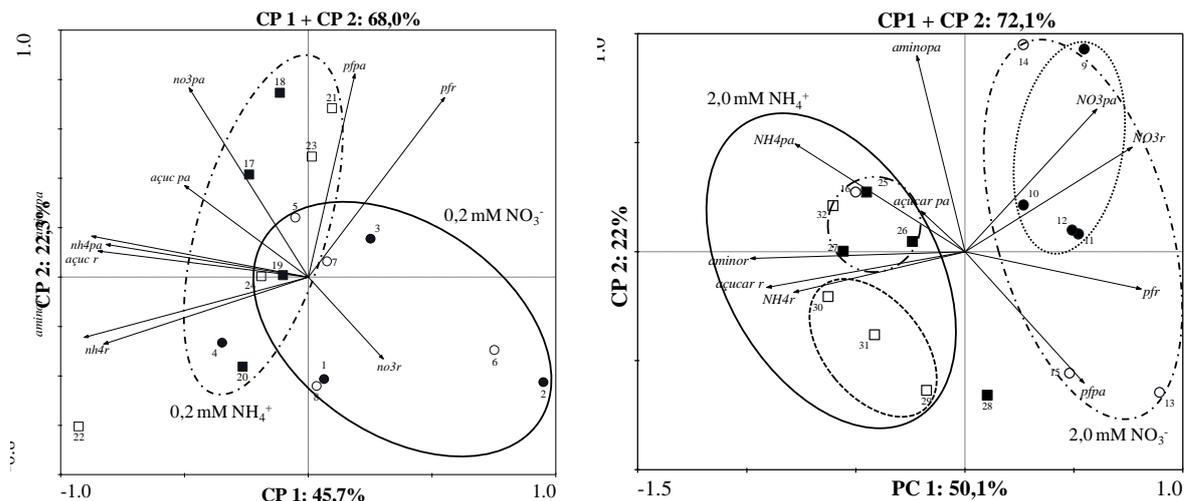


Figura 10. Análise de Componentes principais para frações solúveis e peso fresco da raiz e parte aérea da variedade de arroz Piauí, sob 0,2 (a) e 2,0 (b) mM de nitrato com (●) sem (○) ácido húmico e amônio com (■) e sem (□) adição de ácido húmico numa solução nutritiva.

A análise de componentes principais baseada na biomassa e nos metabolitos das plantas de arroz sob 0,2 mM de NO₃⁻ e NH₄⁺, explicou 68% da variabilidade total nas duas primeiras componentes (Figura 10), sendo que 45,7% da variância estão explicados pela CP1 estando positivamente ligado, à massa fresca da raiz e NO₃⁻ da raiz os quais estão associados ao tratamento com 0,2 mM de NO₃⁻. Em oposição, projetam-se negativamente na CP1 os teores de NH₄⁺ da raiz e PA, bem como N-amino livre e açúcar solúvel da raiz e PA no tratamento com 0,2 mM de NH₄⁺. A CP2 apresenta 22,3 % da variância. Sendo explicada, pelas contribuições positivas da massa fresca da parte aérea e NO₃⁻ da PA, e a contribuições negativas do NO₃⁻ da raiz. Por outro lado, os AH não promoveram efeitos sobre o metabolismo das plantas nas concentrações de 0,2mM tanto de NH₄⁺ como NO₃⁻, que os separassem do tratamento controle.

4.5.5. Expressão gênica de transportadores de NO₃⁻ e NH₄⁺ e das bombas de prótons

A absorção de nutrientes pelas plantas é um processo coordenado pela ação de proteínas transportadoras e PM-H⁺-ATPases. Os níveis de expressão relativa dos genes *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*, foram significativamente maiores a partir das 24, 48 e 72h nas plantas tratadas com AH, em relação as plantas sem AH (Figura 11). Foi relatado que numa condição de ressurgimento de 2,0 mM de NO₃⁻, foram encontrados aumentos de expressão de 20 e 15 vezes para os genes *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*, respectivamente (SPERANDIO et al. 2011). Neste trabalho, os níveis de expressão relativa dos genes *OsNAR2.2* e *OsNRT1.1* também foram maiores quando tratadas com AH especialmente às 24 e 48h. Esses resultados corroboram os resultados para biomassa e metabolitos nitrogenados, em que o crescimento e acúmulos significativamente maiores de NO₃⁻ e N-amino foram observados nas plantas tratadas com AH quando cultivadas com a dose mais elevada de NO₃⁻.

A expressão relativa dos genes *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*, mostraram uma repressão quando tratadas com AH em relação às plantas controle (Figura 11). Sabe-se que o *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* respondem positivamente ao ressurgimento com doses crescentes de NH₄⁺ (RANATHUNGE et al., 2014; SONODA et al., 2003), no entanto o efeito do pré-tratamento com AH na indução ou repressão desses genes ainda não é bem conhecido. O

OsAMT1.3 pode ter sua expressão aumentada em deficiência de N e reprimido em concentrações acima de 0,15 mM (GAUR et al., 2012). Em adição, pôde-se observar uma repressão inicial até às 24 h nas plantas tratadas com AH.

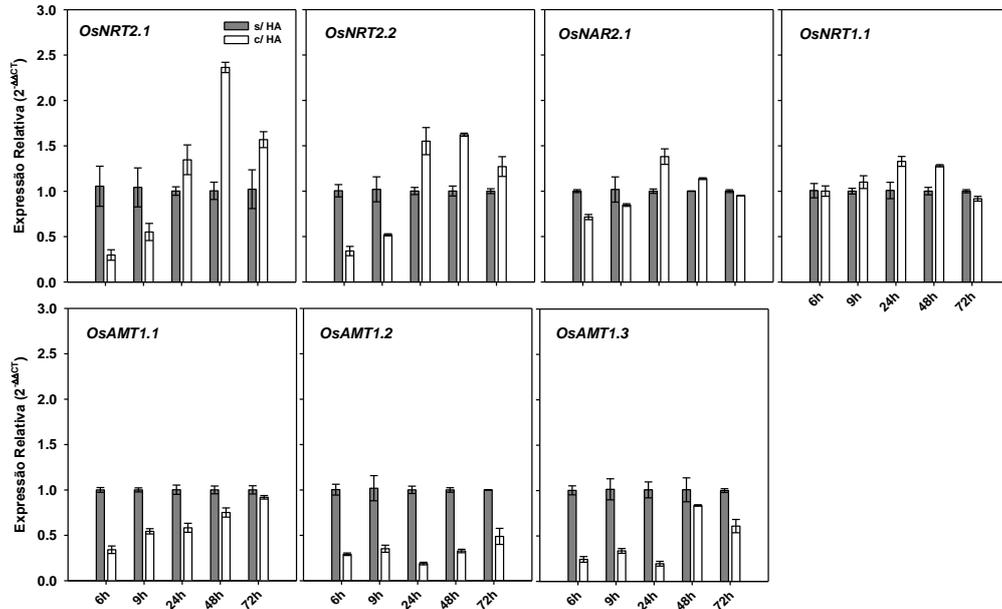


Figura 11. Expressão relativa dos transportadores de NO₃⁻ de baixa (*OsNRT1.1*) e alta afinidade (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*), e transportadores de NH₄⁺ de alta afinidade (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) em raízes de arroz da variedade Piaui, pré-tratadas com ou sem ácido húmico (AH), seguidas de ressurgimento com de NO₃⁻ e NH₄⁺, às 6, 9, 24, 48 e 72 h.

A expressão relativa das sete isoformas das PM H⁺-ATPases das raízes de arroz *OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA4*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* foram preferencialmente induzidas as 24h quando houve pré-tratamento com AH (Figura 12). Sendo que a *OsA2* e *OsA3* foram induzidas cerca de duas vezes, e as *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* induzidas cerca de três vezes e finalmente a isoforma *OsA4*, induzida cerca de dez vezes em relação ao controle (Figura 12).

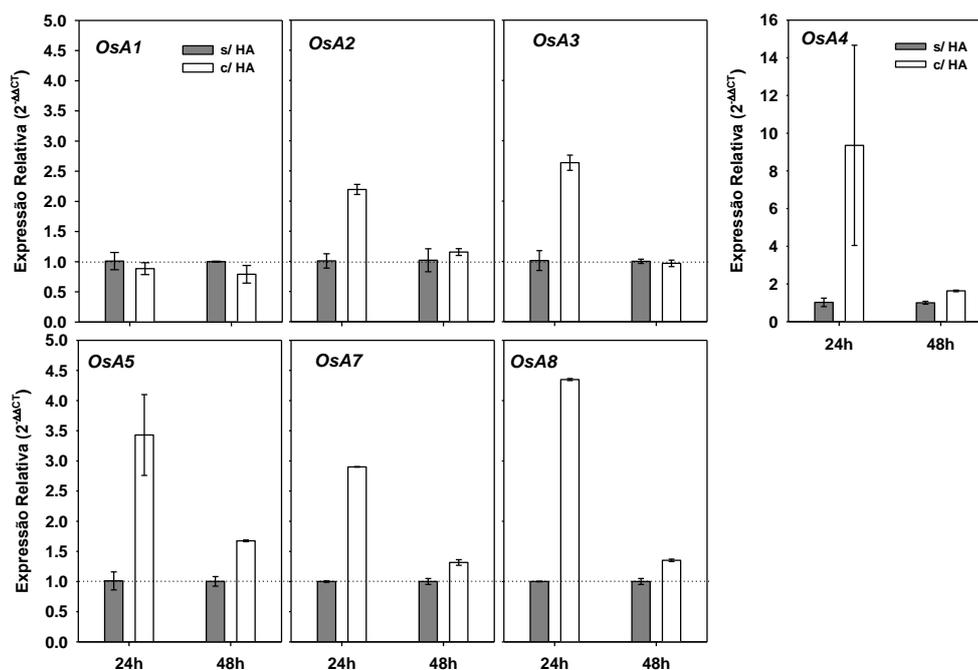


Figura 12. Expressão relativa das isoformas de PM H⁺-ATPases às 24 e 48h, nas raízes de arroz da variedade Piaui, pré-tratadas com ou sem ácido húmico (AH), seguidas de ressurgimento com NO₃⁻ e NH₄⁺.

A absorção de NO₃⁻ e NH₄⁺ envolve dois grupos de transportadores que co-ocorrem na membrana plasmática das células da raiz e agem de forma coordenada para absorver o NO₃⁻ e NH₄⁺ em uma faixa ampla de concentração (TSAY et al., 2007; SOUZA & FERNANDES, 2006). De acordo com suas propriedades cinéticas e respostas a NO₃⁻ e NH₄⁺, e produtos de assimilação de N, esses transportadores podem ser classificados em dois grupos, HATS ou LATS, e podem ser constitutivos ou induzidos por NO₃⁻ ou (OKAMOTO et al., 2003; SOUZA & FERNANDES, 2006).

Para a análise da expressão de NRT e PM H⁺-ATPase, as plantas foram submetidas a um suprimento constante de N na solução nutritiva, evitando assim o forte efeito indutor da reposição com N sobre a expressão dos NRTs, sobre a expressão dos AMTs o que pode mascarar o efeito dos AHs. Após 48 h de exposição ao AHs, os níveis de expressão dos genes *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* foram aproximadamente três vezes maiores que os do controle (Figura 11). O que não ocorre para os AMTs, apresentando sintomas de toxidez por NH₄⁺.

Em estudos de Fernandes (1983), plantas de arroz submetidas à baixa intensidade de luz e alta temperatura apresentaram menor peso de massa fresca quando tratadas com NH₄⁺, causando maior estresse no crescimento da planta, este efeito foi verificado nas plantas pré tratadas com AH e submetidas a solução nutritiva com 2,0 mM de NH₄⁺. Como uma consequência do maior influxo de NH₄⁺, observado na Figura 6 e 10. Entretanto, quando sob NO₃⁻, a massa fresca foi maior, sendo uma condição favorável ao crescimento. Foi demonstrado ainda que plantas de arroz, sob condições de estresse leva ao acúmulo de N-NH₄⁺ nos tecidos e apresenta correlação positiva com N-amino livre (FERNANDES, 1990). Devido ao fato da assimilação de NH₄⁺ ocorrer inicialmente nas raízes e requerer grandes quantidades de carboidratos. As plantas sob nutrição amoniacal mostram redução na taxa de crescimento das raízes (SILVA et al., 1987; SOUZA & FERNANDES, 2006)

Sob condições de excesso de N, o NO₃⁻ pode ser absorvido e acumulado nos vacúolos (como pool de reserva) e mais tarde metabolizado pela planta em crescimento (FERNANDES,

1990; FERNANDES, 1991; SANTOS et al, 2005; SOUZA & FERNANDES, 2006). Plantas de arroz podem acumular grandes quantidades de NO_3^- , no pool de reserva enquanto mantêm o pool de N-amino livre sob controle, mantendo o metabolismo normal de N sob condições normais (FERNANDES, 1983, 1995).

No arroz, os NRTs de alta afinidade *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* e a proteína acessória *OsNAR2.1* são considerados proteínas-chave para o uso eficiente de N (ARAKI & HASEGAWA, 2006). Embora possa haver forte regulação transcricional desses genes, o que foi demonstrado para o *AtNRT2.1* em Arabidopsis (LAUGIER et al., 2012), há também relatos de uma correlação positiva entre a absorção de NO_3^- e o aumento de transcritos de *NRT2.1* em Arabidopsis e arroz (OKAMOTO et al., 2003; ARAKI & HASEGAWA, 2006; BUCHER et al., 2014).

Assim, os resultados sugerem que a maior taxa de absorção líquida de NO_3^- em plantas pré-tratadas com AH poderia ter sido causada, pelo menos em parte, pela maior expressão dos transportadores *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* (Figura 11). Em Arabidopsis, o bloqueio da expressão dos genes *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2* resultou em uma forte redução de V_{max} e um aumento no valor de K_m em plantas mutantes após o ressuprimento com 1 mM NO_3^- (LI et al., 2007).

Esses autores também mostraram que os mutantes *Atnrt2.1-Nrt2.2* tiveram uma forte redução do influxo de NO_3^- pelo sistema constitutivo de alta afinidade (cHATS). Em comparação com os parâmetros cinéticos de absorção de NO_3^- (SANTOS et al., 2011), variedades de arroz com maior V_{max} e menor K_m sob condições de baixa oferta de NO_3^- também apresentaram maiores níveis de expressão dos NTRs de alta afinidade *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* (BUCHER et al., 2014).

Mesmo sob alta suprimento de NO_3^- , os transportadores de alta afinidade também podem ser ativos para a absorção de NO_3^- (LE DEUNFF & MALAGOLI, 2014), indicando que este grupo de transportadores contribui significativamente para a aquisição de NO_3^- pelas plantas em uma ampla faixa de concentração. Embora os métodos pelos quais os AHs causam alterações na expressão de NTRs permaneçam incertos, outros autores também relataram esse efeito em diferentes culturas (QUAGIOTTI et al., 2004; JANNIN et al., 2012).

A absorção de NO_3^- ocorre contra um potencial de gradiente eletroquímico; assim, é um transportador ativo secundário que é energizado por uma força próton motriz, e o mecanismo de ação é um simporte com dois H^+ ($\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$) no interior da célula. No entanto, ocorre uma relação próxima entre o bombeamento de H^+ e o transporte de NO_3^- . Os PM H^+ -ATPases são bombas eletrogênicas que hidrolisam o ATP para gerar movimento vetorial de prótons na direção do apoplasto.

O bombeamento de H^+ por H^+ -ATPases resulta em um gradiente de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) que gera uma força próton-motriz (Δp) e energiza a absorção de ânions como NO_3^- da solução nutritiva para as raízes. As PM H^+ -ATPases são consideradas enzimas chave na geração de um potencial de membrana (gradiente elétrico, negativo no interior da célula) e um gradiente de prótons transmembrana (ácido no lado de fora) resultando em uma força próton-motriz que governa o influxo e efluxo de íons e metabólitos através da membrana plasmática (SONDERGAARD et al. 2004; DUBY & BOUTRY, 2009; PALMGREN et al., 2011).

No arroz, existem dez isoformas de PM H^+ -ATPase (BAXTER et al., 2003), das quais a expressão de sete, são detectadas em raízes (SPERANDIO et al., 2011). Verificamos que, após 24 h de exposição aos AHs, as isoformas *OsA2*, *OsA3*, *OsA4*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* foram induzidas (Figura 12). Muitas destas isoformas também são induzidas pela reposição com NO_3^- nas raízes e parte aérea, especialmente as isoformas *OsA2* e *OsA7* (SPERANDIO et al., 2011), que mostraram uma forte correlação positiva com a expressão dos NRTs *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* e a proteína *OsNAR2.1* (SPERANDIO et al., 2014).

Assim, a maior taxa de absorção líquida de NO_3^- observada nas plantas pré-tratadas com AHs (Figura 6 e Tabela 3) provavelmente reflete a ação conjunta de maiores quantidades de

NTRs e PM H⁺-ATPases. Ambos os efeitos podem aumentar a aquisição de nutrientes, primeiro através do aumento da exploração do solo, e o segundo, acelerando a absorção de nutrientes (ROSE et al., 2014). Outros estudos também mostraram o efeito estimulante de SH e AHs na expressão e atividade de bombas de H⁺ (SANTI et al., 2003; QUAGGIOTTI et al., 2004; AGUIRRE et al., 2009).

No experimento de cinética, após o resuprimento com 2,0 mM de NO₃⁻, as plantas pré-tratadas com AHs apresentaram um aumento na *Vmax* para absorção de NO₃⁻ e crescimento da raiz e parte aérea (Tabela 3 e Figura 9), o que indicou um aumento na capacidade de absorção de NO₃⁻ e assimilação de N. Após o resuprimento com 0,2 mM de NO₃⁻, foram observados resultados distintos daqueles encontrados com 2,0 mM de NO₃⁻. No tratamento com 0,2 mM, não observamos uma forte alteração na *Vmax*, embora tenha sido observada uma redução acentuada nos valores de *Km* (Tabela 3). Estes resultados mostram que as aplicações de AHs proporcionam benefícios distintos à taxa de absorção líquida de NO₃⁻ nos dois sistemas de absorção desse nutriente, com aumentos pronunciados na taxa de absorção líquida em altas doses (LATS) e uma afinidade aumentada para NO₃⁻ em doses baixas (HATS).

A alteração da *Vmax* só é possível quando o número de sítios de transporte é modificado na membrana plasmática para permitir o transporte de nutrientes (MARSCHNER, 2012), enquanto a alteração de *Km* só é possível com a participação diferencial de transportadores contribuindo para a absorção global de alta afinidade de NO₃⁻. Os transportadores de NO₃⁻ de alta afinidade de plantas são encontrados principalmente na família de transportadores *NRT2* (GOJON, 2013).

Além disso, existem componentes adicionais que podem contribuir para a absorção global de alta afinidade do NO₃⁻ sob condições específicas, especialmente a *NRT1.1*, que possui uma dupla afinidade para o transportador de NO₃⁻ (LIU & TSAI, 2003; LI et al., 2007; GOJON, 2013). Esses transportadores têm propriedades cinéticas diferentes (LIU et al., 1999; LIN et al., 2000; OKAMOTO et al., 2006) e podem ser expressos diferencialmente entre os tratamentos.

As plantas tratadas com AHs apresentaram diferentes níveis de expressão para os principais *NRTs* com alta afinidade quando comparados com as do controle. Estas respostas positivas sobre a taxa de captação líquida de NO₃⁻ poderiam ter sido causadas pelo aumento da atividade da *NRT*, especialmente aquelas com alta afinidade, e a atividade da PM H⁺-ATPase. Em outro estudo utilizando plantas de arroz Piauí, o tratamento com AHs extraído de uma fonte semelhante à utilizada neste estudo resultou em um aumento pronunciado na atividade hidrolítica de PM H⁺-ATPases e bombeamento de prótons (ZANDONADI et al., 2007).

Além disso, tem sido relatado que a atividade hidrolítica e o bombeamento de H⁺ aumentam nas vesículas plasmáticas de plântulas de milho tratadas com AHs de várias fontes (ZANDONADI et al., 2007). Avaliamos alguns metabólitos nitrogenados e obtivemos resultados que corroboram os do ensaio cinético de NO₃⁻. Especificamente, observou-se maior acúmulo de NO₃⁻ nas raízes e maior concentração de N-amino na parte aérea das plantas tratadas com AH (Figura 7 e 8), o que corrobora os valores mais elevados de biomassa de raízes e parte aérea observados em plantas pré-plantadas com AHs (Figura 9).

Apesar dos benefícios dos AHs para a cinética de absorção de NO₃⁻ em doses baixas (Tabela 3), as quantidades de N absorvidas podem não ter sido suficientes para alterar significativamente os metabólitos N avaliados (Figura 7 e 8).

A principal prática agrônômica realizada para aumentar a absorção de nutrientes pelas plantas é aplicar fertilizantes com grandes concentrações de nutrientes. Entretanto, o uso de SHs, incluindo os elicitores de PM H⁺-ATPases, também pode ser usado porque aumentam a negatividade do potencial de membrana, o que favorece a absorção de cátions, e aumentam o gradiente de H⁺ ($\Delta\mu\text{H}^+$), o que favorece a absorção de ânions. O uso de SHs também leva a um melhor crescimento das raízes, como mostrado nas Figuras 9 e 10, que podem melhorar a absorção de nutrientes de baixa mobilidade, como P e Zn, em solos tropicais.

Nossos resultados sugerem que os AHs aumentam a V_{max} e reduzem os valores de K_m e C_{min} para NO_3^- , o que ocorre, pelo menos parcialmente, por meio da indução de transportadores de alta afinidade e diferentes isoformas de H^+ -ATPases na membrana plasmática.

4.6. CONCLUSÕES

O tratamento das plantas com AH promove a absorção de N tanto na forma N-NO₃⁻ quanto N-NH₄⁺.

A indução prévia das plantas, com ácido húmico de vermicomposto em solução nutritiva, promove uma maior absorção líquida de nitrato em plantas de arroz variedade piau, no sistema de baixa afinidade de transporte, melhorando a eficiência de absorção de nitrato e produção de biomassa.

O suprimento de alta dose amônio, após a indução prévia das plantas com ácido húmico, proporciona maior absorção do amônio, sendo prejudicial às plantas de arroz, causando diminuição na produção de massa fresca.

As plantas de arroz têm preferência por amônio, quando submetidas a condições de baixa disponibilidade de N, após a indução prévia das plantas com ácido húmico.

A aplicação de AH aumenta a expressão dos transportadores de alta afinidade para NO₃⁻ (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* e a proteína *OsNAR2.1*) e diferentes isoformas de H⁺-ATPase na membrana plasmática (*OsA2*, *OsA3*, *OsA4*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8*) melhorando a performance da planta em condições de baixo suprimento de N e reprimi a expressão dos transportadores para NH₄⁺ (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*).

5. CAPÍTULO III

OS ÁCIDOS HÚMICOS MODIFICAM A MORFOLOGIA DA RAIZ DE PLÂNTULAS DE ARROZ

5.1. RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar as mudanças dos parâmetros morfológicos do sistema radicular em respostas a aplicação de ácido húmico (AH) extraído com água (AHa) e KOH (AHk), provenientes de vermicomposto sobre as raízes das plântulas de arroz na ausência de nutrientes. O estudo foi realizado em câmara de crescimento no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os tratamentos consistiram da aplicação de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk) em doses crescentes: 0, 20, 40, 60, 80, 110, 150 mg AH L⁻¹, com meio mínimo de CaSO₄ a ¼ de força iônica. Depois três plântulas foram coletadas, às 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h e armazenadas em álcool 50% a -20°C. Foi analisado o sistema radicular das plântulas de arroz no *software* WinRhizo. As diferentes características de raízes mensuradas foram: comprimento total, área total de superfície, volume total e número total de pontas, número de ramificações e diâmetro médio das raízes, bem como dentro das classes de diâmetro (raízes superfínas, finas e grossas). As análises foram realizadas através da regressão e técnicas multivariada verificando a adequabilidade desses modelos, através do pacote do *software* R. O padrão de estímulos das doses crescentes do ácido húmico sobre a morfologia das raízes das plântulas de arroz var. Piauí, em sua maioria foi do tipo de resposta linear reta para AHa e quadrático para AHk, apresentando alta significância estatística (p<0,0001). Portanto os ácidos húmicos modificam a morfologia da raiz (comprimento, área, volume e número de pontas da raiz) das plantas de arroz. Foram utilizadas várias técnicas de análise multivariada e de análise quantitativo de crescimento que possibilitaram identificar o tratamento com 150 mg AH L⁻¹ extraído com água e 80 mg AH L⁻¹ extraído com KOH a promover maiores estímulos sobre o crescimento, taxas de crescimento absoluto e relativo da morfologia radicular das plântulas de arroz.

Palavras chave: WinRHIZO. AH. Morfologia radicular. Regressão. TCA.

5.2. ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the changes in root system morphological parameters in response to humic acid (HA) extracted with water (HAa) and KOH (HAk) from vermicompost application on rice seedlings roots in the absence of nutrients. The study was carried out in a growth chamber in the Department of Soils of the Federal Rural University of Rio de Janeiro. The treatments consisted of humic acid extracted with water (HAa) and KOH (HAk) application in increasing doses: 0, 20, 40, 60, 80, 110, 150 mg HA L⁻¹, with CaSO₄ minimum medium at ¼ of ionic strength. Then three seedlings were collected at 24h, 48h, 72h, 96h, 120h and 144h, and stored in 50% alcohol at -20 °C. The root system of rice seedlings was analyzed in WinRhizo software. The different root characteristics measured were: total length, total surface area, total volume and total number of roots, number of branches and average root diameter, as well as within diameter classes (superfine, fine and thick roots). The analyzes were carried out through the regression and multivariate techniques verifying the suitability of these models through the R software package. The stimulus pattern of increasing humic acid doses on the root morphology of the rice seedlings var. Piaui, for the most part, was a straight linear response type for AHa and quadratic for HAk, presenting high statistical significance (p<0.0001). Therefore the humic acids modify the root morphology (length, area, volume and number of root tips) of the rice plants. Several techniques of multivariate analysis and quantitative growth analysis were used to identify the treatment with 150 mg HA L⁻¹ extracted with water and 80 mg HA L⁻¹ extracted with KOH to promote greater stimuli on growth, absolute growth rates and relative growth rates on root morphology of rice seedlings.

Key words: WinRHIZO. Humic Acid. Root Morphology. Regression. AGR.

5.3. INTRODUÇÃO

As raízes são os órgãos das plantas que estão envolvidas na absorção e assimilação de nutrientes, aquisição de água, síntese de hormônios vegetais, ácidos orgânicos e aminoácidos, e ancoragem das plantas e são o local de interação com os organismos na rizosfera (DEN HERDER et al., 2010). A morfologia e a fisiologia da raiz estão intimamente associadas ao crescimento, desenvolvimento e produtividade da planta, especialmente sob condições adversas (SERRAJ et al., 2004; LYNCH, 2007).

A morfologia radicular refere-se às características intrínsecas externas do sistema, sendo fundamental também na identificação e classificação das espécies. Em geral é morfologicamente que se pode visualizar as principais alterações no sistema devido a efeitos bióticos e/ou abióticos (MCCULLY, 1999). Essas alterações são devidas às características de elasticidade e plasticidade intrínseca dessa parte do vegetal (ZONTA et al., 2006). A maioria das plantas ramifica suas raízes a partir do eixo principal em eixos laterais de ordens superiores. Essas diferentes ordens de raízes podem variar suas características, com relação à espessura, taxa de crescimento, capacidade de crescimento secundário, duração, estruturas e adaptações (ZONTA et al., 2006). Essas variações por sua vez, vão influenciar a capacidade de obtenção de água, nutrientes, sobrevivência a condições adversas e a possibilidade de servir de habitat para microrganismos da rizosfera (ZONTA et al., 2006).

A capacidade de adaptação do sistema radicular, através de mudanças morfológicas e fisiológicas às condições do meio ambiente é dada pela plasticidade fenotípica (LÓPEZ-BUCIO et al., 2002), sendo que as plantas que apresentam maior plasticidade são mais competitivas (FAN et al., 2003).

As raízes de *Poaëca* (gramíneas), proliferadas em regiões mais férteis do substrato, são finas e apresentam aumento de diversas características, tais como comprimento específico, número de raízes laterais de primeira e segunda ordem, comprimento do eixo radicular principal e comprimento médio da raiz principal em relação ao comprimento do eixo principal (LARIGAUDERIE & RICHARDS, 1994).

Um sistema radicular eficiente é aquele que otimiza a relação entre quantidade de recursos adquiridos e empregados para sua obtenção, e, a arquitetura do sistema radicular é fundamental para a aquisição de recursos no solo (MILLER et al., 1999). Sua definição é muito complexa, por envolver vários aspectos, como taxa de crescimento, ramificação, orientação e longevidade dos diferentes tipos de raiz (BONSER et al., 1996).

Entre as modificações induzidas pela SH nas plantas tratadas, as mudanças em tamanho e desenvolvimento foram os primeiros parâmetros a serem estudados analiticamente (TREVISAN et al; 2010). Sob condições particulares, SH pode estimular o crescimento da planta em termos de aumento do comprimento da planta, massa seca e fresca (BLANCHET, 1958, GUMINSKI, 1968). Esses efeitos parecem depender da concentração (ELGALA et al, 1978), da fonte da SH (HERNANDO et al, 1977), da solução de extração dos AH, da idade e espécie da planta (BLANCHET, 1958, GUMINSKI, 1968), bem como das condições de cultivo do experimento (TREVISAN et al; 2010).

Muitos estudos tem relatado a capacidade das substancias humicas (SH) obtidas de diversas origens modificar o crescimento, morfologia e arquitetura radicular (PINTON et al., 1999; CANELLAS et al., 2002, 2009; DOBBSS et al., 2007, 2010; SCHMIDT et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007, 2013; TREVISAN et al., 2010). Como o crescimento da raiz primária de plântulas de milho (*Zea mays*) Canellas et al, 2002; melão (*Cucumis melo* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), cebola (*Allium cepa* L.) Van de Venter et al.(1991) pepino (*Cucumis sativus* L.) Pinton et al., (1999), trevo e manjerição transgênicos (Lima, 2008) canola (jannin, 2012), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) (Schmidt et al., 2007; Canellas et al., 2010).

Embora tenha sido feito um grande número de estudos sobre o crescimento e desenvolvimento radicular de gramíneas (HOCHHOLDINGER & TUBEROSA, 2009; IYER-PASCUZZI et al., 2010; PACHECOVILLALOBOS & HARDTKE, 2012), e existirem vários estudos sobre a bioatividade dos AH sobre as raízes de culturas agrícolas e plantas modelos, o conhecimento da relação dos estímulos sobre a morfologia radicular das plantas de arroz tratadas com as frações humificadas da matéria orgânica ao longo do tempo ainda é relativamente limitado. Nesse sentido, pretendeu-se monitorar possíveis mudanças na morfologia da raiz induzida por substâncias húmicas, crescidas em meio mínimo contendo concentrações crescentes de AH extraídos com água e KOH. Por meio de regressão, de técnicas multivariadas e análise quantitativa do crescimento. Para quantificar a dissimilaridade e reconhecer o padrão de similaridade entre as doses de ácido húmico sobre a morfologia e as taxas e crescimento das raízes das plântulas de arroz var. Piauí.

5.4. MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1. Experimento dose-resposta com ácido húmico

O estudo foi realizado em câmara de crescimento no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As sementes de arroz (var. Piauí) foram inicialmente desinfestadas em hipoclorito 2% durante 30 min sob agitação orbital e em seguida lavadas dez vezes com água destilada. Seis dias após a germinação (DAG) as plântulas foram transferidas para potes de 250 ml no experimento com AH extraído com água (AHa) e para potes de 700 ml no experimento com AH extraído com KOH (AHk) (Figura 13). As plantas foram expostas às 14h/10h (luz/escuro) de fotoperíodo com $480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxo de fóton fotossintético, umidade do ar relativa de 70% e temperaturas de 28°C/24°C (dia/noite).

Os tratamentos consistiram da aplicação de ácido húmico (AH) extraído com água e KOH em doses crescentes: 0, 20, 40, 60, 80, 110, 150 mg AH L⁻¹ juntamente com meio mínimo de CaSO₄ a ¼ de FI e pH 5,5. Depois três plântulas de um total de 21, foram coletadas a cada 24h, ou seja, às 48h, 72h, 96h, 120h e 144h e armazenadas em álcool 50% em tubos falcon de 50ml e armazenadas a -20°C, para análises posteriores.

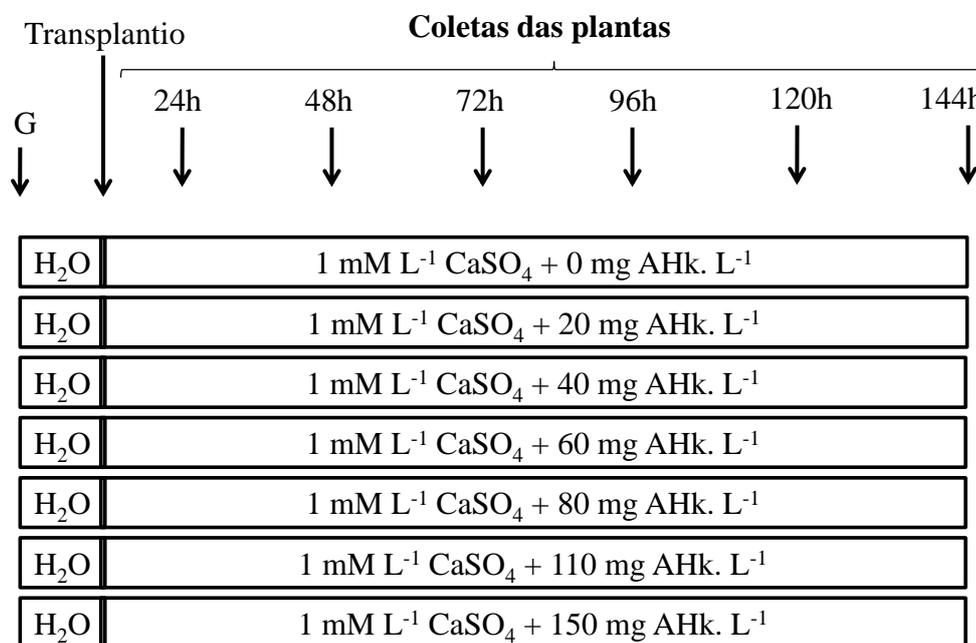


Figura 13. Esquema do experimento dose-resposta para AH extraído com água (AHa) e KOH (AHk) em plântulas de arroz com 1mM de CaSO₄.

Para análise do crescimento vegetal, foi feito um terceiro experimento com as doses de maior indução sendo 150 mg AHa L⁻¹ de ácido húmico extraído com água (AH a) e 80 mg AHk L⁻¹ de ácido húmico extraído com hidróxido de potássio (AHk) bem como o controle. As sementes de arroz (var. Piauí) foram desinfestadas em hipoclorito 2% durante 30 min sob agitação orbital e em seguida lavadas dez vezes com água destilada. Seis dias após a germinação (DAG) as plântulas foram transferidas para potes de 700 ml. Posteriormente submetidas aos tratamentos e coletadas às 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 264 horas após indução (HAI) esquematizado na Figura 14.

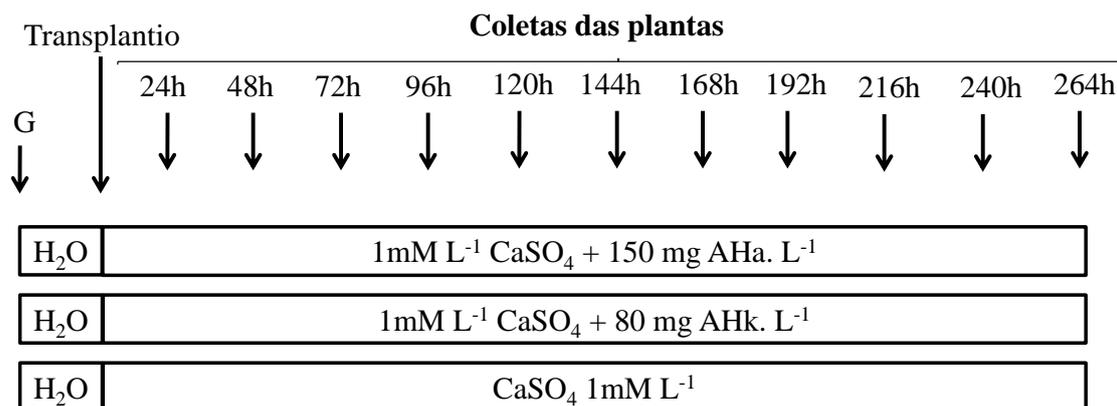


Figura 14. Esquema do experimento para análise do crescimento das plântulas de arroz crescidas em solução com 1mM de CaSO₄ e com AH extraído com água (AHa) e KOH (AHk).

Um sistema de raiz de uma plântula de arroz, foi uniformemente distribuído em uma camada de água em uma bandeja transparente de acrílico 30 cm (20 cm) e a digitalização da plântula com uma resolução de 600 dpi (pontos por polegada) com um sistema de digitalização *Epson Expression 10000XL* com uma unidade de luz adicional (TPU), pois segundo (HIMMELBAUE et al, 2004), o uso do scanner com uma fonte de luz adicional acima promoveu maior resolução de digitalização, melhorou notavelmente a qualidade da imagem e dos resultados do programa. Imagens das raízes foram convertidas para um formato em tons de cinza de oito bits. Individualmente trabalhada, analisadas e quantificadas um total de 18 diferentes características das raízes: comprimento (mm plant⁻¹), área projetada (mm² plant⁻¹), área de superfície (mm² plant⁻¹), diâmetro médio (mm.10plant⁻¹), volume (mm³ plant⁻¹), número de pontas (n° plant⁻¹), número de bifurcações de raiz (n° plant⁻¹). Também foram definidos e medidos Comprimento, área de superfície, volume e número de pontas dentro das classes de raízes superfino (0,5 < d < 1,5 milímetros), fino (1,5 < d < 3,5 milímetros) e grossas (d > 3,5 milímetros), usando o software *WinRhizo Arabidopsis, 2012b* (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.). Foi adotado o método não estatístico Regent para realizar medições da morfologia radicular em *WinRhizo* (ARSENAULT et al., 1995; Régent Instruments, 2012). Os limites das imagens foram definidos e então importados para o software *WinRHIZO* para análise de caracteres de raiz e quantificação. As imagens foram analisadas usando um grid de calibração como uma escala de referência e alterou-se as configurações de entrada para raízes pálidas em um fundo preto (BOUMA et al, 2000; SOUSA et al, 2012; Régent Instruments, 2012). Em seguida os dados foram analisados através do *XLRhizo* (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.). Esses macros adicionam análise e comandos gráficos de raiz aos comandos padrão do Excel (*Microsoft Corp.*) para análise de arquivos de dados produzido pelo *WinRhizo*.

A divergência entre culturas pode ser avaliada a partir de características agrônômicas, morfológicas, moleculares, dentre outras. As informações múltiplas de cada cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade existente no conjunto de acessos estudados (CRUZ & CARNEIRO, 2006). Dentre os vários métodos de estudo, foi utilizado medidas de dissimilaridade obtidas a partir de variáveis quantitativas.

As medidas de dissimilaridade mais frequentemente utilizada quando da falta de repetições é a Distância Euclidiana e suas variantes. Entretanto, existem críticas a esse método por não levar em consideração as variâncias e covariâncias residuais das características mensuradas (CRUZ & CARNEIRO, 2006). Contudo, a distância de Mahalanobis, permite analisar os dados provenientes de ensaios experimentais por meio de uma matriz de dispersão residual (ψ) e as médias das características. Para o cálculo das Distancias de Mahalanobis utilizam-se as médias originais e as estimativas das variâncias e covariâncias residuais entre os

caracteres estudados. Nesse sentido foi realizado uma Análise de Variância Multivariada (MANOVA) (Tabela 4). Após esta análise que permite obter as estimativas das covariâncias residuais, obtêm-se a matriz de dispersão. No cálculo da estimativa das distâncias generalizadas de Mahalanobis (Tabela 5), são obtidas a partir dos valores médios e da matriz de dispersão ψ . Exige porem, a pressuposição de normalidade multidimensional e homogeneidade da matriz de covariâncias das unidades amostrais (CRUZ & CARNEIRO, 2006). No entanto, segundo Cruz & Carneiro (2006) foi demonstrado considerável robustez para a violação dessas hipóteses, fazendo da distância generalizada de Mahalanobis (D^2) instrumento útil, além da vantagem de proporcionar maior analogia entre as técnicas multivariadas e outras técnicas de agrupamento.

Após a verificação do grau de semelhança ou de diferença entre genótipos, é necessário reconhecer os grupos homogêneos, fazendo-se necessário o uso de métodos de agrupamento ou de projeções de distancias (otimização ou hierárquicos) em gráficos bidimensionais, em que cada coordenada seja obtida a partir da medida de dissimilaridade. Não se conhece em principio, o número de grupos a serem estabelecidos. Dessa forma os diferentes métodos de agrupamento proporcionam diferente resultados. Neste estudo foram adotados os métodos hierárquicos, onde os tratamentos foram agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido o dendrograma. Não havendo preocupação com o número ótimo de grupos. Dentre eles foram testados o *método do vizinho mais próximo (s)*, *método do vizinho mais distante (c)*, *método UPGMA (a)* e *método de Ward (W)*. Uma vez com a formação do dendrograma, pode ocorrer considerável simplificação das informações originais e podem ser geradas algumas distorções sobre o padrão de dissimilaridade entre os tratamentos estudados, sendo necessário avaliar a adequação dos resultados. Nesse sentido, foi realizado o teste de consistência do padrão de agrupamento pelos métodos hierárquicos por meio do coeficiente de correlação cofenético (CCC), onde, quanto maior o valor de CCC, menor será a distorção provocada ao agrupar os tratamentos (CRUZ & CARNEIRO, 2006). Foi testado ainda, o coeficiente de correlação de Mantel (r_M), o qual é equivalente algebricamente à correlação de Pearson para avaliar o número ótimo de agrupamentos, cada valor de r_M foi testado por 1000 permutações (LEGENDRE & LEGENDRE, 2004; BOCARD et al, 2011).

Para análise do crescimento vegetal os ajustes foram efetuados em função de comprimento total, Área de raiz total, volume total de raiz e número total de ramificações, os dados originais foram ajustados por meio de regressão, derivando-se as taxas de crescimento, obtendo-se estimativas de valores instantâneos das taxas (ARAUJO & ROSSIELLO, 2013). Assim, dentre os vários modelos propostos por Hunt (1978, 1982), optou-se por trabalhar com o modelo de Richards a partir de processos iterativos. A seleção do modelo foi baseada na significância dos coeficientes, o valor do coeficiente de determinação (R^2) conjuntamente com a tendência global de variação temporal da variável mensurada. A função de Richards para comprimento radicular, por exemplo, a taxa de crescimento absoluto (TCA) e a taxa de crescimento relativo (TCR), foram calculados para comprimento e demais parâmetros segundo as expressões:

$$C = a(1 \pm e^{(b-cT)})^{-1/d} \quad (\text{mm}) \quad (\text{eq. 1})$$

$$TCA = \frac{ace^{b-cT}}{d} \cdot (1 \pm e^{b-cT})^{-(1/d+1)} \quad (\text{mm.dia}^{-1}) \quad (\text{eq. 2})$$

$$TCR = \frac{ce^{b-cT}}{d(1 \pm e^{b-cT})} \quad (\text{mm.mm}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}) \quad (\text{eq. 3})$$

A taxa de crescimento absoluto (TCA) exprime a velocidade de produção de biomassa por unidade de tempo. A taxa de crescimento relativo (TCR) exprime a velocidade de produção de biomassa por unidade de material preexistente (HUNT, 1981).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete doses de AH, 5-6 épocas de coleta e 8-12 repetições. As análises de regressão, análises de variância multivariada (MANOVA), a distância de mahalanobis, a construção dos dendrogramas, obtenção do coeficiente de correlação cofenético e teste de mantel foram feitos através do Programa R, versão 1.7.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), utilizando-se os pacotes *cluster* (MAECHLER et al., 2011), *vegan* (OKSANEN et al., 2011), *ade4* (DRAY & DUFOUR, 2007) e *permute* (SIMPSON, 2011). A ordenação dos dados foi realizada pela análise de componentes principais através do programa R utilizando-se o pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2011).

5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1. Efeito dose-resposta dos ácidos húmicos sobre os parâmetros radiculares

Para verificar a importância das 18 variáveis quantitativas de morfologia de raiz foi feita uma estatística descritiva, com os valores máximos, mínimos e médios, desvio padrão e variância (Tabela S1). Os distintos parâmetros morfológicos de raiz, comprimento total (C), Área de superfície total da raiz (AS), volume total de raiz (V), número total de pontas (P), número total de bifurcações (B), das plântulas de arroz da variedade tradicional Piauí, que receberam o tratamento crescente de ácido húmico extraído com água, curiosamente se ajustaram ao modelo de regressão linear para cada momento de coleta, 48, 72, 96, 120 e 144h (Figura 15). Embora o comportamento normalmente seja quadrático quando as plantas recebem aplicação de substâncias húmicas (DOBBSS et al., 2007; AGUIAR et al., 2009; BUSATO et al., 2010; BALDOTO et al., 2011, CANELLAS et al., 2011; GARCIA et al., 2012).

O comprimento total da raiz e comprimento nas diferentes classes de diâmetro (superfinas, finas e grossas), foram estimulados desde as 48 até as 144h de avaliação (Figura 15 a, b, c, d). Apresentaram maior estímulo a medida que as doses de AHa aumentaram em todos os tempos. Um modelo de regressão de primeira ordem produziu um ajuste satisfatório. Contudo, observa-se que os efeitos já apresentam dose-resposta às 48 h após aplicação e são mais marcantes a partir das 96h até às 144h.

Em relação a área superficial total da raiz, de raízes superfinas, finas e grossas, todas foram estimuladas desde as 48h até as 144h de avaliação (Figura 15 e, f, g, h) e um modelo de primeira ordem produziu um ajuste satisfatório dos dados experimentais. Sendo que área superficial total da raiz e as classes de raízes também apresentaram um comportamento linear para o AHa. Sendo observado um maior estímulo a partir de 150 mg AHa L⁻¹ em todos os tempos. Contudo, dentre as classes, as raízes grossas contribuíram substancialmente para o parâmetro área total superficial da raiz.

Em relação ao volume total da raiz, de raízes superfinas, finas e grossas, todas foram estimuladas desde as 48h até as 144h de avaliação (Figura 15 i, j, k, l) e um modelo de primeira ordem, também produziu um ajuste satisfatório aos dados experimentais. Sendo observado um maior estímulo a partir de 150 mg AHa L⁻¹ em todos os tempos. Contudo, dentre as classes, as raízes grossas contribuíram substancialmente para o parâmetro volume total da raiz.

Em relação ao número total de pontas da raiz, de raízes superfinas, finas e grossas, todas foram estimuladas desde às 48h até às 144h de avaliação (Figura 15 m, n, o, p) e um modelo de primeira ordem, também produziu um ajuste satisfatório aos dados experimentais. Sendo observado um maior estímulo a partir de 150 mg AHa L⁻¹ em todos os tempos. Contudo, dentre as classes, as raízes superfinas contribuíram substancialmente para o parâmetro número total de pontas da raiz.

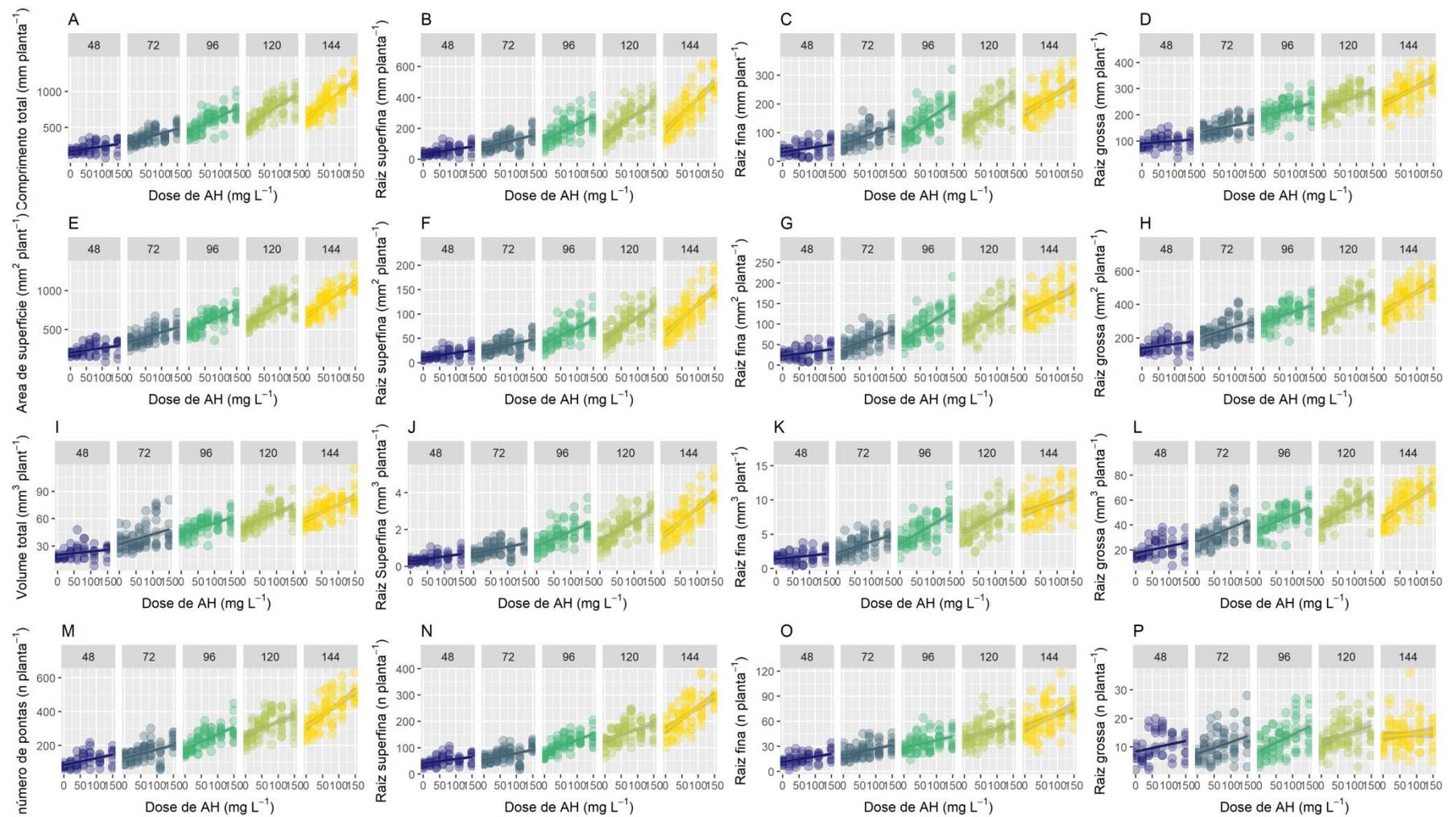


Figura 15. Gráfico de dispersão e curva estimada pelo modelo de regressão linear com as bandas de confiança para as variáveis comprimento total de raiz, área de superfície total, volume total e número total de pontas de raiz, e dentro das classes de raízes superfinas, finas e grossas, das plântulas de arroz em função das doses de ácido húmico extraído com água (AHa). Mensuradas em intervalos de 48 até 144h após aplicação.

Entretanto, as plantas que receberam o tratamento de ácido húmico extraído com KOH, apresentaram ajustes para o modelo polinomial de segunda ordem (Figura 16) para cada coleta como comumente encontrado na literatura (DOBBSS et al., 2007; AGUIAR et al., 2009; BUSATO et al, 2010; BALDOTO et al, 2011, CANELLAS et al., 2011; GARCIA et al., 2012). Considerando a duração da indução com ácido húmico, todas as características foram significativamente diferentes ao longo do tempo.

O comprimento total da raiz e de raízes superfinas, finas e grossas, foram estimulados desde as 24 até as 144h de avaliação (Figura 16 a, b, c, d). Apresentaram maior estímulo a medida que as doses de AH aumentaram em todos os tempos. Um modelo polinomial de segunda ordem produziu um ajuste satisfatório. Contudo, observa-se que os efeitos já apresentam dose-resposta às 24 h após aplicação e são mais marcantes à partir das 96h até às 144h. Além disso, o comprimento dentro das classes de raízes superfinas e grossas foram as principais classes que contribuíram para o comprimento total de raiz.

Em relação a área superficial total da raiz, de raízes superfinas, finas e grossas, todas foram estimuladas desde as 28h até as 144h de avaliação (Figura 16 e, f, g, h) e um modelo polinomial de segunda ordem produziu um ajuste satisfatório dos dados experimentais. Sendo observado um maior estímulo a partir de 80 mg AHk L⁻¹ em todos os tempos. Entretanto a classe fina de raízes não apresenta um ajuste claro para o AHk. Contudo, dentre as classes, as raízes grossas contribuíram substancialmente para o parâmetro área total superficial da raiz. Em relação ao volume total da raiz, de raízes superfinas, finas e grossas, todas foram estimuladas desde as 28h até as 144h de avaliação (Figura 16 i, j, k, l) e um modelo polinomial de segunda ordem produziu um ajuste satisfatório dos dados experimentais. Sendo observado um maior estímulo a partir de 80 mg AHk L⁻¹ em todos os tempos. Contudo, dentre as classes, as raízes grossas contribuíram substancialmente para o parâmetro volume total da raiz. Em relação ao número total de pontas da raiz, de raízes superfinas, finas e grossas, todas foram estimuladas desde às 24h até às 144h de avaliação (Figura 16 m, n, o, p) e um modelo polinomial de segunda ordem produziu um ajuste satisfatório dos dados experimentais. Sendo observado um maior estímulo a partir de 80 mg AHk L⁻¹ em todos os tempos. Contudo, dentre as classes, as raízes superfinas contribuíram substancialmente para o parâmetro número total de pontas da raiz.

As diferenças ao longo do tempo de indução foram detectadas logo após as 48h para as plantas tratadas com AH extraído com água e 24h após a transferência das plântulas para solução com AH extraídas com KOH (Figura 15, 16, 18 e 19). Isso indica que podemos diferenciar os tratamentos logo após aplicação. Embora, as 96h parece estar mais marcante a indução como ocorre em milho em que as raízes seminais estavam sob estresse de P (SOUZA et al., 2012).

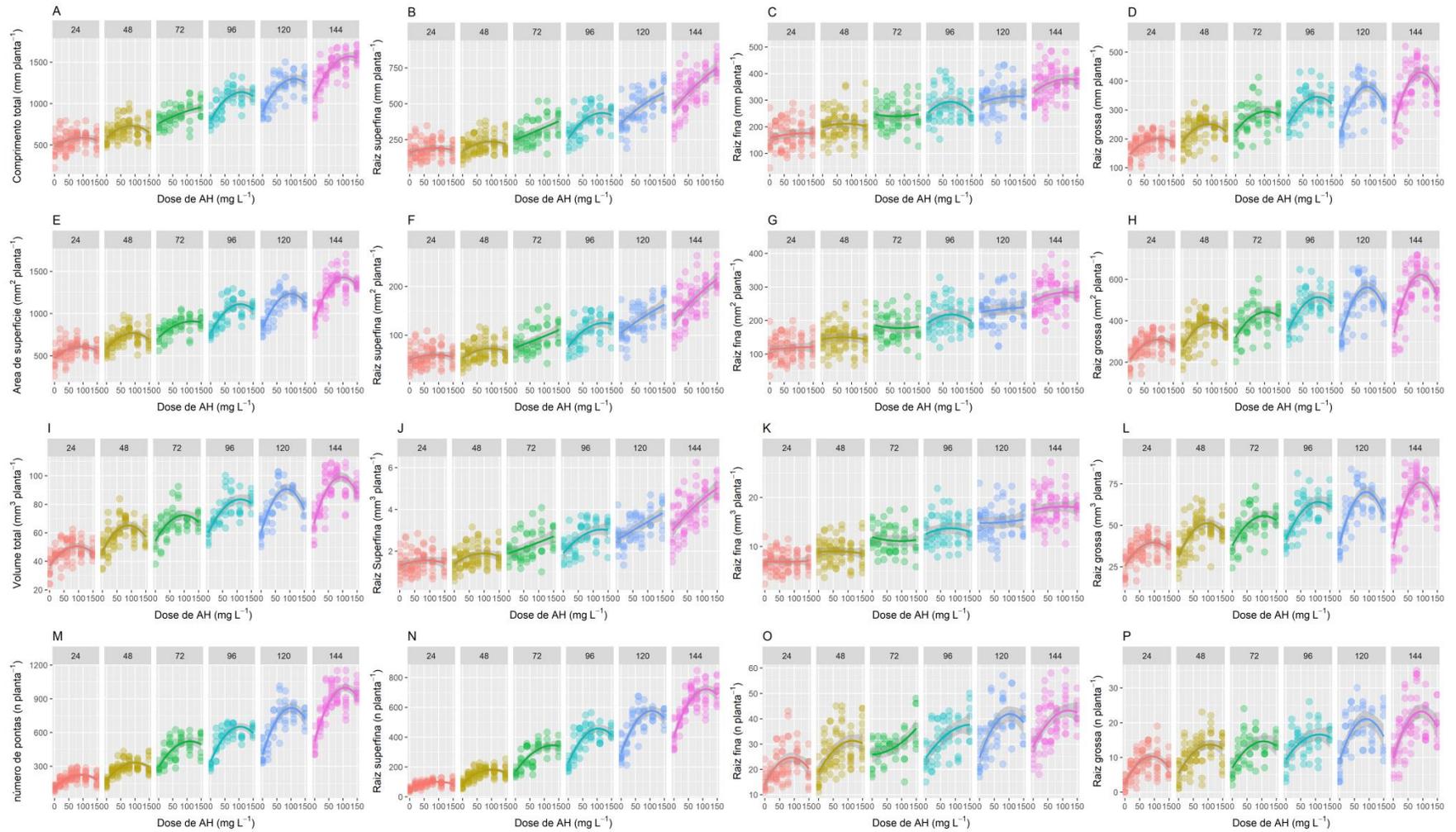


Figura 16. Gráfico de dispersão e curva estimada pelo modelo de regressão linear quadrático com as bandas de confiança para a variável comprimento total, área de superfície total, volume total de raiz e número total de pontas de raiz, e dentro das classes de raízes superfina, fina e grossa, das plântulas de arroz em função das doses de ácido húmico extraído com hidróxido de potássio (AHk). Mensuradas em intervalos de 24 até 144h após aplicação.

Quase todas as características de raízes foram significativamente correlacionadas (PCA), incluindo 10 caracteres radiculares com valores de correlação acima de 0,9 (Figura 17). Entretanto o diâmetro médio de raiz apresentou correlação negativa com todas as outras características de raízes que foram avaliadas, como encontrado em milho sob estresse de P (SOUZA et al., 2012). Recentemente, Zobel et al. (2006) demonstraram que em chicória, raízes finas pode apresentar três diferentes respostas específicas de cultivares à privação de fósforo: primeiro, uma redução no tempo de uma classe de diâmetro de raízes finas em favor de uma segunda classe de diâmetro, mais fino, em segundo lugar, uma redução na densidade de massa de raízes finas, sem uma mudança concomitante de comprimento, em terceiro lugar, o inverso do primeiro tipo de resposta. No primeiro tipo de resposta, as raízes maiores em média de 0,86 mm de diâmetro, e a menor de 0,28 mm de diâmetro (cerca de 75% do comprimento total da raiz).

Neste estudo, a Análise de Variância Multivariada (MANOVA) com 18 variáveis radiculares mensuradas em plântulas de arroz em intervalos de 24h até 144h mostram uma alta significância para os distintos tratamentos com ácido húmico em cada tempo de coleta (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) para 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 24h até 144h em plântulas de arroz var. Piauí sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água (AHa) e extraído com KOH (AHk).

Trat	Horas		GL	Wilks	F aprox	num GL	den Df	Pr(>F)	
AHa	48h	Dose AH	1	0,37	31,93	18	35	0,00143	**
		Resíduo	53						
	72h	Dose AH	1	0,32	74,87	18	64	6,90E-07	***
		Resíduo	81						
	96h	Dose AH	1	0,28	92,04	18	64	1,09E-08	***
		Resíduo	81						
	120h	Dose AH	1	0,24	11,24	18	63	1,82E-13	***
		Resíduo	80						
	144h	Dose AH	1	0,17	17,67	18	65	2,20E-16	***
		Resíduo	82						
AHk	48h	Dose AH	1	0,48	3,92	18	65	2,5E-05	***
		Resíduo	82						
	72h	Dose AH	1	0,36	3,65	18	37	0,00042	***
		Resíduo	54						
	96h	Dose AH	1	0,27	5,54	18	37	5,6E-06	***
		Resíduo	54						
	120h	Dose AH	1	0,28	5,79	18	41	1,7E-06	***
		Resíduo	58						
	144h	Dose AH	1	0,25	10,59	18	65	4,2E-13	***
		Resíduo	82						

A maior distancia de Mahalanobis Tabela 5 foi verificada entre os tratamentos 150 e 20 ($D^2=17,6$) às 48h, entre 150 e 0 ($D^2=21,54$) às 72h, entre 150 e 0 ($D^2=26,67$) às 96h, entre 150 e 0 ($D^2=28$) as 120h e entre 150 e 0 ($D^2=46,63$) as 144h, sendo os tratamentos menos relacionados. E a menor entre os tratamentos 40 e 20 ($D^2=2,16$) às 48h, entre 20 e 0 ($D^2=2,52$)

às 72h, entre 40 e 20 ($D^2=1,53$) às 96h, entre 40 e 20 ($D^2=1,88$) as 120h e entre 80 e 60 ($D^2=1,81$) as 144h.

Tabela 5. Matriz de Distância de Mahalanobis (D^2) para 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 48h até 144h, em plântulas de arroz var. Piauí sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água.

48h	0	20	40	60	80	110	72h	0	20	40	60	80	110
20	3,30						20	2,52					
40	4,28	2,16					40	4,65	3,23				
60	6,57	8,14	5,52				60	7,19	5,90	2,67			
80	11,44	10,02	7,30	5,90			80	10,69	7,41	4,99	4,31		
110	5,80	7,22	5,10	3,94	4,47		110	14,31	11,01	8,48	5,74	6,63	
150	16,43	17,24	13,77	8,40	7,46	6,80	150	21,54	17,52	13,87	6,68	6,51	9,50
96h	0	20	40	60	80	110	120h	0	20	40	60	80	110
20	3,35						20	3,94					
40	5,98	1,53					40	6,19	1,88				
60	11,55	5,37	3,14				60	11,10	7,58	4,66			
80	13,24	5,44	2,86	2,46			80	15,91	10,02	7,94	4,24		
110	18,32	9,29	6,02	4,67	3,34		110	22,41	15,76	12,57	6,61	4,77	
150	26,67	17,25	11,28	9,03	6,27	4,46	150	28,00	21,94	17,23	10,01	7,93	3,95
144h	0	20	40	60	80	110							
20	3,32												
40	7,07	4,11											
60	15,59	9,43	4,51										
80	14,49	8,33	4,74	1,81									
110	29,47	20,61	13,64	5,76	5,19								
150	46,63	36,21	27,63	15,89	16,32	6,61							

Os resultados de consistência dos agrupamentos testados a partir das combinações entre as matrizes de distância de mahalanobis (D^2) e os métodos de agrupamento são apresentados na Tabela 6. Dentre os métodos hierárquicos de agrupamento testados, o UPGMA foi o que apresentou os dendrogramas com máximo coeficiente de correlação cofenética (CCC) concordando com Sokal e Rohlf (1962). Portanto, a técnica UPGMA, apresentou maior consistência quando comparada à metodologia do vizinho mais próximo (Single linkage clustering), vizinho mais distante (Complete linkage clustering) e Ward clustering. Nesse sentido, pode-se notar que os CCC empregado como parâmetro na avaliação da consistência das técnicas testadas, apresentaram valores superiores quando as matrizes de distância estimadas nas diferentes coletas foram agrupadas na metodologia de UPGMA.

Tabela 6. Coeficiente de Correlação COFENÉTICO (CCC) entre a matriz de Distância de Mahalanobis (D²) e os métodos de agrupamento, das variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 48h até 144h, em plântulas de arroz sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk).

	horas		Single linkage clustering	Complete linkage clustering	Average clustering	Ward clustering
AHa	48		0,734	0,601	0,745	0,594
	72		0,66	0,51	0,676	0,498
	96	D ²	0,54	0,537	0,535	0,521
	120		0,475	0,67	0,673	0,667
	144		0,632	0,642	0,645	0,643
AHk	48		0,849	0,880	0,881	0,876
	72		0,451	0,630	0,634	0,631
	96	D ²	0,524	0,634	0,640	0,627
	120		0,649	0,631	0,657	0,656
	144		0,582	0,671	0,672	0,591

Os resultados de consistência via Mantel dos agrupamentos testados a partir das combinações entre as diferentes matrizes de distância de mahalanobis e os metodos de agrupamento são apresentadas na Tabela 7. Dentre os métodos hierárquicos de agrupamento testados, o UPGMA também foi o que apresentou os dendrogramas com máximo r_M e alta significância. Assim, pode-se contruir os dendrogramas utilizando a distância de mahalanobis combinado com o metodo de agrupamento UPGMA.

Tabela 7. Consistência via Mantel (estatística de Mantel) entre a matriz de Distância de Mahalanobis (D²) e os métodos de agrupamento (Single linkage-S, Complete linkage -C, UPGMA-A e Ward-W) das variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 48h até 144h, em plântulas de arroz sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk).

	Horas		S	Signif:	C	Signif:	A	Signif:	W	Signif:
AHa	48		0,73	0,001	0,6	0,001	0,74	0,002	0,59	0,001
	72		0,66	0,002	0,51	0,014	0,68	0,001	0,5	0,021
	96	D ²	0,54	0,019	0,54	0,013	0,53	0,001	0,52	0,002
	120		0,47	0,004	0,67	0,002	0,67	0,003	0,67	0,004
	144		0,63	0,001	0,64	0,002	0,64	0,003	0,64	0,001
AHk	48		0,85	0,001	0,88	0,004	0,88	0,003	0,88	0,002
	72		0,45	0,001	0,63	0,001	0,63	0,003	0,63	0,002
	96	D ²	0,52	0,007	0,63	0,001	0,64	0,002	0,63	0,002
	120		0,65	0,003	0,63	0,007	0,66	0,004	0,66	0,004
	144		0,58	0,002	0,67	0,002	0,67	0,001	0,59	0,001

As Figuras 7 e 8 apresentam as análises das variáveis quantitativas via distância de mahalanobis para os ácidos húmicos extraídos com água e KOH, respectivamente, bem como suas distintas doses e momentos de coletas. Nestas, é possível perceber um padrão de agrupamento similar, na qual a distância D² proporcionou um dendrograma com 2 grupos para

os AH extraídos com água. Assim, o dendrograma para as 48 horas apresenta resultados que não se escudunam com as demais épocas de coleta, pois agrupa como similares as doses 60 e 110 mg AHa L⁻¹. Uma vez que, para as demais épocas a dose 110 se apresenta como similar com a dose de 150 mg AHa L⁻¹. Demonstrando que as primeiras horas de estímulo dos ácidos húmicos sobre as raízes das plântulas de arroz ainda não promoveram os fenótipos de maneira definida, possivelmente por ainda estar ocorrendo alterações em nível molecular e metabólica, não sendo, portanto, um momento adequado para avaliação segura dos vários parâmetros morfológicos da raiz em função das doses dos ácidos húmicos. O dendrograma para as 96 horas, entretanto, apresenta resultados em que os fenótipos radiculares se manifestam de maneira definida com as demais épocas de coleta, e os agrupam em classes de respostas, sendo como similares às doses 0, 20 e 40, e agrupam as doses 60, 80, 110 e 150 mg AHa L⁻¹.

Um padrão de agrupamento similar no dendrograma da Figura 18, mostra 2 grupos para os AHk. Onde o dendrograma para as 24 e 48 horas apresenta maior distância entre o controle (zero) e as demais doses de AHk. Demonstra que as primeiras horas de estímulo dos ácidos húmicos sobre as raízes das plântulas ainda não promoveram os fenótipos de maneira definida, não sendo, momentos adequados para avaliação segura dos parâmetros morfológicos da raiz em função das doses dos ácidos húmicos. Entretanto, o dendrograma a partir das 96 horas, apresenta resultados em que os fenótipos radiculares se manifestam de maneira definida com as demais épocas de coleta, e os agrupam em classes de respostas similares às doses 0, 20 e 40, 60e agrupam as doses 80, 110 e 150 mg AHa L⁻¹. Wm que ocorre as maioes estímulos sobre os parâmetros radiculares (Figura 18).

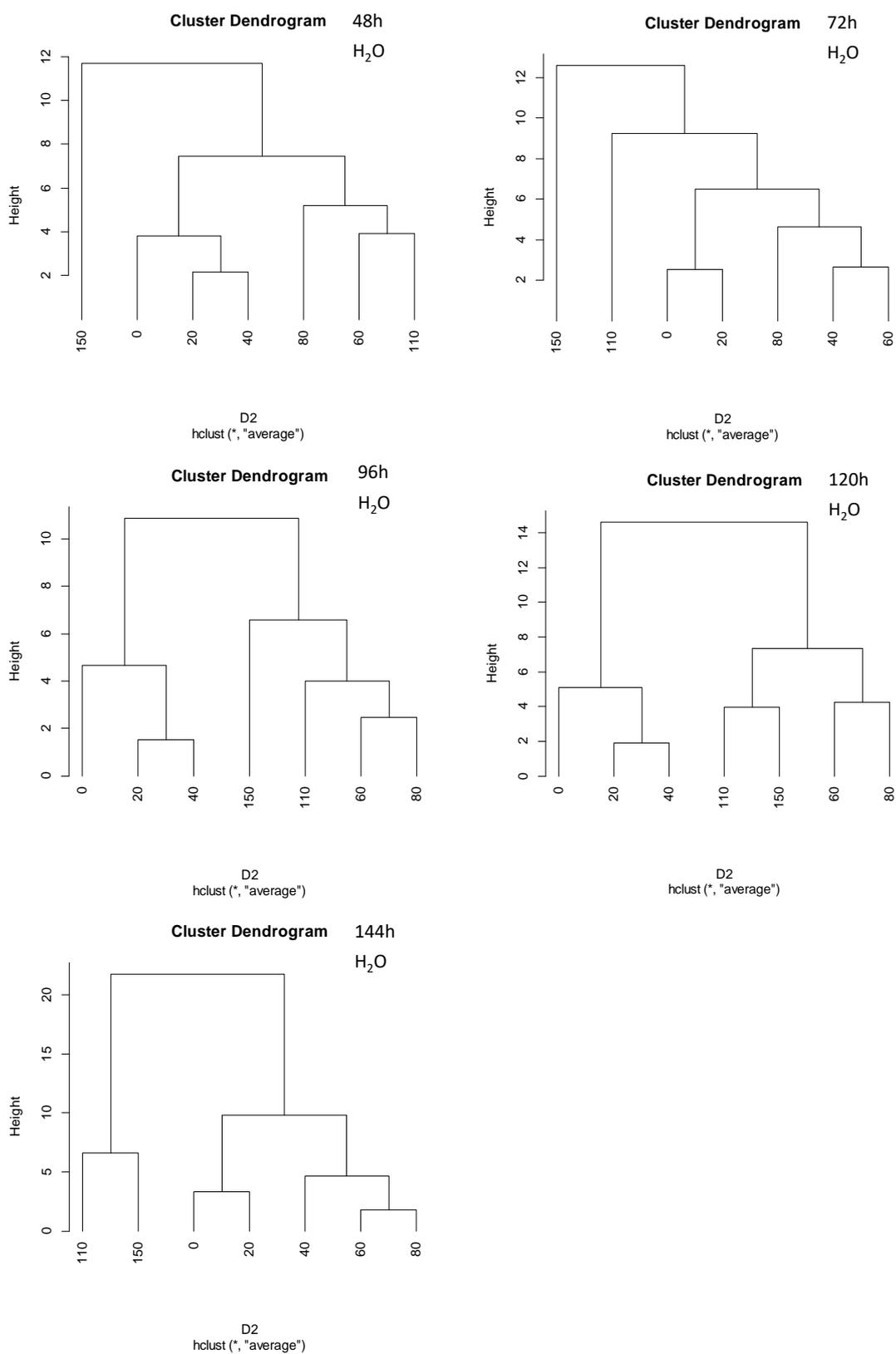


Figura 17. Dendrogramas para as 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 24h até 144h, em plântulas de arroz var. Piauí sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água.

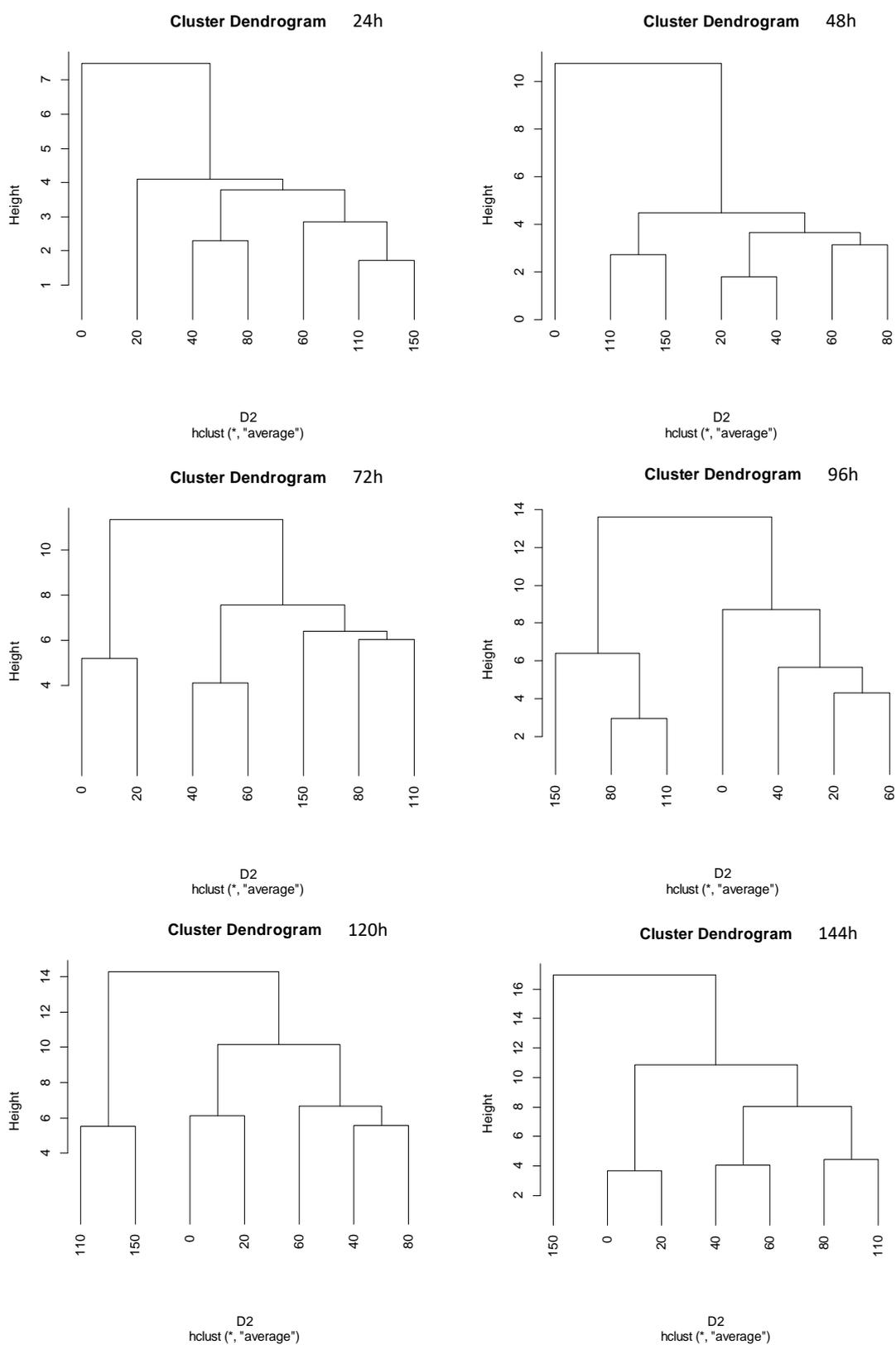


Figura 18. Dendrogramas para as 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 24h até 144h, em plântulas de arroz var. Piauí sob doses crescentes de ácido húmico extraído com KOH.

possibilita reduzir o conjunto original de variáveis, via dispersão gráfica dos componentes de maior variação. Nesse sentido, Cruz e Carneiro (2003) recomendam que, no mínimo, 80% da variação seja absorvida até os 3 primeiros componentes principais, tornando, assim, mais segura a representação gráfica em planos bi ou tridimensionais.

A análise de componentes principais para as 48h (Figura 19), baseada nos parâmetros morfológicos da raiz, explicou 83,4% da variabilidade total nas duas primeiras componentes, sendo que 71,2 % da variância estão explicados pela CP1 estando positivamente ligado, a maioria das variáveis, associados ao tratamento com as maiores doses de AH. Em oposição, projetam-se negativamente na CP1 o diâmetro médio da raiz. Essa primeira componente principal sintetiza o efeito preponderante das condições na qual a planta foi submetida. A CP2 apresenta 12,2 % da variância, separando as diferentes classes de raízes como as superfina das demais.

A análise de componentes principais para as 72h, 96h, 120h e 144h baseada nos parâmetros morfológicos da raiz, explicou 79,6%, 82,5%, 77,6% e 76,4%, respectivamente a variabilidade total nas duas primeiras componentes (Figura 19), sendo que as maiores percentagens da variância estão explicadas pela CP1 estando positivamente ligado, a maioria das variáveis, associados ao tratamento com as maiores doses de AH.

Tabela 8. Média das taxas de incremento das 18 variáveis radiculares mensuradas nas plantas controle e nas plantas tratadas com a melhor dose de ácido húmico extraído com água (AHa) e extraído com KOH (AHk) as 144h.

144h Dose	AHa		Tx Incremento	AHk		Tx incremento
	0	150		0	80	
Comprimento	631,50	1160,76	83,81	1024,40	1574,73	53,72
Area Superfície	664,86	1092,24	64,28	912,26	1455,18	59,51
Diâmetro médio	3,37	3,01	-10,60	2,86	2,96	3,79
Volume Radicular	55,90	82,48	47,56	65,02	108,39	66,71
Nº de Pontas	289,17	501,50	73,43	497,00	955,08	92,17
Nº de Bifurcações	328,58	714,92	117,58	588,00	1199,33	103,97
0.5<.C.<=1.5	196,21	507,31	158,55	410,68	656,18	59,78
1.5<.C.<=3.5	169,40	261,66	54,46	321,44	383,87	19,42
.C.>3.5	237,51	333,54	40,43	252,48	457,50	81,21
0.5<.AS.<=1.5	63,16	154,65	144,84	117,36	181,07	54,29
1.5<.AS.<=3.5	126,22	179,00	41,82	256,91	283,15	10,21
.AS.>3.5	335,51	515,54	53,66	345,72	660,10	90,93
0.5<.V.<=1.5	1,71	4,00	133,72	2,82	4,22	49,79
1.5<.V.<=3.5	8,11	10,43	28,53	17,37	17,75	2,21
.V.>3.5	39,05	67,22	72,17	39,15	78,89	101,47
0.5<.P.<=1.5	162,33	290,17	78,75	376,42	685,83	82,20
1.5<.P.<=3.5	52,25	76,00	45,45	30,58	40,33	31,88
.P.>3.5	11,00	13,92	26,52	9,42	27,58	192,92

Para destacar a contribuição daquelas doses de AH com maior efeito sobre as raízes foram calculadas as taxas de incremento médio, das 18 variáveis radiculares mensuradas nas plantas tratadas com a melhor dose de ácido húmico extraído com água (AHa) e extraído com KOH (AHk) e seus respectivos controles as 144h (Tabela 8).

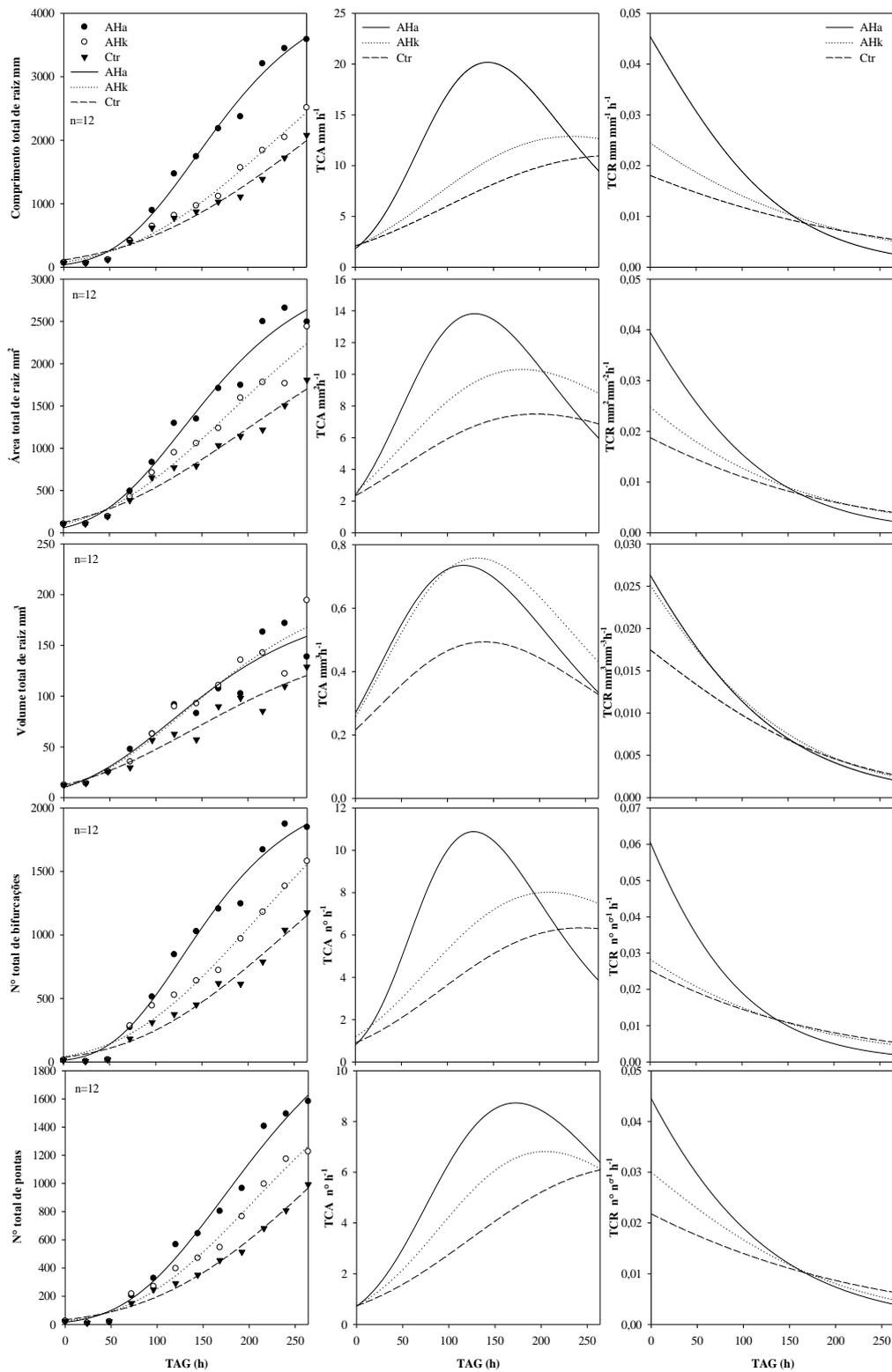


Figura 20. Crescimento, taxa de crescimento absoluto (TCA) e relativo (TCR) para o comprimento, área de superfície, volume, nº de bifurcações e de pontas das raízes de plântulas de arroz numa solução com ácido húmico extraído com água (AHa), extraído com KOH (AHk) e controle (Ctr). TAG- tempo após germinação de AH.

A análise quantitativa do crescimento vegetal foi realizada para as plântulas tratadas com a dose de 150 mg AHa L⁻¹ e 80 mg AHk L⁻¹, e as controle (Figura 20). Os AHs promoveram maior estímulo sobre o crescimento dos parâmetros radiculares e sobre as taxas de crescimento. O modelo matemático de Richards ajusta confiavelmente os dados (Tabela, 9). Em geral apresentou altos valores do coeficiente de determinação bem como os coeficientes estimados foram significativos (Tabela, 10). O que permite em seguida, obter as TCA e TCR para cada variável. De modo geral, as plantas tratadas com AHs mostram que a eficiência da planta no crescimento diário aumentou. Então, para o comprimento radicular total (Figura 20) a TCA das plantas tratadas com AHa são superiores as tratadas com AHk que são superiores ao do controle das que estão com AHa, que apresentam redução das taxas a partir das 150h, pois continuam crescendo em menor velocidade, isto é devido a contribuição em comprimento das raízes superfinais (0,5-1,5mm) que continuam alongando (Tabela A1). Já a taxa de crescimento absoluto máxima (TCA_{max}) foi de 20, 13 e 10 mm h⁻¹ as 150h e 200h para as tratadas com AHa, AHk e controle, respectivamente (Figura 20). Com relação à área total radicular os AHs proporcionam TCA e TCR superiores aos do controle durante o período de crescimento e a TCA_{max} são de 14, 10 e 7 mm² h⁻¹ com quedas a partir das as 150h para as tratadas com AH e a partir da 200h nas controle.

Tabela 9. Coeficientes estimados e R² dos ajustes, obtidos pelo modelo de Richards, para as cinco variáveis radiculares mensuradas nas plantas tratadas com a melhor dose de ácido húmico extraído com água (AHa) e extraído com KOH (AHk) e plantas controle (ctr), às 144h.

	Trat	a	b	c	d	R ²
Comprimento	AHa	4427,72	-0,0421	0,0133	0,1428	0,9952
	AHk	5462,00	-1,3262	0,0066	0,0565	0,9951
	ctr	5890,94	-1,1490	0,0053	0,0701	0,9885
Área de raiz	AHa	3163,30	-0,4664	0,0126	0,1228	0,9877
	AHk	3776,41	-1,5099	0,0076	0,0557	0,9880
	ctr	3116,53	-0,8886	0,0069	0,1069	0,9881
Volume	AHa	192,34	-0,5593	0,0112	0,1543	0,9623
	AHk	217,73	-0,6378	0,0101	0,1393	0,9692
	ctr	163,59	-0,0870	0,0092	0,2520	0,9744
Pontas	AHa	2407,50	-1,2042	0,0101	0,0524	0,9929
	AHk	2244,60	-0,2668	0,0088	0,1271	0,9932
	ctr	3234,23	-1,2823	0,0054	0,0537	0,9935
Bifurcação	AHa	2169,42	-0,8665	0,0141	0,0688	0,9922
	AHk	3008,47	-1,3570	0,0075	0,0539	0,9923
	ctr	2756,21	-1,5596	0,0064	0,0439	0,9893

Para o volume total radicular as que estão com AH, apresentam as maiores TCA, TCR quando comparados ao controle. Porém não diferenciam entre elas. Isso mostra que o volume é uma característica muito influenciada pelas raízes mais grossas, aquelas compreendidas acima de 3,5mm de diâmetro. E finalmente para o número total de bifurcações e de pontas os AHa promovem um estímulo maior quando comparado ao AHk e este é maior em relação as plantas controle, que possuem taxas de crescimento inferiores (Figura 20).

O crescimento do sistema radicular das plantas no solo é exposto a uma ampla faixa de componentes orgânicos e inorgânicos, onde uma considerável parte dos componentes orgânicos é representada pelas substâncias húmicas (SHs). A aplicação desses bioestimulantes nas plantas

normalmente leva a maior conteúdo de nutrientes no tecido e alterações fisiológicas positivas quando utilizadas em concentrações adequadas (CANELLAS et al., 2005; NARDI et al., 2009). Entretanto, no presente estudo todos os parâmetros radiculares foram estimulados pelas doses de ácido húmico na solução somente com sulfato de cálcio (sem demais nutrientes). As plantas foram capazes de crescer mais intensamente quando submetidas aos AH, somente com os recursos disponibilizados pelas sementes, apresentando maior eficiência no uso desses recursos na produção de um sistema radicular maior e mais vigoroso quando tratadas com os AHs. A semente contém uma reserva relativamente grande de carboidratos e nutrientes de armazenamento (MARSCHNER, 1998), que permite que a raiz embrionária cresça rapidamente. Cresce 3-5 cm de comprimento em 2-3 dias após a germinação.

A morfologia da raiz (por exemplo, o comprimento e o raio da raiz) e a arquitetura (como padrão geométrico de ramificação) são as principais características que influenciam a aquisição de recursos pelas plantas (CALDWELL, 1987; BARBER, 1995; YAMAUCHI et al., 1996).

Em plantas de arroz, as raízes laterais são as que compreendem a maior proporção do sistema radicular em comprimento total e número de raízes (YAMAUCHI et al., 1987a, b; HARADA & YAMAZAKI, 1993), são responsáveis pela maior absorção de água e nutrientes (YOSHIDA et al., 1982). As raízes mais finas normalmente conferem maior capacidade de absorção de nutrientes por unidade de massa radicular, por aumentar a área da superfície da raiz. Por exemplo, a taxa de absorção de nitratos por gramíneas foi positivamente correlacionada com o comprimento, superfície e volume da raiz fibrosa de cada classe de diâmetro (WANG et al., 2006).

Uma grande área da superfície radicular é benéfica porque proporciona uma absorção global de nutrientes alta. Em estudo com mostarda-marrom, esta conseguia explorar Mn de um volume de solo maior do que a cultura do trigo, provavelmente devido ao fato de que a área de superfície radicular da mostarda-marrom era 2,3 vezes maior em relação ao do trigo (SADANA et al., 2003; LIAO et al., 2004).

Foi sugerido que o volume específico do solo, onde um nutriente difunde para raízes da planta, se relaciona negativamente ao raio radicular Claassen & Steingrobe (1999), indicando que um sistema radicular mais fino possui uma área superficial maior, o que pode explicar a observação de que as raízes mais finas aumentaram a disponibilidade de Zn devido a uma exploração mais aprofundada do solo o que também pode aplicar-se ao P, uma vez que ambos possuem baixa capacidade de difusão no solo (DONG et al., 1995; LINCH et al., 2011).

Em alguns estudos foi observado que as raízes grossas têm um papel direto na resistência à seca, porque as raízes de maior diâmetro estão relacionadas à capacidade de penetração (MATERECHERA et al., 1992; NGUYEN et al., 1997; CLARK et al., 2008) e ramificação (FITTER, 1991, INGRAM et al., 1994), e possuem raios do vaso do xilema maiores e menor resistência axial ao fluxo de água (YAMBAO et al., 1992).

Neste estudo, o investimento no sistema radicular aumentou com o a aplicação dos AHs na solução como observado na morfometria realizada. Isso tem sido atribuído a uma série de efeitos diretos e indiretos promovidos pelas substâncias húmicas para várias espécies vegetais (CONCHERI et al., 1996; NARDI et al., 2002; FAÇANHA ., 2002; CANELLAS et al., 2002; DOBBS et al., 2007; LIMA, 2008; AGUIAR et al., 2009; TREVISAN et al., 2010, MUSCOLO, 2013). Neste caso, os AHs apresentaram um efeito inicial mais intenso sobre o sistema radicular como já relatado por Pinton et al., (1998; 1999a; 1999b) e por Schimidt et al., (2007).

O efeito sobre o crescimento e o desenvolvimento das raízes, é geralmente obtido em concentrações baixas ou intermediárias de AH e, em geral, quando a concentração é elevada, um efeito inibitório é observado (DOBBS et al., 2007). O mesmo efeito quadrático foi verificado em estudo com diferentes concentrações de AH e subfrações (SF) sobre o número de raízes laterais emergidas tanto em *Arabidopsis* quanto em milho (AGUIAR et al., 2009;

CANELLAS et al., 2010), e em plântula de arroz (GARCÍA et al., 2012). Neste estudo foi verificado um comportamento linear quando as plantas foram submetidas a ácidos húmicos extraídos com água (AHa). Entretanto, foi observado nas plantas de arroz que o comprimento total, área total de superfície, volume total, número de raízes laterais, apresentaram um padrão de dose resposta quadrático ao ácido húmico nos diferentes momentos de avaliação quando as plantas foram submetidas aos ácidos húmicos extraídos com KOH (AHk).

Vários estudos mostraram que a capacidade das SH para afetar o crescimento e a fisiologia das plantas é influenciada pelas suas características estruturais (ROSE et al., 2014). Os carbonos pertencentes a estruturas de lignina e grupos C-COOH em ácidos húmicos de vermicomposto (HA) correlacionam-se positivamente com a emissão de raízes laterais em plantas de milho (JINDO et al., 2012; AGUIAR et al., 2013). SH extraídos de solos apresentando enriquecimento estrutural de carbono -CH₃ e -COOH estimulam o metabolismo do carbono em plantas de *Pinus nigra* (MUSCOLO et al., 2007). Um aumento na proliferação de raiz lateral, área superficial e comprimento da radícula das plantas, podem estar relacionadas com estruturas de AH menos complexos e mais funcionalizadas (-O, -N cadeias alifáticas funcionalizadas) (GARCÍA, 2013). Assim, a ação da AHs pode ser associada a grupos C-alifáticos substituídos (CAlk [O, N], C-Alk-O), grupos C-COOH carboxílicos e alifaticidade como observados na caracterização dos AH tratada no CAPÍTULO 1 (Tabela 2). Além disso, a hidrofobicidade e hidrofiliabilidade são propriedades das SHs que têm se relacionado com a sua bioatividade. O índice de Hidrofobicidade e fragmentos húmicos polares, tem mostrado uma correlação direta com o crescimento radicular e a atividade tipo auxina de AH em plantas de milho (DOBBSS et al. 2010, CANELLAS et al. 2012, JINDO et al., 2012, CANELLAS et al. 2016).

5.6. CONCLUSÕES

O ácido húmico extraído com água promoveu os maiores estímulos para todos os parâmetros morfológicos radiculares das plântulas de arroz variedade tradicional Piauí, e apresentou um padrão de bioatividade do tipo linear reta, das doses crescentes do ácido húmico extraído com água sobre a morfologia das raízes das plântulas, em todos os momentos de avaliação. Sendo a melhor dose de 150 mg de AHa L⁻¹.

O padrão de estímulos das doses crescentes do ácido húmico extraído com KOH sobre a morfologia das raízes das plântulas de arroz var. Piauí, foi do tipo quadrático em todos os momentos de avaliação, modificando a morfologia (comprimento, área, número de pontas e volume da raiz). Sendo a melhor dose de 80 mg de AHk L⁻¹.

A técnica de agrupamento se mostrou robusto, e a distância de Mahalanobis aliado ao método de agrupamento UPGMA foram eficientes e adequados para avaliar o grande volume de dados. Possibilitando identificando as doses 80, 100 e 150 mg de AH L⁻¹ como as melhores doses.

O ácido húmico extraído com água promoveu as maiores taxas de crescimento absoluto e taxas de crescimento relativo do sistema radicular nas plantas de arroz, seguido do ácido húmico extraído com KOH.

As propriedades bioativas positivas gerais do ácido húmico de vermicomposto solúvel em KOH podem ser úteis como elicitores para eficiência do uso dos recursos da própria semente e garantir um crescimento mais rápido e vigoroso da plântula. Além disso, a bioestimulação por ácido húmico pode promover a formação de aparelhos radiculares maiores, aumentando potencialmente a absorção de água e nutrientes pelas plantas.

6. CAPÍTULO IV

EFEITOS DOS ÁCIDOS HÚMICOS E DO BAIXO SUPRIMENTO DE NITRATO SOBRE A EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E METABOLISMO DE N EM PLÂNTULAS DE ARROZ

6.1. RESUMO

As substâncias húmicas, e especialmente os ácidos húmicos, extraídos com solução alcalina proveniente de vermicomposto, exercem efeito sobre o crescimento, a absorção de nutrientes, o metabolismo, e o desenvolvimento das plantas. Entretanto, ácidos húmicos extraídos com água, também proporcionam grandes estímulos sobre as plantas. Embora, existam muitos estudos sobre o efeito positivo de frações húmicas sobre a absorção de nutrientes, são poucos os estudos que envolvam estímulos dos AHs sobre as plantas, quando submetidas a baixos níveis de NO_3^- , e modulação dos sistemas de absorção de alta afinidade. O objetivo foi estudar o efeito do pré-tratamento com ácidos húmicos extraídos com água (AHa) e KOH (AHk), sobre a atividade e expressão das H^+ -ATPases de membrana plasmática, expressão dos transportadores de alta afinidade para N-NO_3^- , a atividade da enzima de assimilação de N glutamina sintetase (GS), e sobre o acúmulo de biomassa pelas plantas de arroz sob baixo suprimento de N-NO_3^- . As plantas foram crescidas em câmara de crescimento, e após 18 dias após a germinação foram submetidas à privação de N, seguida da aplicação ou não de ácido húmico extraídas com água e KOH durante 48h, às 72h de privação de N foram transferidas para uma solução nutritiva com 0,2 mM de N-NO_3^- . As plantas tratadas modificaram o pH da solução nutritiva, principalmente naquelas pre-tratadas com AH. A aplicação dos ácidos húmicos promoveu estímulos sobre a absorção de N-NO_3^- , o teor das frações nitrogenadas, a atividade das enzimas GS, IDH, e H^+ -PPases, bem como as PM H^+ -ATPase e a expressão dos transportadores iHATS de NO_3^- . Os AHs estimularam de maneira diferenciada a expressão relativa das isoformas de PM H^+ -ATPases (*OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8*) e dos transportadores para NO_3^- de alta afinidade (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.2*) das raízes de arroz. Promoveu um estímulo adicional da atividade da GS, IDH e das pirofosfatases, levando a um maior crescimento naquelas tratadas com ácido húmico extraído com água, melhorando a performance da planta em condições de baixo suprimento de N.

Palavras chave: Atividade da Glutamine Sintetase. Nitrogênio. Sistema de Absorção de Alta Afinidade. NRTs. H^+ -ATPases.

6.2. ABSTRACT

Humic substances, and especially humic acids extracted with alkaline solution from vermicompost, have an effect on the plants growth, nutrient uptake, metabolism, and development. However, humic acids extracted with water also provide great stimuli on plants. Although there are many studies on the positive effect of humic fractions on nutrient uptake, there are few studies that involve stimuli of AHs on plants when subjected to low levels of NO_3^- , and high affinity uptake systems modulation. The objective of this study was to evaluate the effect of pre-treatment with humic acids extracted with water (HAa) and KOH (HAk) on the activity and expression of plasma membrane H^+ -ATPases, expression of the high affinity transporters for N-NO_3^- , the N assimilation enzyme, glutamine synthetase (GS), and on biomass accumulation by rice plants under low N-NO_3^- supply. The plants were grown in a growth chamber, and after 18 days after germination they were submitted to N deprivation, followed by the application of humic acid extracted with water and KOH for 48h, and at 72h of N deprivation, plants were transferred to a nutrient solution with 0.2 mM N-NO_3^- . The treated plants modified the pH of the nutrient solution, especially in those pretreated with HA. The application of the humic acids modified the absorption of N-NO_3^- , the nitrogenated fractions, the enzymes GS, IDH, and H^+ -PPases, as well as the PM H^+ -ATPase isoforms and the expression of the iHATS transporters of NO_3^- . The HAs differentially stimulated the relative expression of the H^+ -ATPases isoforms (*OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* and *OsA8*) and the high affinity NO_3^- transporters (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* and *OsNAR2.2*) of rice roots. Promoting an additional stimulation of GS, HDI and pyrophosphatases activity, leading to greater growth in those treated with humic acid extracted with water, improving the plant performance under low N supply conditions.

Key words: Glutamine Synthase Activity. Nitrogen. High Affinity System. NRTs. H^+ -ATPases.

6.3. INTRODUÇÃO

O vermicomposto possui grandes quantidades de ácidos húmicos na sua formação (ATIYEH et al., 2002). De modo geral, os ácidos húmicos extraídos com solução alcalina proveniente de vermicomposto exercem efeito sobre o crescimento e metabolismo das plantas (NARDI et al., 2002; MUSCOLO et al., 2013; CANELLAS et al., 2013), promove proteção contra o estresse e estimula o crescimento da raiz (GARCIA et al., 2012; TREVISAN et al., 2010). Vários trabalhos vêm mostrando o efeito benéfico de diferentes materiais húmicos sobre o crescimento de diferentes espécies vegetais (CANELLAS et al., 2010; AGUIAR et al., 2009, ERTANI et al., 2013). Entretanto, ácidos húmicos extraídos com água, também proporcionam grandes estímulos sobre as plantas (PINTON et al., 1999; SCHMIDT et al., 2007).

Entre os efeitos das SH ligados diretamente à nutrição de plantas e descritos em diferentes espécies, está a sua habilidade tanto para ativar a atividade da PM H^+ -ATPase das raízes (CANELLAS et al., 2002; FAÇANHA et al., 2002; CANELLAS et al., 2010) e estimular as taxas de absorção de nutrientes como NO_3^- (PINTON et al., 1999; QUAGGIOTTI et al., 2004; MORA et al., 2010, ERTANI et al., 2013). Apesar de existirem muitos estudos sobre o efeito positivo de frações húmicos sobre a absorção de nutrientes (VAUGHAN & MALCOLM; 1985; CHEN & AVIAD; 1990; VARANINI & PINTON; 1995, 2001; NARDI et al., 1996, 2002, 2009; CLAPP et al., 2001; TAN, 2003; e Chen et al., 2004a) são poucos os estudos que envolvam a ação dos AHs sobre as plantas quando submetidas a baixos níveis de NO_3^- , e como atua sobre os sistemas de absorção de alta afinidade.

Nesse sentido analisamos a hipótese do efeito direto sobre a nutrição das plantas, pois para que se proceda o crescimento das plantas, é necessário que haja uma boa nutrição. Os ácidos húmicos podem promover uma melhoria na nutrição das plantas sob baixa disponibilidade de N, proporcionando um estímulo para o crescimento a partir do aumento da atividade das bombas de prótons levando ao aumento da força próton motriz, afetando de maneira distinta sobre as variações nos níveis de nitrogênio no meio, exercendo influência significativa sobre absorção de N e metabolismo das plantas de arroz, afetando a produção de raízes e a produção de biomassa.

O principal objetivo da presente pesquisa foi investigar, os padrões de expressão temporal de *OsNRTs* and *OsNAR*, codificando para um transportador de alta afinidade de $N-NO_3^-$, e *OsAs*, codificando para isoformas PM H^+ -ATPase, das plantulas de arroz sob baixo ressurgimento de $N-NO_3^-$, em resposta ao pré-tratamento com ácidos húmicos extraídos com água e KOH. A quantificação dos metabolitos e a atividade de enzimas de assimilação de N, bem como a atividade das bombas de protons, foram realizados em paralelo, a fim de comparar seus padrões com as expressões dos genes.

6.4. MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1. Descrição experimental

O estudo foi realizado em câmara de crescimento no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As plantas foram expostas às 14h/10h (luz/escuro) de fotoperíodo com $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxo de fóton fotossintético, umidade do ar relativa de 70% e temperaturas de 28°C/24°C (dia/noite).

Sementes de arroz da variedade Piauí foram inicialmente desinfetadas com hipoclorito 2% durante 30 min sob agitação orbital e em seguida lavadas dez vezes com água destilada. Depois de desinfetadas, as sementes foram colocadas para germinar na superfície da lâmina de água de um vaso, sustentadas por uma gaze. Seis dias após a germinação (DAG) as plântulas foram transferidas para potes de 0,7 L contendo solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) modificada a $\frac{1}{4}$ da força iônica (FI) com 1,0 mM de N em uma razão 3:1 de N- NO_3^- e N- NH_4^+ (0,6 mM de NO_3^- e 0,4 mM de NH_4^+). Trocas de solução para $\frac{1}{2}$ FI foram realizadas a cada três dias. Aos 18 DAG as plantas foram submetidas a uma solução nutritiva, sem N por 72 h. Após as primeiras 24 h de privação de N, as plantas foram separadas em três grupos, em seguida as plantas foram pre-tratadas com ou sem a aplicação de 150 mg L^{-1} de ácido húmico extraído com água (AHa) ou 80 mg L^{-1} de ácido húmico extraído com hidróxido de potássio (AHk) durante as 48 h restantes (Figura 21). Após o período de privação de N e tratamento com AH as plantas foram rinsadas 3 vezes com água destilada para evitar a possível interferência dos AHs aderidos a raiz e garantir somente o efeito do pré-estímulo dos AHs. Em seguida os três grupos de plantas foram submetidos a soluções nutritivas contendo a dose de 0,2 mM de NO_3^- simulando as pequenas quantidades de nitrato disponíveis em solos aerados de regiões tropicais (Figura 20). As plantas foram coletadas aos 3, 6, 9 e 24h após o ressuprimento com N- NO_3^- .

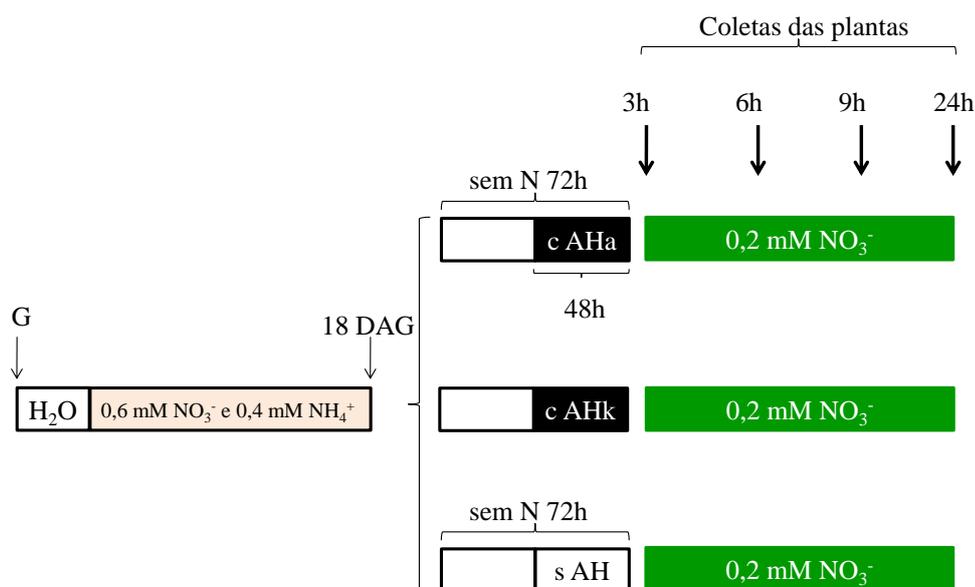


Figura 21. Esquema do experimento para avaliação do crescimento, absorção de 0,2 mM de NO_3^- , com ou sem pré-tratamento com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk).

6.4.2. Extração alcoólica do material fresco e dosagem das frações solúveis

A extração alcoólica e partição com clorofórmio foram realizadas segundo Fernandes (1984), como descritas a seguir:

Após determinar a massa fresca, um grama de material vegetal foi colocado em 20 mL de etanol 80% e armazenado em frascos do tipo falcon para posterior extração das frações solúveis. As amostras armazenadas em etanol foram trituradas em um triturador (TECNAL TE-102), e filtrada em camadas de gaze e papel filtro. Posteriormente, foram transferidas para funil de separação onde se adicionou igual volume de clorofórmio. Após agitação suave, permaneceu em repouso por 40 minutos, após a separação, a fração apolar foi descartada. A fração polar (sobrenadante) foi recolhida e elevada a um volume final de 25 mL com etanol 80%, sendo em seguida armazenada para as análises posteriores conforme descrito a seguir.

6.4.3. Determinação dos teores de N-NO₃⁻

A determinação dos teores de N na forma de nitrato foi realizada segundo Miranda et al, (2001) e Doane & Horwáth (2003) com modificações de Arruda (2014). Para uma maior precisão na determinação de nitrato a partir de soluções com baixas concentrações foi utilizado o protocolo proposto por Miranda et al. (2001), sendo necessários ajustes pois o protocolo foi inicialmente proposto para a determinação simultânea de nitrato e nitrito em plasma sanguíneo. A técnica é baseada na redução de nitrato a nitrito pelo cloreto de vanádio III (VCL₃), combinado com a detecção por meio da reação de Griess.

Foram realizados vários testes (dentre eles, testes alterando a concentração dos reagentes, das amostras, etc) até que os devidos ajustes foram feitos para uma melhor eficiência na determinação de nitrato em solução nutritiva. Em uma microplaca de 96 poços, sendo pipetados 30µL da amostra de solução nutritiva e 60 µL de uma solução resultante da mistura de VCL₃ 0,5% (m/v) em HCl 1M + sulfanilamida 0,4% (m/v) em HCl 1M + N-(1- naftil) etilenodiamnino dihidroclorido (0,02% (m/v) em H₂O ultrapura), na proporção de 2:1:1. Em seguida as amostras foram colocadas em estufa a 40°C por 50 minutos para acelerar desenvolvimento da cor, e após o aquecimento foram adicionados 110 µL de H₂O ultrapura e procedendo a leitura a 540nm.

6.4.4. Determinação dos Teores de N-NH₄⁺

A determinação de N na forma de amônio foi realizada pelo método de Felker (1977). Na determinação foram utilizadas duas soluções: A “solução A” constituída de 1% de fenol e 0,005% de nitroprussiato de sódio e a “solução B” composta de 3% de NaOH e 0,062% de dicloroisocianurato de sódio. Uma alíquota de 0,5 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessária) foi acrescentada a 2,5 mL de cada solução, após homogeneização e descanso por 1h 30min, as amostras foram lidas em espectrofotômetro. O NH₄Cl (0,0; 10; 25; 50; 100; 200; 300; 400 nmoles de NH₄⁺/0,5 mL) foi utilizado para confecção da curva padrão.

6.4.5. Determinação dos teores de açúcares solúveis

A determinação dos teores de açúcares solúveis foi realizada segundo Yemm & Willis (1954). Em tubos de ensaio de 2,5 cm de diâmetro imersos em banho de gelo, foram adicionados 5 mL do reagente de antrona (2% em H₂SO₄ 5:2), e após 5 minutos de repouso, adicionou-se lentamente 1 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessário) deixando-se em repouso por 5 minutos a 0°C. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 10 minutos para o desenvolvimento da cor verde característica. Após resfriamento

em água corrente, as leituras espectrofotométricas foram realizadas. A glicose (0, 20, 40, 50, 80 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi utilizada como padrão.

6.4.6. Determinação dos teores de N-amino livre

A determinação foi realizada de acordo com Yemm & Cocking (1955). Em tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M com pH 5,0; 1 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessário); 1,2 mL do reagente metil celossolve 100% + 0,01M KCN + Ninidrina 5%. A mistura foi agitada e todos os tubos foram fechados com papel alumínio e colocados para aquecer em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Após esse período, os tubos com as amostras foram resfriados em água corrente por 5 minutos, quando então se adicionou 3 mL de etanol 60%. A mistura foi homogeneizada e levada para a leitura espectrofotométrica. A leucina (0; 0,04; 0,08; 0,16; 0,20; 0,24; 0,32 mM) foi utilizada como padrão.

6.4.7. Avaliação da atividade das bombas de prótons (PM H⁺-ATPases e H⁺-PPases)

As atividades das bombas de prótons (PM H⁺-ATPases e H⁺-PPases) foram determinadas pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise de ATP (para as PM H⁺-ATPase) e PPI (para as H⁺-PPase) conforme Yang et al. (2002), Façanha e De Meis (1995), Santos et al. (2006) e Sperandio et al. (2011).

6.4.8. Extração das vesículas microsossomais

Após a separação das plantas em raiz e parte aérea, a extração das vesículas de plasmalema e atividade das PM H⁺-ATPases foram realizadas de acordo com Façanha e De Meis (1995), Santos et al. (2006) e Sperandio et al. (2011). Amostras de raiz foram maceradas em graal e pistilo com tampão de extração gelado (Tris-Cl 50 mM (pH 8,0), sacarose 250 mM, glicerol 100 mL/L, KI 150 mM, cloreto de colina 100 mM, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, polivinilpirrolidona (PVP) 10 g/L, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) 1 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mmoles/L e 5 g/L de albumina). Após filtrar o homogenato em quatro camadas de gaze foi realizada uma centrifugação a 3,600 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 8,000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e agora centrifugado a 105,000 g por 1 hora. Descartou-se, o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado com 1 mL de um meio contendo: Tris-HCl 30 mM (pH 7,5), glicerol 150 mL/L, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 2 mM e PMSF 1 mM. Em seguida este material foi centrifugado a 105,000g por 1 hora. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado com 0,5 mL de um meio contendo: Tris-HCl 30 mM (pH 7,5), glicerol 150 mL/L, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 2 mM e PMSF 1 mM. O material resultante, denominado fração microsossomal foram congeladas em N₂ líquido e armazenado a -80 °C para posteriores análises.

6.4.9. Quantificação da proteína

O teor de proteína dos extratos contendo vesículas da membrana plasmática e tonoplasto foi determinada pelo método de BRADFORD, (1976), usando soro albumina bovina como padrão. Uma alíquota de 60 μL da suspensão de membranas foi adicionada em tubos de ensaio e logo depois 3 mL da solução de Bradford (coomassie brilliant blue G-250 0,12 mol L⁻¹, etanol 0,1 mol L⁻¹, ácido fosfórico 1 mol L⁻¹). Agitou e depois de 10 minutos foi lida em absorvância a 595 nm.

6.4.10. Atividade da PM H⁺-ATPase de Hidrólise de ATP

A atividade das PM H⁺-ATPases foi realizada de acordo com SANTOS et al, (2006) usando meio de reação composto de MOPS-BTP 30 mM (pH 6,5), MgSO₄ 5 mM, KCl 50 mM, Na₂MoO₄ 1 mM, 0,2 mL/L de Triton X-100, KNO₃ 50 mM, NaN₃ 1 mM e ATP 5 mM. Para cada amostra foi feito um branco usando vanadato 0,2 mM (inibidor da atividade das PM H⁺-ATPases). A reação foi iniciada com a adição de 1 µg de proteína no meio de reação, com incubação a temperatura constante de 30 °C. Após 1 hora de incubação foi adicionado a cada tubo 1 ml do meio de parada (2% v/v de H₂SO₄, 5% p/v de SDS, 0,7% p/v de (NH₄)₂MoO₄) e 50 µL de ácido Ascórbico 10% p/v. Após 10 minutos foi adicionado 1,45 mL do meio contendo citrato (4% de citrato de sódio e 2% ácido acético glacial) para evitar desenvolvimento adicional da coloração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 820 nm.

6.4.11. Atividade da H⁺-PPase de Hidrólise de ATP

A atividade das H⁺-PPases foi realizada de acordo com SANTOS et al, (2006). O meio de reação é composto de HEPES-BTP 30 mmoles L⁻¹ (pH 7,2), sorbitol 100 mmoles L⁻¹, MgSO₄ 5 mmoles L⁻¹, KCl 100 mmoles L⁻¹, 0,2 mL L⁻¹ de Triton X-100, NaN₃ 1 mmol L⁻¹ e PPI 1 mmol L⁻¹. A atividade da H⁺-PPase dependente de K⁺ foi calculada pela diferença entre a atividade observada na ausência e presença de 100 mmoles L⁻¹ de KCl no meio de reação. Uma solução de NaF a 2,5 mmoles L⁻¹ também foi usada em meio de reação separado para verificar o grau de inibição das H⁺-PPases.

6.4.12. Determinação da atividade de glutamina sintetase (GS)

A atividade foi realizada como descrito por FARDEN e ROBERTSEN (1980). A atividade foi realizada em 500 µL de uma solução contendo 50 mM de Imidazol-HCl pH 7,5, 5 mM de hidroxilamina neutralizada com Tris, 20 mM de MgCl₂, 25 mM de L-glutamato, 5 mM de β-mercaptoetanol e 5 mM de ATP. O controle da reação foi realizado sem a adição de ATP no meio de reação. A reação foi iniciada pela adição de 50 µg de proteína já incluídos nos 500 µL da reação e conduzida a 30°C durante 30 min. A reação foi paralizada pela adição de 350µL de uma solução composta por 4% (p/v) de ácido tricloroacético – TCA e 3,2% (p/v) de cloreto férrico anidro – FeCl₃ preparada em HCl 0,5N. O γ-glutamil hidroxamato (GHD) foi colorimetricamente determinado em λ=540 nm.

6.4.13. Determinação da atividade da isocitrato desidrogenase NADP⁺-dependente

A atividade da Isocitrato Desidrogenase NADP⁺-dependente foi realizada como descrito por SCHIAVON et al, (2008). A atividade foi determinada em 500µL de uma solução contendo 88mM de Imidazol-HCl pH 8,0, 3,5mM de MgCl₂, 0,41 mM de NADP⁺ (adicionado na hora do ensaio), 0,55mM de isocitrato de sódio e 50µg de proteína. A reação foi disparada com a adição da proteína e uma cinética foi realizada a cada 10 segundos durante dois minutos. A atividade foi expressa pela taxa de acréscimo da densidade ótica a 340nm pelo tempo.

6.4.14. Avaliação da expressão gênica da PM H⁺-ATPase (Osa1 a OsA8) e transportadores de nitrato (OsNRT2.1 e OsNRT2.2 e NAR2.1)

a) Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído segundo GAO et al, (2001) utilizando tampão NTES (0,2 M Tris-Cl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 2% SDS). Amostras de parte aérea e raiz foram maceradas em N₂ líquido e homogeneizadas em uma mistura contendo 4,5 ml de tampão NTES e 3 ml de solução fenol:clorofórmio (1:1). Após centrifugação a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de 2 M acetato de sódio pH 4,8 (NaOAc_{DEPC}) e 1 volume de isopropanol puro gelado. A seguir a mistura foi mantida a -20 °C por 2 horas seguida de centrifugação a 12,000 x g por 10 min. O precipitado foi solubilizado em 2,5 mL de H₂O_{DEPC} e precipitado novamente pela adição de 2,5 mL de 4 M cloreto de lítio pH 4,8 (LiCl_{DEPC}). Após centrifugação a 12,000g por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 0,1 mL de H₂O_{DEPC}.

A qualidade do RNA extraído foi verificada espectrofotometricamente por meio das relações A₂₆₀/A₂₃₀ e A₂₆₀/A₂₈₀ e visualização em gel de agarose (1%) com brometo de etídio. As amostras de RNA total utilizadas nas reações de síntese do cDNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A fita simples de cDNA foi sintetizada utilizando a “TaqMan Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystems) e primer oligodT de acordo com as recomendações do fabricante.

b) PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o kit “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dez minutos a 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto e finalmente a “curva de melting” com aumento de temperatura de 0,3°C de 60°C até 95°C para verificar a especificidade da reação. Os genes de referência utilizados para o cálculo da expressão gênica relativa foram o da actina e do fator de alongamento 1- α de arroz (*eEF1- α*) (Jain et al., 2006) (Tabela 11).

Tabela 10. Sequências dos “primers” (“forward e reverse”) usados nas reações de PCR em tempo real para as isoformas de PM H⁺-ATPases (*OsA1* a *OsA8*) desenhados por Sperandio (2011) e três isoformas de transportadores de nitrato (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*). A actina (*OsAct11*) e o fator de alongamento 1- α (*eEF-1 α*) de arroz e respectivos acessos nos bancos de dados TIGR e NCBI.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Acesso NCBI
<i>OsA1</i>	5'-TGGGCACATGCACATAGGA-3'	5'-GCTCACTGTAGCCGGTCTTCTC-3'	NM_001057482.1
<i>OsA2</i>	5'-GCAGAAGAGGCCCGTAGGA-3'	5'-CAGGGTGGTCAGCTCTCTCAA-3'	NM_001065628.1
<i>OsA3</i>	5'-AATTCTGCAATCACCTACGTGACTT-3'	5'-GCTGGAGCAGGAGGGACAA-3'	NM_001073914.1
<i>OsA4</i>	5'-CGTCGAGTCGGTGGTCAAG-3'	5'-CGGTGTAGTGGTTCTGGATGGT-3'	NM_001061721.1
<i>OsA5</i>	5'-CGGCGTCATCTGGCTCTAC-3'	5'-GACGGCGAACTTGAAGATGTC-3'	NM_001067873.1
<i>OsA7</i>	5'-TCGACACGATCCAGCAGAAC-3'	5'-GCTGATGACGATCTCTCGTTGA-3'	NM_001060653.1
<i>OsA8</i>	5'-TGTTTAACCTACAACACGACAATGC-3'	5'-AATGGGATGGGAAAGGAAAATAC-3'	NM_001055182.1
<i>OsNRT2.1</i>	5'-GCGACCGAGACCAGCAATAC-3'	5'-TTCATCACCGTTGCAACAAG-3'	NM_001052193.1
<i>OsNRT2.2</i>	5'-GCCGGAGCACGCCTAAT-3'	5'-AAACGGTAACAAAACGTTCAACAG-3'	NM_001052194.1
<i>OsNAR2.1</i>	5'-AAGACGCAGGTGTTCTCTCC-3'	5'-ACTTCACCGTGCTGGGC-3'	NM_001053852.2
<i>OsAct11</i>	5'-TTATGGTTGGGATGGGACA-3'	5'-AGCACGGCTTGAATAGCG-3'	NM_197297
<i>eEF-1α</i>	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'	5'-GACTTCCTTACGATTTTCATCGTAA-3'	AK061464

6.4.15. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com tres repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), através do teste F e os resultados foram submetidos ao teste de médias utilizando Tukey a 5% de probabilidade (NETER & WASSERMAN, 1974), e barras de erro padrão (CUMMING et al., 2007). O teste de Lilliefors e Cochran foi realizado para testar a normalidade e homocedasticidade dos erros, respectivamente (NETER & WASSERMAN, 1974; STEEL & TORRIE, 1995). Foi realizada ainda, análise de correlação de Pearson. A ordenação dos dados foi realizada pela análise de componentes principais e o agrupamento por meio de *hetmaps*. As análises foram realizadas utilizando o software R.

6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1. Variações de pH e NO_3^- na solução nutritiva

As variações de pH na solução nutritiva, nas plantas de arroz supridas com NO_3^- na doses de $0,2 \text{ mM}$ de N L^{-1} com e sem a aplicação de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk) são mostrados na Figura 22 e apresentam um comportamento quadrático em dois momentos, do início às 2h e das 2 às 9h (Figura 22).

Para a concentração de $0,2 \text{ mM}$ de N , a absorção de NO_3^- aumentou o pH, a amplitude dessa variação foi menor para as plantas pré-tratadas com AHk. Entretanto aquelas tratadas com AHa apresentaram o mesmo comportamento do controle, separando-se a partir de 1,5h caindo o pH até às 2h, quando acaba NO_3^- na solução, voltando a alcalinizar das 4 às 7h e volta a cair novamente. Comportamento similar de alcalinização para $0,2 \text{ mM}$ de N-NO_3^- foi observado por Santos et al. (2011), em estudo avaliando os parâmetros cinéticos de absorção de NO_3^- sob $0,2 \text{ mM}$. A absorção de NO_3^- ocorre em simporte com dois prótons ($\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$), promovendo a alcalinização da solução nutritiva (MILLER & SMITH, 1996; LU & BRISKIN, 1993; SANTOS et al., 2011) o que ocorreu em todos os tratamentos.

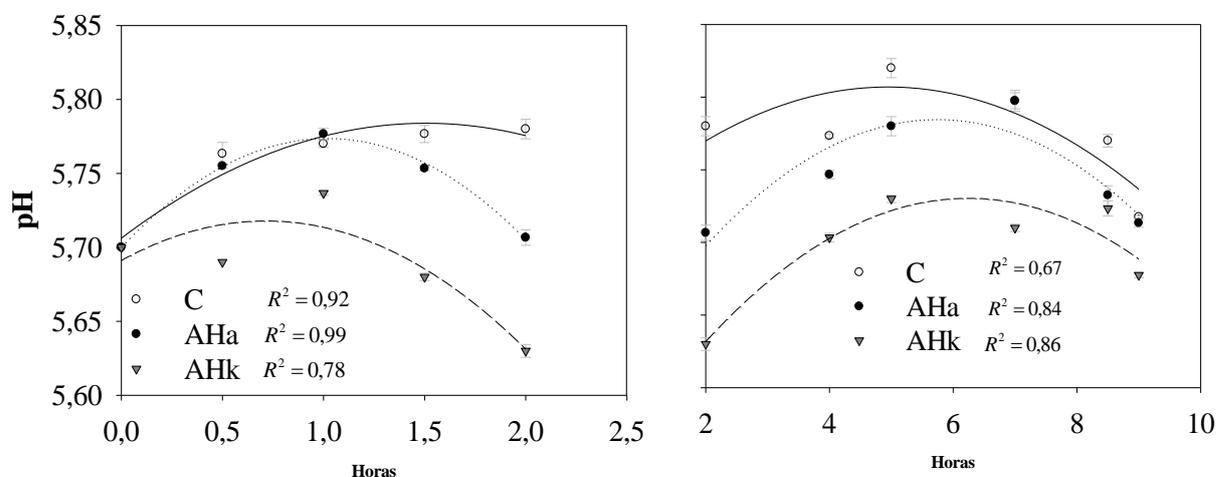


Figura 22. Curso-tempo do pH na solução nutritiva, quando as plantas de arroz foram ressupridas com N-NO_3^- numa concentração inicial de $0,2 \text{ mM}$ de N L^{-1} . O pre-tratamento foi sem (C) e com adição de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk).

A influência na extrusão de prótons e consequente acidificação do meio de cultivo com AH tem sido relatada em estudos com raízes transgênicas de manjericão e trevo (LIMA, 2008) e em plantas inteiras (PINTON et al, 1998; CANELLAS et al, 2008; ZANDONADI et al., 2010). Levando-se em conta que o valor de pH medido na solução somente registra a quantidade de H^+ livres, sugere-se então que este ligeiro deslocamento no pH para uma faixa menos alcalina em relação ao controle, responde a uma condição adquirida pelas plantas no tratamento prévio com os AH. Uma possível explicação para isso pode ser o efeito tamponante dos AH devido a capacidade de troca eletrônica dos AH (CANELLAS et al., 2008), ou por causa da associação entre fragmentos húmicos dos AH nas raízes das plantas (PINTON et al., 2009; GARCÍA et al., 2012; 2014). Essas interações têm sido confirmadas tanto com biomembranas (OJWANG' E COOK, 2013) quanto com plantas (ASHLI E NEUMMAN, 2010). Além disso, a caracterização mediante ^{13}C RMN mostra que estes fragmentos recuperados das raízes, são enriquecidos em estruturas oxigenadas (GARCÍA et al., 2012; 2014). Neste sentido, a extrusão de H^+ pelas raízes

das plantas tanto pela ação dos AH quanto na geração dos mecanismos de absorção de N, como observado na depleção de N-NO₃⁻ da figura 23 em que parece haver mais rápida absorção pelas plantas pré-tratadas com AHa, os quais podem estar participando da protonação das estruturas húmicas associadas às raízes.

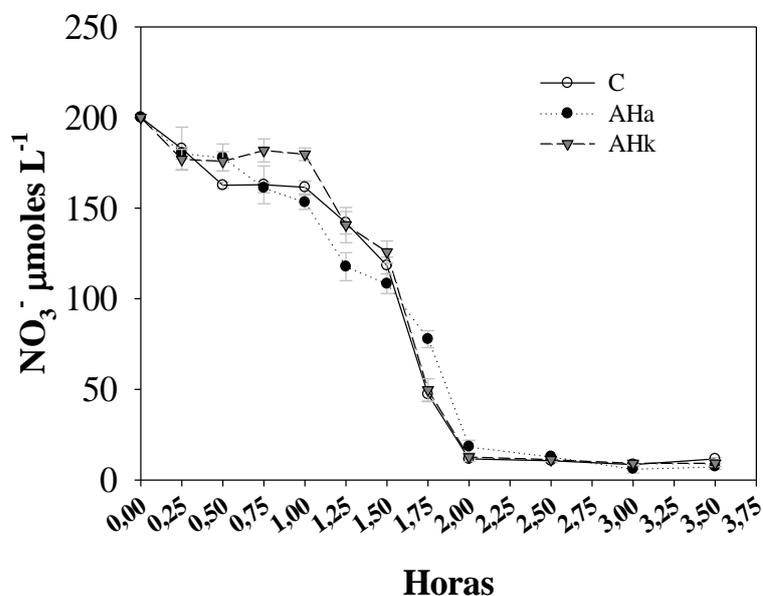


Figura 23. Depleção de NO₃⁻ numa concentração inicial de 0,2 mM de N L⁻¹ na solução nutritiva com a variedade de arroz Piauí, em função do tempo. As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk), e ressupidadas com 0,2 mM de NO₃⁻. Barras representam o erro padrão das médias.

6.5.2. Massa fresca das plantas de arroz

Com respeito à massa fresca, as plantas apresentaram maior peso fresco de raiz, parte aérea e R/PA quando pré-tratadas com AHa e posteriormente conduzidas na solução contendo 0,2 mM de NO₃⁻ às 6h (Figura 24 a, b, c). Entretanto, o peso fresco de raiz bem como R/PA quando pré-tratadas com AHk foi menor às 6h de ressuprimento com 0,2 mM de NO₃⁻. Não havendo diferenças entre os tratamentos às 9 e 24h.

O comportamento geral de crescimento radicular foi muito parecido aos encontrado em arabidopsis por TREVISAN et al. (2009) ao acompanhar o crescimento no tempo e Mora et al. (2010) sobre a taxa de crescimento relativo da parte aérea das plantas de pepinno.

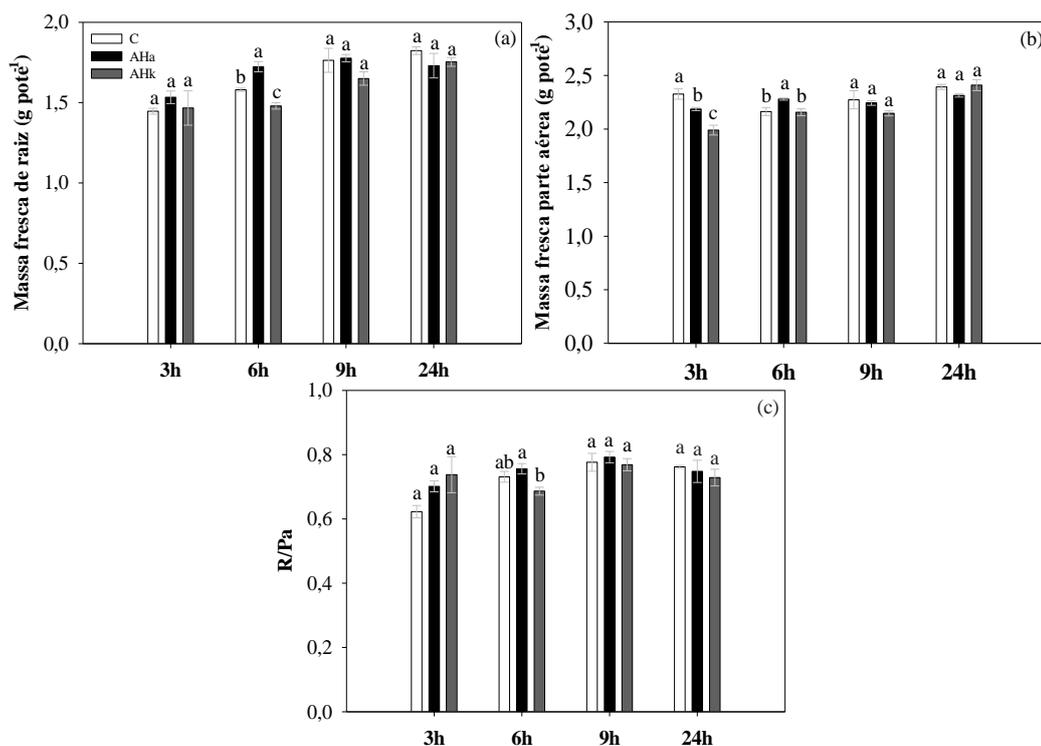


Figura 24. Massa fresca de raiz (a), parte aérea (b) e r/pa (c), da variedade de arroz Piauí. As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk). As plantas foram coletadas às 3, 6, 9 e 24 horas após o ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻.

6.5.3. Metabolitos nitrogenados nas plantas

Em relação aos metabolitos nitrogenados das plantas de arroz da variedade Piauí (Figura 25), foi observado os maiores teores de NO₃⁻ às 6h após ressuprimento com 0,2 mM NO₃⁻. Já os teores de NH₄⁺ foram maiores às 3h após ressuprimento. Entretanto para amino e açúcares solúveis não apresentaram um momento de maiores acúmulos ao longo do tempo.

Em relação aos tratamentos, o teor de NO₃⁻ (Figura 25a) nas plantas apresentaram maiores teore no controle a partir das 9h, sendo menor para as pré-tratadas com AHa que se mantiveram mais baixo das 9h até as 24h em relação aos outros tratamentos.

Para o teor de NH₄⁺ na raiz (Figura 25b), as plantas apresentaram efeitos significativos a partir das 6h sendo maior para as plantas pré-tratadas com AHk e menor para as controle. Por outro lado, as plantas apresentaram maiores teores no controle às 9h e menor para as pré-tratadas com AHa e KOH. Mantendo-se iguais às 24h.

Para o teor de amino-N (Figura 25c), as plantas controle, apresentaram maior teor às 9h e menor para as pré-tratadas com AHa e KOH que se mantiveram mais baixo até as 24h.

Para o teor de açúcares solúveis (Figura 4d), as plantas apresentaram a partir das 3h, maior teor quando pré-tratadas com AHa e menor para as controle e pré-tratadas com AHk. Não houveram diferenças para as demais coletas.

Embora em outros estudos mostrem que, para haver efeitos estimulatórios de substâncias húmicas de baixo peso molecular sobre a absorção de N-NO₃⁻ precisou de longos períodos de incubação (Albuzio et al., 1986). Por outro lado, também há relatos na literatura de períodos curtos de incubação para manifestação de efeitos estimulatórios sobre a absorção de N-NO₃⁻ (PINTON et al., 1999; QUAGGIOTTI et al., 2004).

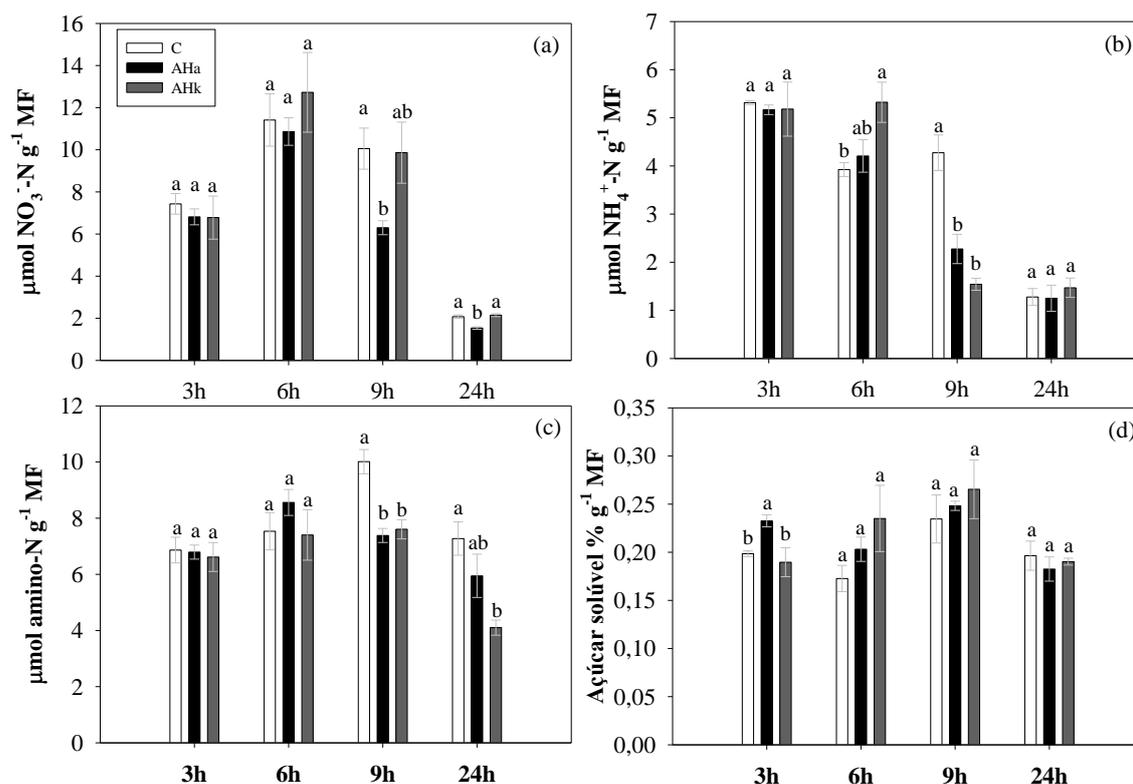


Figura 25. Teor de N-NO_3^- (a), N-NH_4^+ (b), N-amino (c) e açúcar solúvel (c) em raiz de plântulas de arroz Piauí. As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com adição de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk), e ressupridas com 0,2 mM de NO_3^- . Coletadas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de NO_3^- .

6.5.4. Atividade da enzima glutamina sintetase e isocitrato desidrogenase

A atividade da enzima glutamina sintetase (GS) foi crescente até as 9h e apresenta queda a partir das 24h (Figura 26 a). Já a atividade da isocitrato desidrogenase (IDH) foi crescente até as 24h (Figura 26 b).

Em relação aos tratamentos a atividade da GS foi significativamente maior para as plantas pré-tratadas com AHa à partir das 3h, 6h e 24h (Figura 26 a). A menor atividade ocorreu quando pré-tratadas com AHk às 3h e 24h.

Além disso, a atividade da IDH, foi maior para as plantas com AHa às 3 e 6h e nas controle às 9h. Sendo menor para as pré-tratadas com KOH nesses tempos (Figura 26 b). Por outro lado, esse comportamento se inverteu às 24h, passando a ser maior para as pré-tratadas com KOH seguido de AHa.

O teor de proteína das plantas foi significativamente maior às 6h, para as plantas pré-tratadas com AHa (Figura 26 c), e maior para as plantas controle às 9h, seguida da pré-tratadas com AHa e KOH.

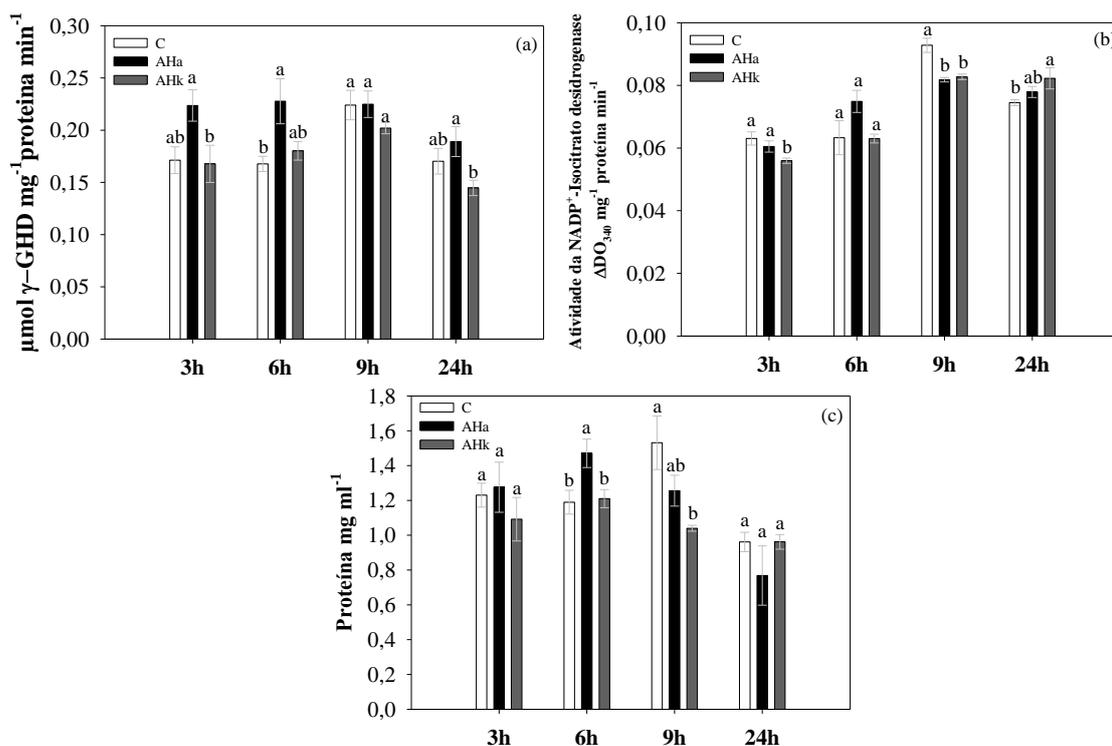


Figura 26. Atividade de Glutamina sintetase (GS) (a), isocitrato desidrogenase NADP⁺-dependente (IDH) (b) e proteínas totais (c), das raízes de plântulas de arroz var. Piauí. As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk). Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o ressuprimento com 0,2 mM de NO₃⁻.

Segundo Chen & Gadal (1990), citrato pode ser exportado da mitocôndria para o citosol sofrendo ação da aconitase e da (ICDH) do citosol formando o (2-OG), que é utilizado para a assimilação de amônio. Dessa forma há um direcionamento de esqueletos de carbono para a assimilação do amônio formado a partir da redução do NO₃⁻. O amônio é inicialmente incorporado em glutamato, por meio da GS, formando glutamina (SOUZA & FERNANDES, 2006).

A SH induz o metabolismo do carbono e do nitrogênio aumentando a atividade das enzimas da glicólise, do ciclo de Krebs e da assimilação de N (MUSCOLO et al., 2007; NARDI et al., 2005, 2007, 2009; QUAGGIOTTI et al., 2004). Em estudo sobre a absorção e assimilação de nitrato em plântulas de cevada incubadas com SH, a atividade da nitrato redutase (NR), glutamato desidrogenase (GDH) e glutamina sintetase (GS) foram estimulados, junto com a taxa de absorção de nitrato (ALBUZIO et al., 1986). Em outro estudo, a atividade de GS, GDH e malato desidrogenase (MDH) também foram estimulados por fração de ácidos húmicos de baixo peso molecular, sobre suspensões de células de cenoura (MUSCOLO et al., 1999, 2013). Ácido húmico solúvel em água com pequena massa molecular, também aumentou a atividade da GDH, GS e MDH (NARDI et al., 1991; MUSCOLO et al., 1999, 2013). Levando ao aumento na quantidade de metionina, treonina, isoleucina e lisina, aminoácidos derivados da via do oxaloacetato (esqueleto de carbono). Os autores verificaram que SHs mais hidrofílicas e menos complexas estruturalmente aumentam a atividade bioquímica das plantas de milho, especialmente sobre as enzimas envolvidas na assimilação de N, como GS/GOGAT e AspAT (NARDI et al., 2007; VACCARO et al., 2009). No presente estudo confirmamos o estímulo

dos AHs sobre a atividade da GS e sobre a IDH, sendo mais acelerado quanto tratado com AHa e mais tardia para AHk.

6.5.5. Atividade das bombas de prótons (PM H⁺-ATPases e H⁺-PPases) nas raízes de arroz

A atividade da PM H⁺-ATPase, pirofosfatases totais (H⁺-PPase), H⁺-PPase dependente de K (depK) e H⁺-PPase independente de K (idK) em nosso estudo, foram crescentes até as 9h e apresenta queda às 24h em todas as condições (Figura 27). Em relação aos tratamentos, a atividade da PM H⁺-ATPase foi significativamente maior para as plantas no tratamento controle a partir das 3, 6 e 9h (Figura 27a). Sendo menor para as plantas pré-tratadas com AHk às 6 e 24h.

Neste caso é possível observar que, somente a adição N-NO₃⁻ promove uma atividade maior das PM H⁺-ATPase do que aquelas pre-tratadas com AHs. Embora, em estudo de Lima et al. (2008) foi observado maior estímulo das raízes transgênicas submetidas ao AH e aplicação de N-NO₃⁻. Ensaio *in vivo*, com plântulas de milho tratadas com substâncias húmicas extraídas com água, a partir de turfas, mostraram estímulo da atividade da PM-H⁺-ATPase (PINTON et al., 1999). Embora, NARDI et al. (2000) tenham observado inibição da PM-H⁺-ATPase, nas frações microsômicas de raízes de milho quando submetidas a substâncias húmicas de baixo peso molecular extraídas de um solo de clima temperado. Essa discrepância foi relacionada às diferenças encontradas nas concentrações e na natureza química das substâncias húmicas usadas.

Por outro lado, a atividade das H⁺-PPases totais foi significativamente maior para as plantas pré-tratadas com AHa às 6h e 24h (Figura 27b). Entretanto, às 24h a atividade das H⁺-PPases totais foi significativamente menor para as plantas controle. Resultado similar ao encontrado em plantas de arroz da variedade Piuai, a qual apresentou altos níveis de atividade das H⁺-PPases totais na raiz após 48 h de privação de N-NO₃⁻, em relação à variedade IAC-47 que é responsiva a aplicação de fertilizantes (SANTOS et al., 2009). Houve aumentos da atividade das H⁺-PPases ainda que baixa em relação as PM H⁺-ATPase nas raízes de manjeriço e trevo e nos dois períodos de avaliação, aos 6 e 9 dias (LIMA 2008).

Entretanto, neste estudo, foi avaliado a atividade das H⁺-PPases dependentes de K⁺, que apresentaram efeitos significativos às 6h após ressurgimento com 0,2 mM N-NO₃⁻, sendo maior para as plantas pré-tratadas com AHa seguido das pré-tratadas com AHk e controle (Figura 27c). Além disso, também foi avaliado a atividade das H⁺-PPases independentes de K⁺, as quais também apresentaram efeitos significativos, às 6h (Figura 27d), sendo maior para as plantas pré-tratadas com AHa seguido das pré-tratadas com AHk e controle. Embora tendo maior atividade para as plantas pré-tratadas com AHa e controle às 24h.

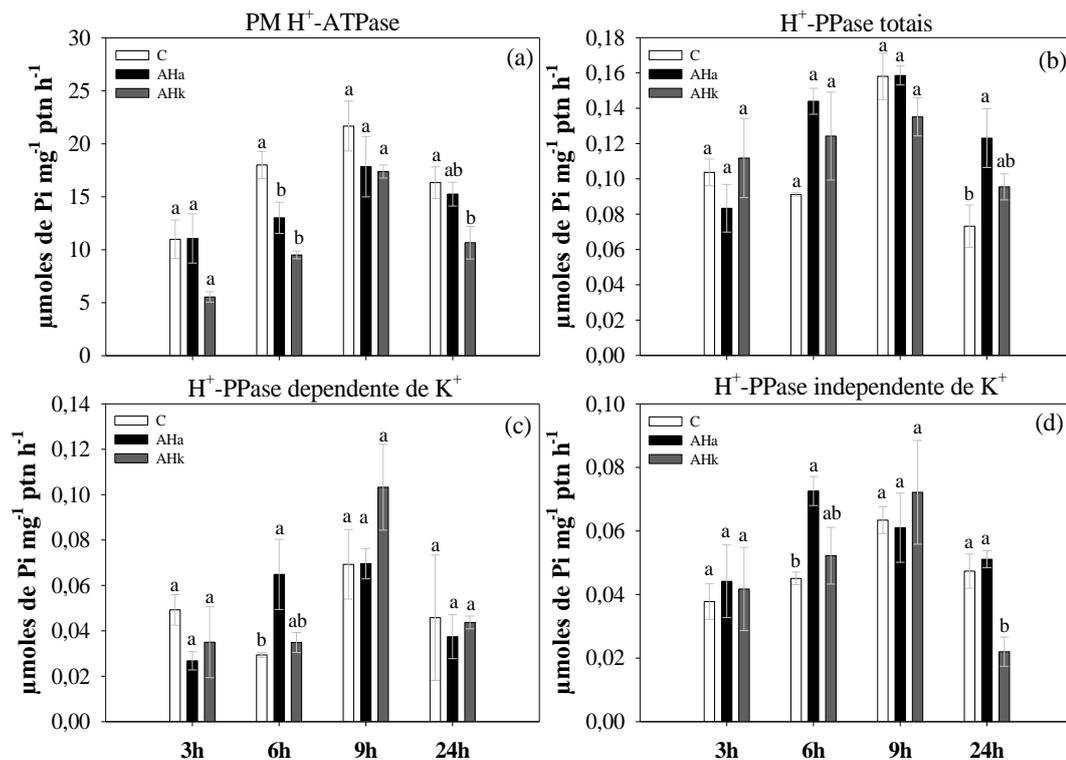


Figura 27. Atividade das PM H^+ -ATPases (a) e H^+ -PPases totais (b), H^+ -PPase dependente de K^+ (c), e H^+ -PPase independente de K^+ (d), das raízes de plantas de arroz (var. Piauí). As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com adição de ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk). Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o ressurgimento com 0,2 mM de NO_3^- . As mesmas letras que seguem dados para os tratamentos não diferem significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$). Barras são desvios padrão.

A membrana plasmática é uma barreira celular extremamente importante, pois separa o conteúdo celular do ambiente circundante. Os nutrientes minerais que são essenciais para o crescimento devem passar pela membrana plasmática (MP) para alcançar o interior da célula, e outros íons e metabólitos têm que deixar a célula na mesma barreira. Na natureza, bombas biológicas catalisam o transporte ativo de matéria de um compartimento para outro (PALMGREN et al., 2011).

A membrana plasmática separa o conteúdo celular do ambiente circundante. Os nutrientes devem entrar através da membrana plasmática para atingir o interior da célula, e metabólitos tóxicos e vários íons saem da célula viajando pela mesma barreira. As bombas biológicas na membrana plasmática incluem transportadores ABC, bombas H^+ -vacuolares (tipo V) e bombas do tipo P. Todas essas bombas utilizam o ATP como combustível para energizar o bombeamento. A função fisiológica das bombas do tipo P da membrana plasmática, representa a principal atividade hidrolítica do ATP nessa membrana. Bombas do tipo P são transportadores de cátions que derivam seu nome do fato de que eles são fosforilados durante o ciclo catalítico (PEDERSEN e CARAFOLI, 1987, PALMGREN et al., 2011). Este evento de fosforilação ocorre durante cada ciclo catalítico e resulta em uma mudança conformacional da bomba, que é necessária para a função de transporte (MØLLER et al. 1996). Posteriormente, a bomba é desfosforilada, novamente por um processo autocatalítico, e retorna à sua conformação original. Bombas do tipo P também estão localizadas no cloroplasto (metais pesados, tipo P1B) e no vacúolo (Ca^{2+} , tipo P2). Ao longo da via secretora (retículo endoplasmático e golgi), várias

outras ATPases do tipo P podem ser encontradas, incluindo P2, P3, P4 e P5 (PALMGREN et al., 2011).

Com relação ao estímulo por SHs Varanini et al., (1993); Pinton et al., (1997) e Pinton et al., (1999) encontraram maior atividade das H⁺-ATPases às 4h, em vesículas microsossomais *in vitro* ou quando as plântulas de milho foram tratadas com AH e NO₃⁻ na mesma solução de cultivo e às 12h nas plantas somente com NO₃⁻, houve posterior redução às 24h em todos os tratamentos. Alguns estudos encontraram um padrão de ativação das H⁺-ATPases altamente correlacionadas com o desenvolvimento e crescimento radicular (CANELLAS et al, 2010; BALDOTO et al, 2010; ZANDONADI et al., 2007). Vários estudos sugerem que a força que dirige a absorção de NO₃⁻ é fornecido pelas bombas de prótons, como as H⁺-ATPases (SANTI et al., 1995, 2003; SORGONA et al., 2011). Segundo Sperandio (2011) o período de deficiência de N por um período de três dias no experimento com NO₃⁻ também resultou em maiores atividades das PM H⁺-ATPases, sugerindo a participação destas bombas de prótons no fluxo interno do NO₃⁻ oriundo do processo de remobilização. Aliado a isso, Sondergaard et al. (2004) sugerem que a energia necessária para a redistribuição dos nutrientes no interior da planta, é fornecida pelas PM H⁺-ATPases.

Entretanto, as H⁺-PPases, localizam-se nas membranas vacuolar, de Golgi e plasmática (CLELAND 1995; BALTSCHIEFFSKY et al. 1999; RATAJCZAK et al. 1999; DROZDOWICZ et al. 2000; JIANG et al. 2001; MITSUDA et al. 2001). As plantas possuem dois tipos filogeneticamente distintos de H⁺-PPases: tipo I e tipo II. As H⁺-PPases do tipo I dependem do K⁺ citosólico para a sua atividade e são moderadamente sensíveis à inibição pelo Ca²⁺, e as H⁺-PPases do tipo II são sensíveis ao K⁺, mas extremamente sensíveis ao Ca²⁺ (FUGLSANG et al., 2011).

A planta modelo *A. thaliana* possui um gene que codifica para uma H⁺-PPase tipo I (*AVP1*) e outro gene que codifica para uma H⁺-PPase tipo II (*AVP2*) (SARAFIAN et al., 1992; DROZDOWICZ et al. 2000). H⁺-PPases Tipo I se mostram com capacidade para acidificar o vacúolo da planta. O H⁺ resultante e o gradiente eletroquímico são os mecanismos para o armazenamento de sacarose, ácidos orgânicos, regulação da pressão hidrostática através do armazenamento de íons inorgânicos e desintoxicação citoplasmática (MAESHIMA 2001; FUGLSANG et al., 2011).

A pirofosfatase protônica (H⁺-PPases) é uma bomba de prótons dirigida por PPi que participa da homeostase celular do PPi (FERJANI et al., 2011, PIZZIO et al., 2015). Presente no reino vegetal, essa proteína é altamente conservada evolutivamente (SEUFFERHELD et al., 2011) pode usar a energia derivada da hidrólise do PPi para bombear prótons através das membranas (MAESHIMA e YOSHIDA, 1989, MAESHIMA, 2000; FUGLSANG et al., 2011) ou sob um gradiente de próton favorável, trabalha reversivelmente para sintetizar PPi (FAÇANHA e DE MEIS, 1998).

O sequestro vacuolar de sódio é um mecanismo conservado usado por espécies vegetais tolerantes ao sal. Superexpressão do tipo I H⁺-PPase *AVP1* em *Arabidopsis* resultou em plantas com maior tolerância a salinidade e resistência à seca (GAXIOLA et al. 2001). A superexpressão deste e de outros genes de plantas que codificam para uma H⁺-PPase tipo I pode aumentar tanto a tolerância ao sal quanto à seca em sistemas heterólogos, incluindo o arroz (ZHAO et al. 2006) e milho (LI et al. 2008).

A H⁺-PPase do tipo II de *Arabidopsis*, localizam-se exclusivamente no Aparelho de Golgi sendo sugerido que a H⁺-PPase tipo II pode ser necessário durante a expansão celular (MITSUDA et al., 2001). Supostamente a H⁺-PPase tipo II pode auxiliar a V-ATPase residente no Aparelho de Golgi na geração do ambiente ácido sob condições em que a disponibilidade de ATP esteja comprometida (FUGLSANG et al., 2011).

O gene *ZmGPP* (tipo *AVP2*, supostamente codificando para H⁺-PPase tipo II em milho) quando é superexpressa, tanto na parte aérea como na raiz de plântulas de milho sob

desidratação, frio e estresse salino, sugere que *ZmGPP* poderia desempenhar um papel importante na tolerância ao estresse abiótico em *Z. mays* (YUE et al. 2008). Além disso, as H⁺-PPases são freqüentemente denominadas como bombas de prótons auxiliares às V-H⁺-ATPases quando o suprimento energético das células está baixo. Neste estudo foi observado estímulos dos AHs sobre as PM H⁺-ATPases bem como as H⁺-PPases totais, H⁺-PPase tipo I e H⁺-PPase tipo II.

6.5.6. Expressão relativa das isoformas de PM H⁺-ATPases

As análises de PCR em tempo real mostraram que as isoformas de PM H⁺-ATPases foram reguladas pelo pre-tratamento com AH e ressuprimento de 0,2 mM de NO₃⁻ após 72 de privação de N (Figura 28). Apresentaram forte indução às 3h com posterior repressão ao longo do período de avaliação até as 9h, voltando a ser induzidas às 24h (Figura 28). As isoformas *OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* foram induzidas de maneira distinta nas raízes quando houve pre-tratamento tanto com AHa e AHk, e posterior ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻.

Com respeito aos tratamentos, o gene *OsA1* foi induzida 1,4 vezes com o pre-tratamento AHa às 3h e reprimido às 6h (Figura 28a). Entretanto aumentou cerca de 2,0 vezes com o pre-tratamento AHk às 24h.

A isoforma *OsA2*, foi significativamente induzido pelo pre-tratamento com AHa e controle às 3h (Figura 28b) e reprimido às 6h e 9h em todos os tratamentos, voltando a ser induzido às 24h, especialmente para as plantas pré-tratadas com AHk.

A isoforma *OsA3*, foi significativamente induzido pelo pre-tratamento com AHa às 3h com cerca de 1,2 vezes (Figura 28c). Contudo, foi significativamente induzido pelo AHk cerca de 1,3 e 4,3 vezes às 6h e 24h, respectivamente.

A isoforma *OsA7*, foi significativamente induzido pelo pre-tratamento com AHa cerca de 1,4 e 1,5 vezes às 3 e 6h, respectivamente (Figura 28e), e induzido às 9 e 24h pelo pre-tratamento com AHk cerca de 1,4 vezes.

A isoforma *OsA8*, foi significativamente induzido pelo pre-tratamento com AHa às 3h (Figura 28f), e fortemente induzido pelo pre-tratamento com AHk cerca de doze vezes às 24h.

As plantas submetidas ao pre-tratamento com AHa, apresentaram maior indução das isoformas *OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA8* às 3h, e especialmente da isoforma *OsA7* às 3h e 9h. Segundo Sperandio et al, (2011) as isoformas *OsA2* e *OsA7* são as mais induzidas entre as isoformas de PM H⁺-ATPases na raiz das plantas de arroz numa condição de ressuprimento de NO₃⁻. Porém, as isoformas *OsA3* e *OsA4* podem ser reprimidas na deficiência de NO₃⁻ nas raízes. Entretanto, *OsA3* foi induzida tanto por AHa como por AHk (Figura 28c).

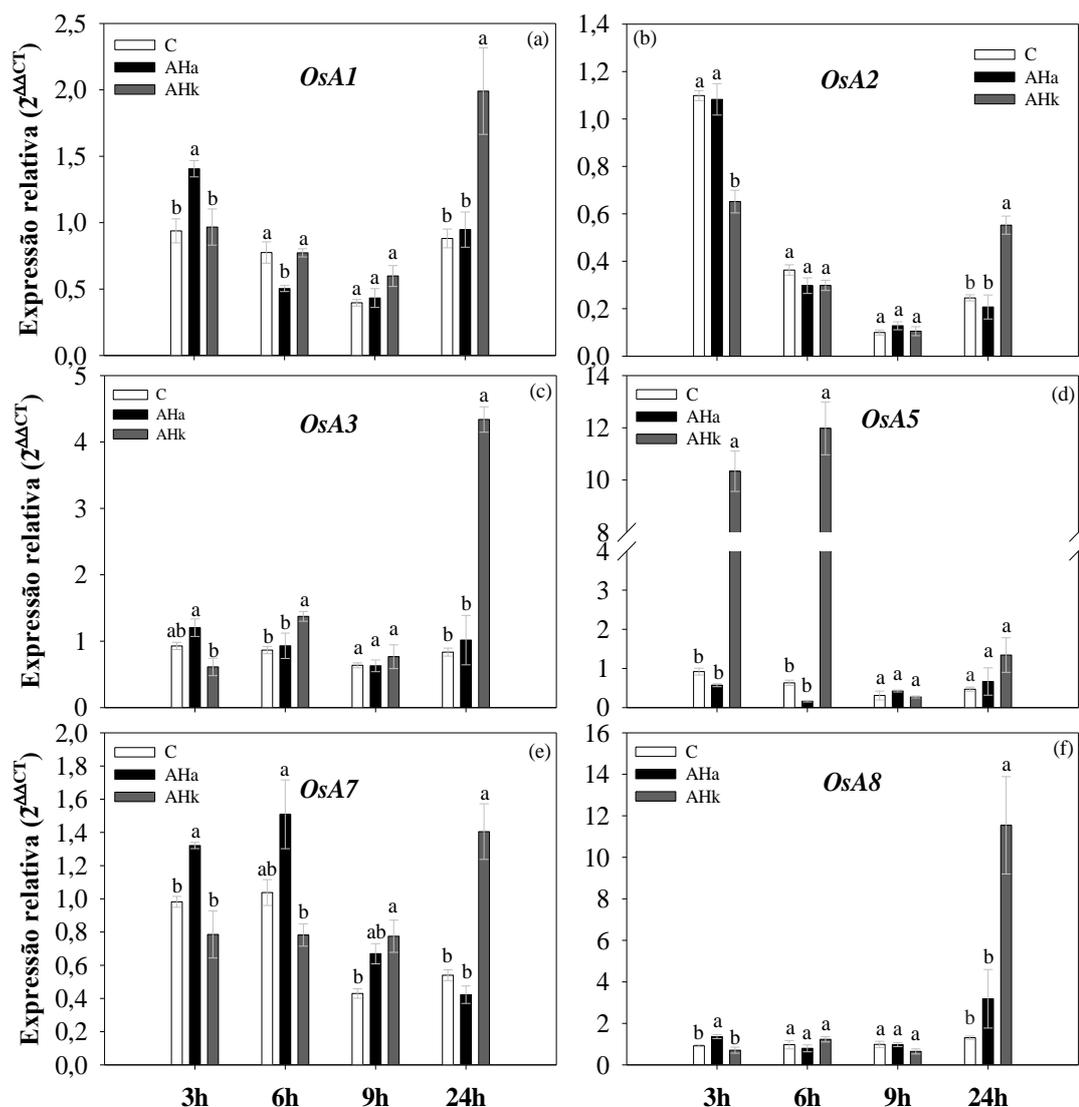


Figura 28. Expressão relativa das isoformas de PM H⁺-ATPases das raízes das plantas de arroz (var. Piauí). As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk). Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o ressurgimento de 0,2 mM NO₃⁻. Os tratamentos com letras diferentes diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, p<0,05). As barras representam média ± EP (erro padrão).

Por outro lado, foi observada repressão no pré-tratamento com AHk das isoformas *OsA2*, *OsA3* e *OsA7* às 3h, mas com indução crescente, com maiores níveis de indução às 24h (Figura 28) exceto para a isoforma *OsA5* que mostra as mais altas expressões com AHk, sendo superexpresso às 3h e 6h com 10 e 13 vezes de indução, respectivamente (Figura 28d). Curiosamente a isoforma *OsA5* foi reprimido com AHa às 3h e 6h.

Assim é interessante constatar que, o pré-tratamento com AHa promove induções das isoformas de PM H⁺-ATPase mais cedo, ou seja, nas primeiras horas da indução, e o pré-tratamento com AHk promove induções mais tardias ao final do período experimental (Figura 28).

6.5.7. Expressão relativa dos genes de transportadores de NO_3^- de alta afinidade e proteína acessória NAR

Os níveis de expressão relativa dos genes *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2*, e *OsNAR2.1* foram altos nas primeiras horas e foram reprimidos ao longo do período experimental (Figura 29).

O gene *OsNRT2.1* foi induzido pelo pre-tratamento com AHs, sendo maiores a partir das 3h e 9h nas plantas tratadas com AHa (Figura 29a), e maiores às 6h para as plantas pré-tratadas com AHk, não apresentando diferenças às 24h.

O gene *OsNRT2.2* foi induzido pelo pre-tratamento com AHa às 3h e quando pré-tratadas com AHk às 24h (Figura 29b).

Curiosamente o gene *OsNAR2.1* foi induzido pelo controle às 3h e 6h (Figura 29c), não apresentando diferenças nos períodos posteriores.

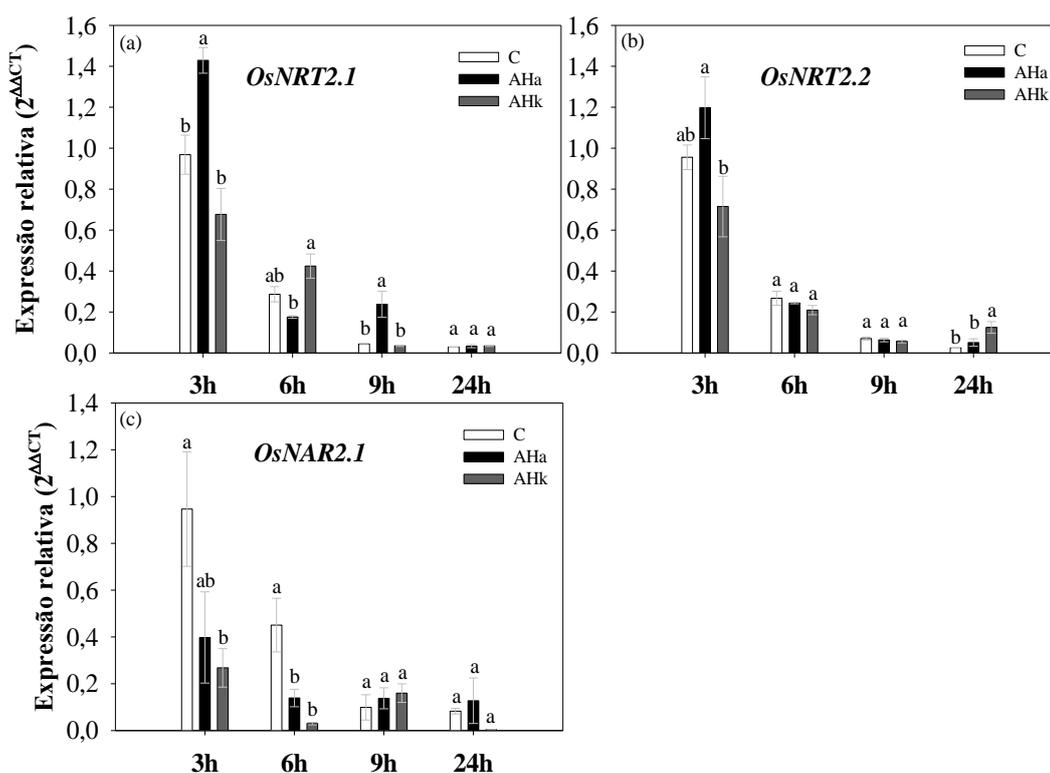


Figura 29. Expressão relativa dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade *OsNRT2.1* (a) e *OsNRT2.2* (b) e proteína NAR *OsNAR2.1* (c), nas raízes das plantas de arroz (var. Piauí). As plantas foram pré-tratadas por 48h sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk). Foram feitas coletas as 3, 6, 9 e 24 horas após o ressurgimento com 0,2 mM de NO_3^- . As barras representam média ± EP (erro padrão).

Foi realizada a análise de correlação de Pearson entre as variáveis para cada época de coleta, depois que as plantas foram pré-tratadas por 48h sem e com ácido húmico extraído com água (AHa) e KOH (AHk) no período de privação de N. Foram feitas coletas às 3h (Figura 30A), 6h (Figura 30B), 9h (Figura 30C) e 24h (Figura 30D) após o ressurgimento com 0,2 mM de NO_3^- .

Nas primeiras três horas, foi observado que as plantas apresentam altos e significativos coeficientes de correlação entre os níveis de expressão relativa dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e os valores de expressão das isoformas de PM H^+ -ATPases *OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA7* e *OsA8* (Figura 30A), o que sugere um envolvimento

conjunto e sincronizada dos transportadores de NO_3^- e PM H^+ -ATPase na captação de NO_3^- (SPERANDIO et al, 2014), bem como, relação entre o teor de açúcar e *OsA7* com *OsA8* ($r = 1,0^*$). Exceto o gene para proteína NAR *OsNAR2.1* e *OsA5* entre *OsNRT2.1* que apresentou $r = -0,7^*$. Contudo às 6h há correlação positiva entre os valores de expressão *OsNRT2.1*, *OsA5*, *OsA3* (Figura 30B). Às 9h há correlação positiva entre os valores de expressão *OsA5*, *OsA8* (Figura 30C).

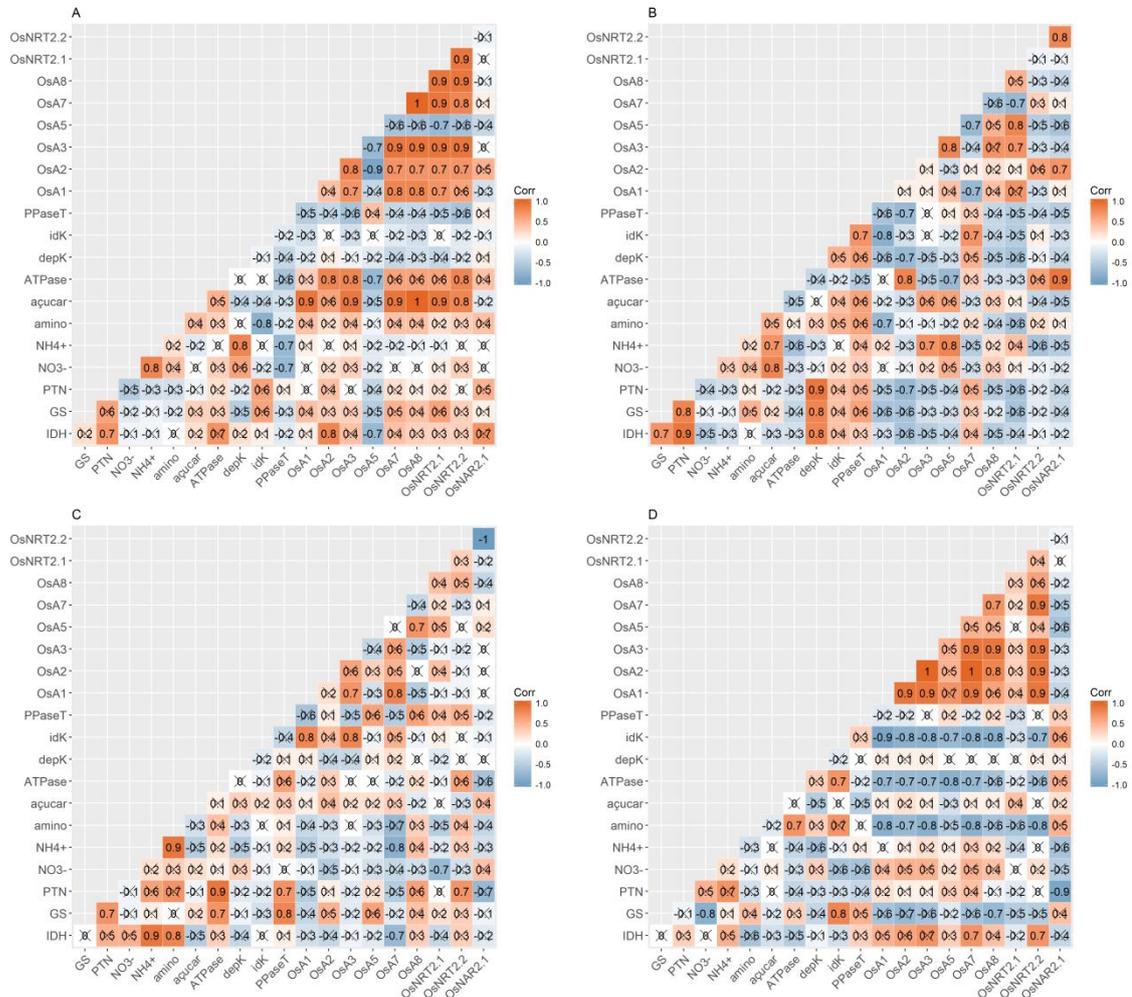


Figura 30. Matrix de correlação de Pearson da expressão relativa dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade e bombas de prótons, atividade enzimática e metabolitos das raízes das plantas de arroz (var. Piauí). Foram feitas coletas às 3h (A), 6h (B), 9h (C) e 24h (D) após o ressuprimento com 0,2 mM de NO_3^- .

Às 24h há correlação positiva entre os valores de expressão *OsNRT2.2*, *OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA7* e *OsA8* (Figura 30D). Embora existam altas relações entre *OsA2* com *OsA3* e *OsA7* ($r = 1,0^*$). Portanto as relações entre as variáveis são temporais, o que deve ser levado em consideração quando do estudo dessas associações.

A análise de componentes principais (ACP) das plantas pré-tratadas com AHa, AHk e controle, seguida do ressuprimento com 0,2 mM de N, às 3h explicou 63,1% da variabilidade total nas duas primeiras componentes (Figura 31A), às 6h explicou 64,1% (Figura 31B), às 9h explicou 47,6% (Figura 31C), e às 24h explicou 58,7% (Figura 31D) da variabilidade total, respectivamente.

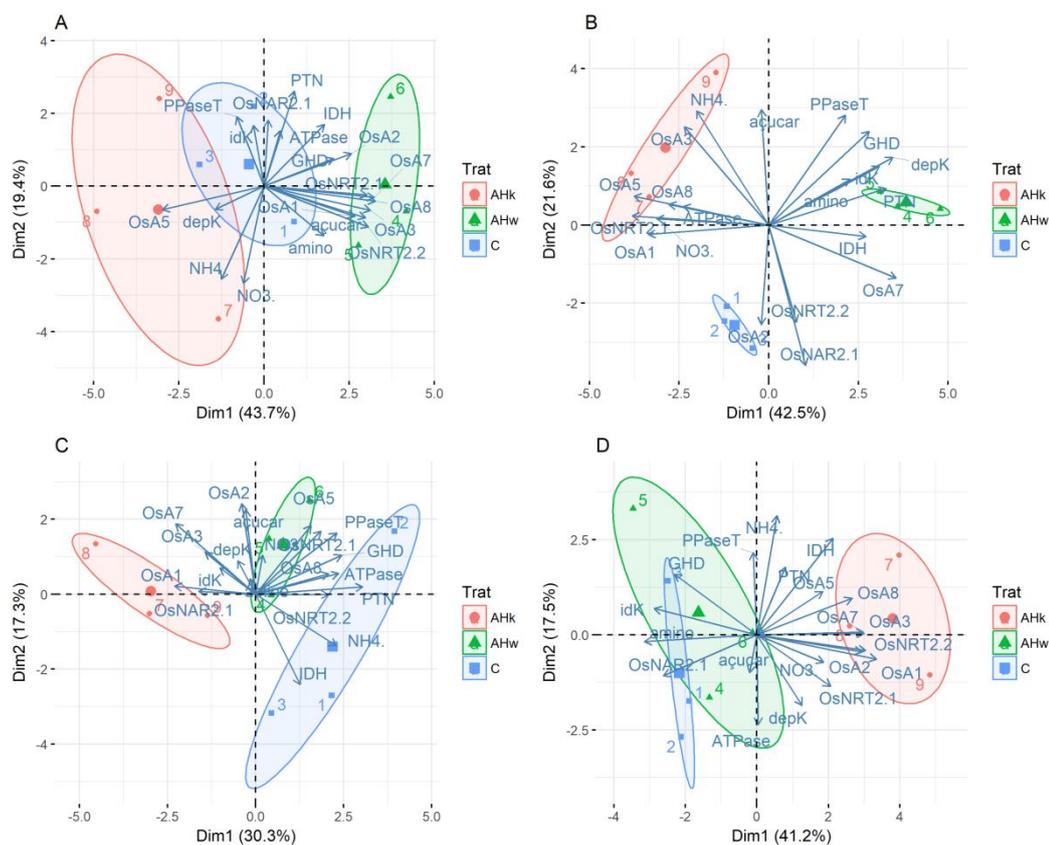


Figura 31. Análise de componentes principais da expressão relativa dos transportadores de NO₃⁻ de alta afinidade e bombas de prótons, atividade enzimática e metabolitos das raízes das plantas de arroz (var. Piauí). As plantas foram pré-tratadas sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHw) e KOH (AHk). Foram feitas coletas às 3h (A), 6h (B), 9h (C) e 24h (D) após o ressuprimento com 0,2 mM de NO₃⁻.

Com relação aos tratamentos, às 3h do ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ 43,7 % da variância estão explicados pela CP1 e 19,4 % explicados pela CP2 (Figura 31A). A CP1 separa em oposição as plantas pré-tratadas com AHa daquelas com AHk e controle, onde os carregamentos dos transcritos para PM H⁺-ATPases e transportadores de NO₃⁻ de alta afinidade, estão associados ao AHa. Em oposição, os teores de NH₄⁺ e NO₃⁻, PPaseT e *Osa5* da raiz, projetam-se negativamente na CP1 (Figura 31A) associados ao AHk.

Às 6h do ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻, a CP1 separa em oposição as plantas pré-tratadas com AHa das AHk e controle (Figura 31B). A CP1 (42,5 % da variância), são explicados pelas contribuições positivas da atividade das H⁺-PPases totais, H⁺-PPase dependente de K, e H⁺-PPase independente de K, GS, proteína total e transcrito de *Osa7* (Figura 31B). Em oposição, projetam-se negativamente na CP1 os carregamentos dos transcritos *Osa3* e *Osa5*, *OsNRT2.1* e o teor de NH₄⁺, associados ao AHk (Figura 31B). Por outro lado, 21,6 % da variabilidade são explicados pela CP2 (Figura 31B) com carregamento de transcrito *OsNRT2.2*, *OsNAR2.1* e *Osa2*, associadas às plantas controle. Portanto às 6h ocorre a separação dos três tratamentos utilizados neste estudo.

Às 9h do ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻, a CP1 separa em oposição as plantas pré-tratadas com AHk das controle e AHa. A CP1 explica 30,3 % da variância, são explicados pelas contribuições positivas da atividade das ATPases, H⁺-PPase totais, proteína total, GS, IDH, e transcrito de *OsNRT2.2* (Figura 31C) ligadas as plantas controle. Em oposição, projetam-se negativamente na CP1 os carregamentos dos transcritos *Osa1*, *Osa3* e *Osa7*,

OsNAR2.1, associados ao AHk (Figura 31C). Assim, às 9h, também se mantém a separação dos três tratamentos utilizados neste estudo.

Com relação às 24h do ressurgimento com 0,2 mM de N-NO_3^- 41,2 % da variância estão explicados pela CP1 e 17,5 % explicados pela CP2 (Figura 31D). A CP1 separa em oposição as plantas pré-tratadas com AHk daquelas com AHa e controle, onde os carregamentos dos transcritos para PM H^+ -ATPases e transportadores de NO_3^- de alta afinidade, estão associados ao AHk. Em oposição, projetam-se negativamente na CP1 os teores de N-amino, GS, *OsNAR2.1*, H^+ -PPase independente de K, (Figura 31D) associados as plantas controle e tratadas com AHa, os quais não se separaram neste período.

Os resultados obtidos nas componentes principais (PCA) podem ser confirmadas pela análise de agrupamento realizada para cada época de coleta e apresentadas por meio dos *heatmap* (Figura 32). Às 3h os tratamentos se separam em oposição ou com maior dissimilaridade, as plantas pré-tratadas com AHa em verde, daquelas com AHk e controle em vermelho (Figura 32A). Às 6h os tratamentos se separam em oposição, as plantas pré-tratadas com AHa daquelas controle e com AHk (Figura 32B). Às 9h entretanto, os tratamentos se separam em oposição, as plantas agrupadas pelo AHk daquelas com AHa e controle (Figura 32C). E finalmente às 24h entretanto, as plantas se separam em oposição, quando pre-tratadas com AHk agora em verde daquelas controle e com AHa em vermelho (Figura 32D).

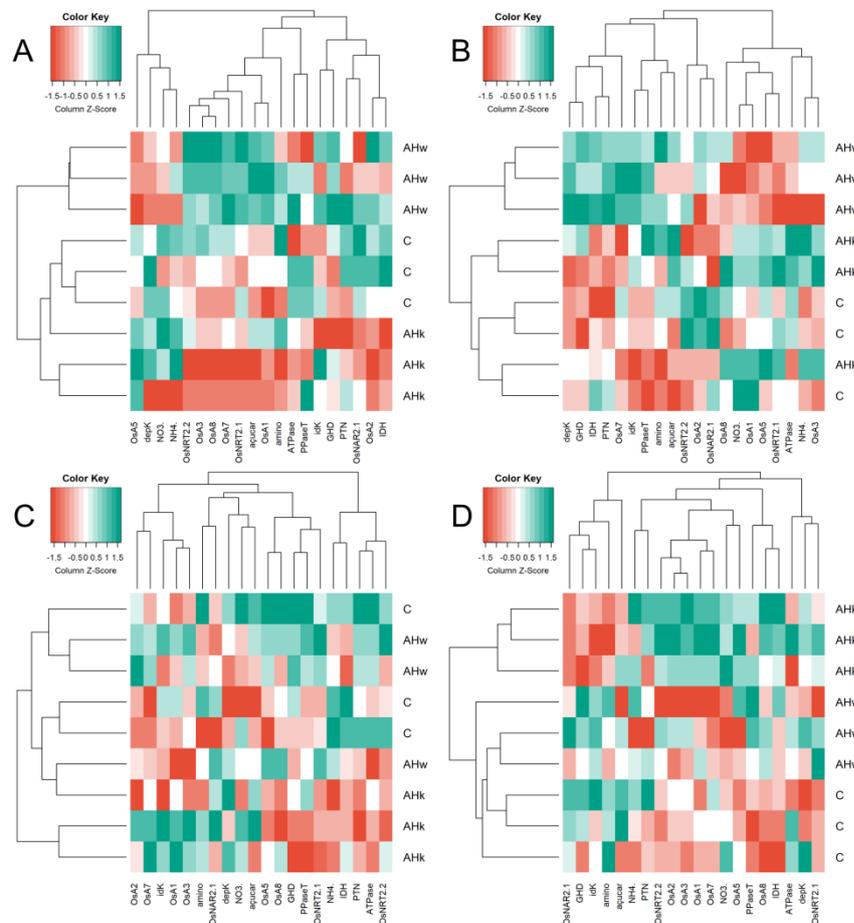


Figura 32. Análise de agrupamentos da expressão relativa dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade e bombas de protons, atividade enzimática e metabolitos das raízes das plantas de arroz (var. Piauí). As plantas foram pré-tratadas sem (C) e com ácido húmico extraído com água (AHw) e KOH (AHk). Foram feitas coletas às 3h (A), 6h (B), 9h (C) e 24h (D) após o ressurgimento com 0,2 mM de NO_3^- .

As raízes das plantas normalmente são expostas à solução do solo, que estão constantemente mudando de pH, bem como nas concentrações de nutrientes minerais, íons tóxicos e substâncias húmicas, como ácidos húmicos e ácidos fúlvicos.

A variedade de arroz Piauí é adaptada às condições de baixa disponibilidade de nutrientes e ao fluxo sazonal de NO_3^- , isso foi constatado pelos resultados de décadas de estudos publicados anteriormente pelo grupo de Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ, que indicaram que essa variedade desenvolveu mecanismos bioquímicos e moleculares voltados para o uso mais eficiente de N, provavelmente devido aos longos anos de cultivo em solos de baixa fertilidade (SOUZA et al., 1998; SPERANDIO et al., 2014) e confirmamos no capítulo II, onde foi observado que as plantas foram ainda melhor quando foram pre-tratadas com AHs. Além disso, essa variedade apresenta maiores valores de V_{max} e menores valores de K_m em comparação com a variedade melhorada de arroz IAC-47 e maior taxa de absorção líquida de NO_3^- quando cultivada com baixos teores de N ou 0,2 mM de N- NO_3^- (SANTOS et al., 2011; SPERANDIO et al., 2011; 2014). Como os HATS operam em uma faixa de concentração menor que 1mM (FERNANDES E SOUZA, 2006; DECHORGNAT et al., 2011; MARSCHNER, 2012), a maior expressão desses transportadores pode estar relacionado com uma absorção mais eficiente quando o N- NO_3^- é limitante no solo.

Adicionalmente, foi avaliada a expressão dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade e a proteína acessória dos transportadores de nitrato (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*) por PCR em tempo real, a fim de verificar o efeito dos AH sobre a nutrição nítrica, após ressurgimento deste nutriente, especialmente, sobre a expressão desses genes (Figura 29). Tem sido relatado que estes transportadores são importantes para a absorção de NO_3^- (ARAKI & HASEGAWA, 2006; FENG et al., 2011). Dessa maneira, neste estudo os transportadores de NO_3^- *OsNRT2.1* apresentaram maior expressão quando tratadas com AHa às 3h, embora tenha apresentado repressão às 6h. Contudo as plantas tratadas com AHk apresentaram maior expressão somente às 6h, e repressão às 3h e 9h. Para o gene *OsNRT2.2*, apresentaram repressão nesse período. Porém, houve maior indução com o ressurgimento de NO_3^- somente às 24h. Apesar dessas flutuações para os genes de transporte, houve repressão do gene *OsNAR2.1* que codifica para proteína acessória de transporte de nitrato durante às 3h, 6h e 24h (Figura 29c). Resultados anteriores demonstraram que a proteína OsNAR2.1 interage com os transportadores OsNRT2.1, 2.2 e 2.3a tornando-os funcionais para o transporte de NO_3^- (YAN et al., 2011; FENG et al., 2011). Estudos recentes com Arabidopsis demonstraram que existe a formação de um complexo com proteína de massa molecular de aproximadamente 150kDa formando duas unidades de *AtNAR2.1* e duas de *AtNRT2.1* (YONG et al., 2010). O mesmo estudo sugere que apenas o complexo *AtNAR2.1/AtNRT2.1* está envolvido no HATS e não apenas a forma monomérica do *AtNRT2.1*. Essa hipótese é apoiada pelo fato de que a injeção conjunta de mRNA do *AtNAR2.1* e *AtNRT2.1* em ovócitos de sapo aumentaram o acúmulo de ^{15}N quando comparados com o controle (OKAMOTO et al., 2006; KOTUR et al., 2011).

A RSA, morfologia e atividade de transporte para as formas disponíveis de N na rizosfera determina a taxa de absorção de N (GLASS 1992; 2003; XU et al., 2012).

Além da presença de transportadores de nitrato na membrana plasmática. A absorção de NO_3^- ocorre contra um potencial de gradiente eletroquímico; portanto, é um transportador ativo secundário que é energizado por uma força próton-motriz, e o mecanismo de ação é um simporte com dois H^+ ($\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$) para o interior da célula (GLASS 2003; XU et al., 2012). As PM H^+ -ATPases são necessários para manter o potencial de membrana ($\Delta\psi$) e o gradiente de H^+ ($\Delta\mu\text{H}$) durante a absorção de nitrato (PALMGREN e HARPER, 1999; SONIA E FERNANDES 2006). Dessa maneira, ocorre uma relação próxima entre o bombeamento de H^+ e o transporte de NO_3^- . As PM H^+ -ATPases são bombas eletrogênicas que hidrolisam o ATP para gerar movimento vetorial de prótons no sentido do apoplasto. O bombeamento de H^+ por H^+ -ATPases resulta em um gradiente de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) que gera força motriz de prótons (Δp)

e energiza a captação de ânions como NO_3^- da solução nutritiva para o interior das raízes. As PM H^+ -ATPases são considerados enzimas chave na geração de um potencial de membrana (gradiente elétrico, negativo no interior da célula) e um gradiente de prótons transmembrana (ácido no lado externo à célula) resultando em uma força motora de prótons que governa o influxo e a saída de íons e metabólitos através da membrana plasmática (SONDERGAARD et al., 2004; DUBY E BOUTRY, 2009; PALMGREN et al., 2011; FULSANG et al., 2011)

Na cultura do arroz, existem 10 isoformas de PM H^+ -ATPase (BAXTER et al., 2003), das quais a expressão de 7 são detectadas nas raízes (SPERANDIO et al., 2011). Embora as *OsA2* e *OsA7* sejam as isoformas de PM H^+ -ATPase mais induzidas nas raízes, após o ressuprimento com 0,2 mM N- NO_3^- (SPERANDIO et al., 2011, 2014). Verificamos em nosso estudo que, as plantas submetidas ao pre-tratamento com AHa, as isoformas *OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA8* às 3h, e especialmente a isoforma *OsA7* às 3h e 9h foram induzidas após o ressuprimento com 0,2 mM N- NO_3^- (Figura 28). Por outro lado, nas plantas submetidas ao pre-tratamento com AHk foi observada repressão das isoformas *OsA2*, *OsA3* e *OsA7* às 3h. Mas estas isoformas mais *OsA1*, *OsA8* apresentaram indução crescente, com altos níveis de indução às 24h (Figura 28). Entretanto, com exceção da isoforma *OsA5*, que mostra as mais altas expressões quando as plantas foram pre-tratadas com AHk, sendo superexpresso às 3h e 6h com 10 e 13 vezes de indução, respectivamente (Figura 28d). Curiosamente a isoforma *OsA5* foi reprimido com AHa às 3h e 6h. Embora os métodos pelos quais os AHs causam alterações na expressão de NTRs e PM H^+ -ATPase permaneçam incertos, outros autores também relataram esse efeito em diferentes culturas (QUAGIOTTI et al., 2004; ZANDONADI et al., 2007; TOMASI et al., 2009; JANNIN et al., 2012).

Portanto o pre-tratamento com AHa promove induções das isoformas de PM H^+ -ATPase mais cedo e o pre-tratamento com AHk promove induções mais tardias (Figuras 28, 29, 31 e 32). Embora, muitas dessas isoformas também sejam induzidas pela reposição com o NO_3^- nas raízes e na parte aérea, principalmente as isoformas *OsA2* e *OsA7* (SPERANDIO et al., 2011), que mostraram uma forte correlação positiva com a expressão do *OsNRT2.1* e do *OsNRT2.2* e o gene da proteína acessória *OsNAR2.1* (SPERANDIO et al., 2014).

Assim, a maior taxa de absorção líquida de NO_3^- em plantas pré-tratadas com HAS provavelmente reflete a ação conjunta de maiores quantidades de NTRs e PM H^+ -ATPases e/ou H^+ -PPases (SPERANDIO et al., 2014). Ambos os efeitos podem aumentar a aquisição de nutrientes, o primeiro através do aumento da exploração do solo, por meio do aumento do sistema radicular, como os parâmetros radiculares visto no capítulo III, tanto pelo AHa e AHk e reportado por vários estudos (SCHMIDT et al., 2007; DOBBSS et al., 2010; CANELLAS et al., 2010; MORA et al., 2012) além da acidificação do meio externo, e o segundo, acelerando a absorção de nutrientes (ROSE et al., 2014). Outros estudos também mostraram o efeito estimulante de SH e AHs sobre a expressão e atividade de bombas H^+ (SANTI et al., 2003; QUAGGIOTTI et al., 2004; ZANDONADI et al., 2007; AGUIRRE et al., 2009). Conferindo uma maior eficiência de absorção de N (TOMASI et al., 2009). Por outro lado, foi possível verificar que os AHs também melhoram a eficiência de utilização de N, outra componente da NUE, ao aumentar a atividade das enzimas envolvidas na assimiliação de N como a GS e que também tem sido relatado em outros estudos, a constatação desse estímulo sobre essas enzimas (NARDI et al., 2009).

6.6. CONCLUSÕES

A indução prévia das plantas com ácido húmico de vermicomposto em solução nutritiva promoveu maior acúmulo de massa fresca de raiz. Promoveu inicialmente um estímulo adicional da atividade da GS, IDH e das pirofosfatases, levando ao aumento na eficiência no uso de NO_3^- em baixas concentrações.

Os ácidos húmicos estimularam de maneira diferenciada a expressão relativa das isoformas de PM H^+ -ATPases (*OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8*) e dos transportadores para NO_3^- de alta afinidade (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e proteína acessória *OsNAR2.2*) das raízes de arroz. Promovendo um maior crescimento naquelas tratadas com ácido húmico extraído com água, melhorando a performance da planta em condições de baixo suprimento de N.

7. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os dados deste trabalho pode-se concluir que:

As frações de ácido húmico isoladas de vermicomposto usando a metodologia da IHSS tanto com NaOH (AH-Na) como KOH (AH-k) e o método de extração com água (AHa) apresentaram diferentes características estruturais que lhes conferem diferentes propriedades e consequentemente exercem diferentes modos de ação sobre as plantas.

O ácido húmico extraído com água promoveu os maiores estímulos para todos os parâmetros morfológicos da raiz das plântulas de arroz variedade tradicional Piauí, e apresentou um padrão de bioatividade do tipo linear reta, para as doses crescentes do ácido húmico sobre a morfologia das raízes das plântulas, em todos os momentos de avaliação. Por outro lado, o ácido húmico extraído com KOH atua sobre a morfologia das raízes das plântulas de arroz, com padrão do tipo quadrático em todos os momentos de avaliação.

O ácido húmico extraído com água proporcionou os melhores resultados e promoveu as maiores taxas de crescimento absoluto e relativo do sistema radicular nas plantas de arroz, seguido do ácido húmico extraído com KOH.

O ácido húmico de vermicomposto isoladas com NaOH, em solução nutritiva, proporciona uma indução prévia das plantas, e promove maior absorção líquida de N tanto na forma $N-NO_3^-$ quanto $N-NH_4^+$. Especialmente, no sistema de baixa afinidade de transporte, melhorando a eficiência de absorção de nitrato e produção de biomassa. Por outro lado, quando proporciona maior absorção do amônio, é prejudicial às plantas de arroz devido a toxicidade do amônio, causando diminuição na produção de massa fresca.

As plantas de arroz têm preferência por amônio, quando submetidas às condições de baixa disponibilidade de N, após a indução prévia das plantas com ácido húmico.

A aplicação de AH aumenta a expressão dos transportadores de alta afinidade para NO_3^- e diferentes isoformas de H^+ -ATPase na membrana plasmática melhorando a performance da planta em condições de baixo suprimento de N e reprimi a expressão dos transportadores para NH_4^+ .

A indução prévia das plantas com ácido húmico de vermicomposto em solução nutritiva promove maior acúmulo de massa fresca de raiz. Promove inicialmente um estímulo adicional da atividade da GS, IDH e das pirofosfatases, levando ao aumento na eficiência no uso de NO_3^- em baixas concentrações. Além disso, estimularam de maneira diferenciada a expressão relativa das isoformas de PM H^+ -ATPases (*OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8*) e dos transportadores para NO_3^- de alta afinidade (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e proteína acessória *OsNAR2.2*) das raízes de arroz. Promovendo um maior crescimento naquelas tratadas com ácido húmico extraído com água, melhorando a performance da planta em condições de baixo suprimento de N.

Uma resposta mais rápida e em maior intensidade promovida pela ação dos ácidos húmicos, principalmente extraídos com água demonstra a capacidade de promover aumentos na eficiência no crescimento radicular, na de absorção e metabolismo de nitrato se apresenta como uma vantagem adaptativa durante ao fluxo sazonal de N que ocorre na região tropical.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, I. A.; CASTRO, P. R. C. crescimento da parte aérea de cana crua e queimada. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1069-1079, 1999.

AGUIAR, N. O.; CANELLAS, L. P.; DOBBSS, L. B.; ZANDONADI, D. B.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. R. Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 33, p. 1613-1623, 2009.

AGUIAR, N. O.; NOVOTNY, E. H.; OLIVEIRA, A. L.; RUMJANEK, V. M.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 95-102, 2013.

AGUIRRE, E.; LEMÉNAGER, D.; BACAICOA, E.; FUENTES, M.; BAIGORRI, R.; ZAMARREÑO, A. M.; GARCÍA-MINA, J. M. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 215-223, 2009.

ALBUZIO, A.; FERRARI, G.; NARDI, S. Effects of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings, **Canadian Journal of Soil Science**, v. 66, n. 4, p. 731-736, 1986.

AL-GHAZI, Y.; MULLER, B.; PINLOCHE, S.; TRANBARGER, T. J.; NACRY, P.; ROSSIGNOL, M.; TARDIEU, F.; DOUMAS, P. Temporal responses of Arabidopsis root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signaling. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, p. 1053-1066, 2003.

ANDREUX, F. Humus in world soils. **In: PICCOLO, A. (Ed.). Humic Substances in Terrestrial Ecosystems**, Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 45-100.

ARAKI, R.; HASEGAWA, H. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. **Breeding Science**, v. 56, p. 295-302, 2006.

ARANCON, N. Q.; EDWARDS, C. A.; ATIYEH, R. M.; METZGER, J. D. Effects of vermicomposts produced from food waste on the growth and yields of greenhouse peppers. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 2, p.139-144, 2004.

ARSENAULT, J. L.; POULCUR, S.; MESSIER, C.; GUAY, R. WinRHIZO™, a root-measuring system with a unique overlap correction method. **HortScience**, v. 30, n. 4, p. 906-906, 1995.

ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. **Plant and Soil**, v. 336, p. 313-322, 2010.

ATIYEH.; R. M.; ARANCON, N.; EDWARDS, C. A.; METZGER, J. D. Influence of earthworm-processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. **Bioresource Technology**, v. 75, n. 3, p. 175-180, 2000.

ATIYEH, R. M.; EDWARDS, C. A.; SUBLER, S.; METZGER, J. D. Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: Effects on physicochemical properties and plant growth. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 1, p.11-20, 2001.

ATIYEH, R. M.; ARANCON, N. Q.; EDWARDS, C. A.; METZGER, J. D. The influence of earthworm - processed pig manure on the growth and productivity of marigolds, **Bioresource Technology**, v. 81, n. 2, p. 103-108, 2002a.

ATIYEH, R. M.; LEE, S.; EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q.; METZGER, J. D. The influence of humic acids derived from earthworm - processed organic wastes on plant growth. **Bioresource Technology**, v. 84, n. 1, p. 7-14, 2002b.

AYDIN, A.; KANT, C.; TURAN, M. Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 7, p. 1073-1086, 2012.

BARBER, S. A. **Soil Nutrient Bioavailability. A Mechanistic Approach**. New York: Wiley - Interscience, 1984. 384p.

BARBER, S. A. **Soil Nutrient Bioavailability. A Mechanistic Approach**. 2nd ed.; New York, USA: Wiley, 1995. 384p.

BARBER A. S. Growth requirements for nutrients in relation to demand at the root surface. **In:** HARLEY, J. L; RUSSELL, R. S. (Ed.). *The Soil-Root Interface*. London: Academic Press, 1979. p. 5-20.

BALTSCHIEFFSKY, M.; SCHULTZ, A.; BALTSCHIEFFSKY, H. H⁺-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. **FEBS Letters**, v.452, p.121–127, 1999.

BERBARA, R. L.; GARCÍA, A. C. Humic substances and plant defense metabolism. **In:** AHMAD, P.; WANI, M. R. (Ed.). *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*, New York: Springer, 2014. p. 297-319.

BÉRCZI, A.; MOLLER, I. M. Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles. **Plant, Cell & Environment**, v.3, n.12, p.1287-1302, 2000.

BHALERAO, R. P.; EKLOF, J.; LJUNG, K.; MARCHANT, A.; BENNETT, M.; SANDBERG, G. Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. **The Plant Journal**, v. 29, n. 3, p. 325-332, 2002.

BAXTER, I.; TCHIEU, J.; SUSSMAN, M. R.; BOUTRY, M.; PALMGREN, M. G.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J. F.; AXELSEN, K. B. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumpin *Arabidopsis* and rice. **Plant Physiology**, v. 132, p. 618-628, 2003.

BLANCHET, R. M. The direct and indirect effect of humified, organic matter on the nutrition of vascular plants. **Annales agronomiques**, v. 9, n. 9, p. 499-532, 1958.

BOTTOMLEY, W. B. Some accessory factors in plant growth and nutrition. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 88, n. 602, p. 237-247, 1914a.

BOTTOMLEY, W. B. The significance of certain food substances for plant growth. **Annals of Botany**, v. 28, n. 111, p. 531-540, 1914b.

BOTTOMLEY, W. B. Some effects of organic growth-promoting substances (auximones) on the growth of *Lemna minor* in mineral culture solutions. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 89, n. 621, p. 481-507, 1917.

BRIX, H; LORENZEN, B; MORRIS, J.T.; SCHIERUP, H-H.; SORRELL, B.K. Effects of oxygen and nitrate on ammonium uptake kinetics and adenylate pools in *Phalaris arundinacea* L and *Glyceria máxima* (Hartm) Holmb. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences**, v. 102, p. 333-342, 1994.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 567-584, 2002.

CACCO, G.; DELL'AGNOLA, G. Plant growth regulator activity of soluble humic complexes. **Canadian journal of soil science**, v. 64, n. 2, p. 225-228, 1984.

CACCO, G. ATTINA, E. GELSOMINO A. AND SIDARI, M. Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings. **Journal of plant nutrition and soil science**, v. 163, p. 313-320. 2000.

CALDWELL, M. M. Plant architecture and resource competition. **In:** SCHULZE E. D.; ZWOLFER, H. (Ed.). Ecological Studies; Volume 61. New York, USA: Springer, 1987. p. 164-179.

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

CANELLAS, L. P.; ZANDONADI, D. B.; MEDICI, L. O.; PERES, L. E. P.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.R. Bioatividade de substâncias húmicas – ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas, **In:** CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. (Ed). Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substancias húmicas, Campos Goytacazes: CCTA/UENF, 2005. p. 224-243.

CANELLAS, L. P.; ZANDONADI, D. B.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às H⁺-ATPases. **In:** FERNANDES, M. S. (Ed). Nutrição Mineral de plantas, Viçosa: SBCS, 2006. p. 175-200.

CANELLAS, L. P.; ZANDONADI, D. B.; BUSATO, J. G.; BALDOTTO, M. A.; SIMÕES, M. L; MARTIN-NETO, L.; FAÇANHA, A. R.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. **Soil Science**, v. 173, n. 9, p. 624-637, 2008.

CANELLAS, L. P.; PICCOLO, A.; DOBBSS, L. B.; SPACCINI, R.; OLIVARES, F. L.; ZANDONADI, D.B.; FAÇANHA, A. R. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. **Chemosphere**, v. 78, p. 457-466, 2009.

CASIMIRO, I.; MARCHANT, A.; BHALERAO, R. P.; BEECKMAN, T.; DHOOGHE, S.; SWARUP, R.; GRAHAM, N.; INZÉ, D.; SANDBERG, G.; CASERO, P. BENNETT, M. Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. **Plant Cell**. v. 13, p. 843-852, 2001.

CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 853-855, 1975.

CESCO, S.; RÖMHELD, V.; VARANINI, Z.; PINTON, R. Solubilization of iron by water - extractable humic substances. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 163, n. 3, p. 285-290, 2000.

CESCO, S.; NIKOLIC, M.; RÖMHELD, V.; VARANINI, Z.; PINTON, R. Uptake of Fe from soluble Fe-humate complexes by cucumber and barley plants. **Plant and Soil**, v. 241, n. 1, p. 121-128, 2002.

CHEN, Y.; de NOBILI, M.; AVIAD, T. Stimulatory effects of humic substances on plant growth. **In: MAGDOFF, F. R.; WEIL, R. R. (Ed.). Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture**, Boca Raton-FL: CRC Press, 2004a. p. 103-129.

CHEN, Y.; CLAPP, C. E.; MAGEN, H. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: the role of organo-iron complexes. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 50, n. 7, p. 1089-1095, 2004b.

CLAPP, C. E.; CHEN, Y.; HAYES, M. H. B.; CHENG, H. H. Plant growth promoting activity of humic substances. **In: SWIFT, R. S.; SPARKS, K. M. (Ed.). Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments, and Waters**, St. Paul-MN: International Humic Science Society, 2001. p. 243-255.

CLAASSEN, N.; BARBER, S. A. A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. **Plant Physiology**, v. 54, p. 564-568, 1974.

CLAASSEN, N.; STEINGROBE, B. Mechanistic simulation models for a better understanding of nutrient uptake from soil. **In: RENGEL, Z., (Ed.). Mineral Nutrition of Crops. Fundamental Mechanisms and Implications**; New York: Haworth Press, 1999. p. 327-367.

CLARK, L. J.; PRICE, A. H.; STEELE, K. A.; WHALLEY, W. R. Evidence from near-isogenic lines that root penetration increases with root diameter and bending stiffness in rice. **Functional Plant Biology**, v. 35, p. 1163-1171, 2008.

CLELAND, R. E. Auxin and cell elongation. **In: DAVIES, P. J. (Ed.) Plant hormones**. Kluwer, Dordrecht, 1995. p. 214-21.

COLL, L.; POTVIN, C.; MESSIER, C.; DELAGRANGE, S. Root architecture and allocation patterns of eight native tropical species with different successional status used in open-grown mixed plantations in Panama. **Trees**, v. 22, n. 4, p. 585, 2008.

COMETTI, N. N.; FURLANI, P. R.; RUIZ, H. A.; FERNANDES-FILHO, E. I. Soluções Nutritivas: formulação e aplicações. **In:** MANLIO, S. F. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 89-114.

CONCHERI, G.; NARDI, S.; PICCOLO, A.; RASCIO, N.; DELL'AGNOLA, G. Effects of humic fractions on morphological changes related to invertase and peroxidase activities in wheat seedlings. **In:** SENESI, N.; MIANO, T. M. (Ed.). *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*, Amsterdam: Elsevier Science, 1994. p. 257-262.

CORDEIRO, F. C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; de SOUZA, S. R. Humic acids Effects on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea Mays*). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 70-74, 2011.

COZZOLINO, A.; CONTE, P.; PICCOLO, A. Conformational changes of humic substances induced by some hydroxy, keto and sulfonic acids. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n.4-5, p. 563-571, 2001.

CUMMING, G. FIDLER, F.; VAUX, D. L. Error bars in experimental biology. **The Journal of Cell Biology**, v. 177, n. 1, p. 7-11, 2007.

DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C. T.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of experimental botany**, v. 62, n.4, p. 1349-1359, 2011.

DELL'AGNOLA, G.; NARDI, S. Hormone-like effect of enhanced nitrate uptake induced by depolycondensed humic fractions obtained from *Allolobophora rosea* and *A. caliginosa* faeces. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, n. 3, p. 115-118, 1987.

DOANE, T.A.; HORWÁTH, W.R. Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. **Analytical Letters**, v. 36, n. 12, p. 2713-2722, 2003.

DEN HERDER, G.; VAN ISTERDAEL, G.; BEECKMAN, T.; DE SMET, I. The roots of a new green revolution. **Trends in plant science**, v. 15, n. 11, p. 600-607, 2010.

DICK, D. P.; NOVOTNY, E. H.; DIECKOW, J.; BAYER, C. Química da matéria orgânica do solo. **In:** MELO, V. D. F.; ALLEONI, L. R. F. *Química e mineralogia do solo. Parte II*, Viçosa, MG: SBCS, 2009. p. 1-68.

DOBBSS, L. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, M.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; FACANHA, A.R. 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.

DOBBSS, L. B.; MEDICI, L. O.; PERES, L. E. P.; PINO-NUNES, L. E.; RUMJANEK, V.M.; FACANHA, A. R.; CANELLAS, L. P. Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols. **Annals of Applied Biology**, v. 151, n. 2, p. 199-211, 2007.

DONG, B.; RENGEL, Z.; GRAHAM, R. D. Root morphology of wheat genotypes differing in zinc efficiency. **Journal of Plant Nutrition**, v. 18, p. 2761-2773, 1995.

DOUSSAN, C.; PAGÈS, L.; VERCAMBRE, G. Modelling of the hydraulic architecture of root systems: an integrated approach to water absorption-model description. **Annals of botany**, v. 81, n. 2, p. 213-223, 1998.

DREW, M. C.; SAKER, L. R.; BARBER, S. A.; JENKINS, W. Changes in the kinetics of phosphate and potassium absorption in nutrient-deficient barley roots measured by a solution-depletion technique. **Planta**, v. 160, n. 6, p. 490-499, 1984.

DROZDOWICZ, Y. M.; KISSINGER, J. C.; REA, P. A. AVP2, a sequence-divergent, K⁺-insensitive H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 123, p. 353-362, 2000.

DUAN, Y. H.; ZHANG, Y. L.; YE, L. T.; FAN, X. R.; XU, G. H.; SHEN, Q. R. Responses of rice cultivars with different nitrogen use efficiency to partial nitrate nutrition. **Annals of Botany**, v. 99, p. 1153-1160, 2007.

DUBY, G.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 457, p. 645-655, 2009.

ELGALA, A. M.; METWALLY, A. J.; KHALIL, R. A. The effect of humic acid and Na₂EDDHA on the uptake of Cu, Fe and Zn by barley in sand culture. **Plant and Soil**, v. 49, p. 41-48, 1978.

ENGELS, C.; NEUMANN, G.; GAHOONIA, T. S.; GEORGE, E.; SCHENK, M. Assessing the ability of roots for nutrient acquisition. **In: SMIT, A. L.; BENGOUGH, A. G.; ENGELS, C.; VAN NOORDWIJK, M.; PELLERIN, S.; VAN DE GEIJN, S. C. (Ed.). Root methods: a handbook. Berlin Heidelberg: Springer, 2000. p. 403-459.**

ERTANI, A.; PIZZEGHELLO, D.; BAGLIERI, A.; CADILI, V.; TAMBONE, F.; GENNARI, M.; NARDI, S. Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L.) plantlets. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 103-111, 2013.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas.** Londrina: Editora Planta. 2006, 380p.

FACANHA, A. R.; DE MEIS, L. Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. **Plant Physiology**, v. 108, n. 1, p. 241-246, 1995.

FAÇANHA, A. R.; DE MEIS, L. Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. **Plant physiology**, v. 116, n. 4, p. 1487-1495, 1998.

FAÇANHA, A. R.; FAÇANHA, A. L. O.; OLIVARES, F. L.; GURID, F.; SANTOS, G. A.; VELLOSO, A. C. X.; RUMJANEK, V. M.; BRASIL, F.; SCHRIPEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M. A.; CANELLAS, L. P. Bioatividade de ácidos húmicos: Efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1301-1310, 2002.

FANG, S.; CLARK, R.; LIAO, H. 3D quantification of plant root architecture in situ. **In:** MANCUSO, S. (Ed.). *Measuring Roots*. Berlin Heidelberg: Springer, 2012. p. 135-148.

FAN, M. S.; ZHU, J. M.; RICHARDS, C.; BROWN, K. M.; LYNCH, J. P. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 493-506, 2003.

FENG, H.; YAN, M.; FAN, X.; LI, B.; SHEN, Q.; MILLER, A. J.; XU, G. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 7, p. 2319-2332, 2011.

FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. **In:** BERGSEN, F. J. (Ed.). *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, Chichester: John Wiley, 1980. p. 265-314.

FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicyte-dichloroisocyanurate color reaction. **Analytical Chemistry**, v. 49, p. 1980. 1977.

FENDLER, J. H.; FENDLER, E. J. *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*. New York: Academic Press, 1975. p. 19-41.

FENG, H.; YAN, M.; FAN, X.; LI, B.; SHEN, Q.; MILLER, A. J.; XU, G. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2319-2332, 2011.

FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v. 33, p. 297-301. 1983.

FERNANDES, M. S. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio sobre a absorção e assimilação de N em arroz, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1990.

FERNANDES, M. S. Effects of environmental stress on the relationship of free amino-N to fresh weight of rice plants, **Journal of Plant Nutrition**, v. 14, p. 1151-1164, 1991.

FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, p. 111-148, 1995.

FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Absorção de nutrientes. **In:** MANLIO, S. F. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2006. p. 215-252.

FERRO, N.; GALLEGOS, A.; BULTINCK, P.; JACOBSEN, H-J.; CARBO-DORCA, R.; REINARD, T. Coulomb and overlap self-similarities: a comparative selectivity analysis of

structure-function relationships for auxin-like molecules. **Journal of chemical information and modeling**, v. 46, n. 4, p. 1751-1762, 2006.

FITTER, A. H. The ecological significance of root system architecture: an economic approach. **In:** ATKINSON, D. (Ed.). *Plant Root Growth: An Ecological Perspective*, Oxford, London: Blackwell Scientific Publishers, 1991. p. 229-243.

FORDE, B. G.; CLARKSON, D. T. Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. **In:** *Advances in botanical research*. Academic Press. Volume 30, 1999. p. 1-90.

FUGLSANG, A. T.; PAEZ-VALENCIA, J.; GAXIOLA, R. A. Plant proton pumps: regulatory circuits involving H⁺-ATPase and H⁺-PPase. **In:** GEISLER, M.; VENEMA, K. (Ed.). *Transporters and pumps in plant signaling*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. p. 39-64.

GAO, J.; LIU, J.; LI, B.; LI, Z. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 185a-185i, 2001.

GARCÍA, A. C.; BERBARA, R. L. L.; FARÍAS, L. P.; IZQUIERDO, F. G.; HERNÁNDEZ, O. L.; CAMPOS, R. H.; CASTRO, R. N. 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.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; SPERANDIO, M. V. L.; CASTRO, R. N.; BERBARA, R. L. L. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. **Ecological Engineering**, v. 47, p. 203-208, 2012.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; RUMJANEK, V. M.; CASTRO, R. N.; DOS SANTOS, F. S.; SOUZA, L. G. A.; BERBARA, R. L. L. 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.

GAUR, V. S.; SINGH, U. S.; GUPTA, A. K.; KUMAR, A. Understanding the differential nitrogen sensing mechanism in rice genotypes through expression analysis of high and low affinity ammonium transporter genes. **Molecular biology reports**, v. 39, p. 2233-2241, 2012.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, 909-930, 2010.

GILROY, S.; JONES, D. L. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. **Trends in plant science**, v. 5, n. 2, p. 1360-1385, 2000.

GLASS, A. D.; SHAFF, J. E.; KOCHIAN, L. V. Studies of the uptake of nitrate in barley: IV. Electrophysiology. **Plant Physiology**, v. 99, n. 2, p. 456-463, 1992.

GLASS, A. D. M.; SIDDIQI, M. Y. Nitrogen absorption by plant roots. **In:** SRIVASTAVA; H. S.; SINGH, R. P. (Ed.). *Nitrogen Nutrition in Higher Plants*, New Delhi: Associated Publishing Co., 1995. p. 21-56.

GLASS, A. D. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical reviews in plant sciences**, v. 22, n.5, p. 453-470, 2003.

GAXIOLA, R.; LI, J.; UNDURRAGA, S.; DANG, L.; ALLEN, G.; ALPER, S.; FINK, G. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 1444-11449, 2001.

GOWDA, V. R.; HENRY, A.; YAMAUCHI, A.; SHASHIDHAR, H.E.; SERRAJ, R. Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. **Field Crops Res.**, v. 122, p. 1-13, 2011.

GRASSO, M.; D'ORAZIO, V.; SENESI, N. Spectroscopic characterization of soil organic matter fractions from rhizosphere and bulk soils cultivated for tomato and artichoke. **In: Proceedings, São Pedro-Brazil: IHSS, (12th Meeting of the International Humic Substances Society)**, 2004. p. 368-371.

GUMINSKI, S. Present-day views on physiological effects induced in plant organisms by humic compounds. **Soviet Soil Science-USSR**, v. 9, 1250-1256, 1968.

HARADA, J.; YAMAZAKI, K. Morphology and development of roots. **In: MATSUO, T.; HOSHIKAWA, K., (Ed.). Science of the Rice Plant. Morphology. Volume 1. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Centre, 1993. p. 133-161.**

HARPER, J. F.; MANNEY, L.; SUSSMAN, M. R. The plasma membrane H⁺-ATPase gene family in Arabidopsis: genomic sequence of AHA10 which is expressed primarily in developing seeds. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 244, n. 6, p. 572-587, 1994.

HENZLER, T.; STEUDLE, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 353, p. 2053-2066, 2000.

HERNANDO, V.; ORTEGA, B.C.; FORTUN, C. Study of the action of two types of humic acid on the maize plant. **In: Soil Organic Matter Studies, Oxford: Pergamon Press, (Report of IAEA Meeting Vienna, vol. 2). 1977.**

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. L. The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley: California Agriculture Experiment Station (Bulletin 347), 1950. 32 p.

HOCHHOLDINGER, F.; TUBEROSA, R. Genetic and genomic dissection of maize root development and architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 172-177, 2009.

IHSS (International Humic Substances Society). Isolation of IHSS Soil Fulvic and Humic Acids. URL <http://www.humicsubstances.org> [accessado em 17/Junho/2013]

INGRAM, K. T.; BUENO, F. D.; NAMUCO, O. S.; YAMBAO, E. B.; BEYROUTY, C. A. Rice root traits for drought resistance and their genetic variation. **In: Rice Roots: Nutrient and Water Use. KIRK, G. J. D. (Ed.). International Rice Research Institute: Manila, Philippines, 1994. p. 67-77.**

IYER-PASCUZZI, A. S.; SYMONOVA, O.; MILEYKO, Y.; HAO, Y.; BELCHER, H.; HARER, J.; WEITZ, J. S.; BENFEY, P. N. Imaging and analysis platform for automatic phenotyping and trait ranking of plant root systems. **Plant Physiology**, v. 152, n. 3, p. 1148-1157, 2010.

JANNIN, L.; ARKOUN, M.; OURRY, A.; LAÎNÉ, P.; GOUX, D.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; SAN FRANCISCO, S.; BAIGORRI, R.; CRUZ, F.; HOUDUSSE, F.; GARCIA-MINA, J. M.; YVIN, J. C.; ETIENNE, P. Microarray analysis of humic acid effects on Brassica napus growth: Involvement of N, C and S metabolisms. **Plant and Soil**, v. 359, n. 1-2, p. 297-319, 2012.

JAMPEETONG, A.; BRIX, H. Effects of NH_4^+ concentration on growth, morphology and NH_4^+ uptake kinetics of *Salvinia natans*. **Ecological Engineering**, v. 35, p. 695-702, 2009.

JAYMAN, T.C.Z.; SIVASUBRAMANIAN, S. Release of bound iron and aluminum from soils by the root exudates of tea (*Camelia sinensis*) plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26, n. 12, p.1895, 1975.

JIANG, L.; PHILLIPS, T. E.; HAMM, C. A.; DROZDOWICZ, Y. M.; REA, P. A.; MAESHIMA, M.; ROGERS, S. W.; ROGERS, J. C. The protein storage vacuole: a unique compound organelle. **Journal of Cell Biology**, v. 155, n. 6, p. 991-1002, 2001.

JINDO, K.; MARTIM, S. A.; NAVARRO, E. C.; PÉREZ-ALFOCEA, F.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; AGUIAR, N. O.; CANELLAS, L.P. Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. **Plant and Soil**, v. 353, p. 209-220, 2012.

KRAMER, E. M. Auxin-regulated cell polarity: an inside job? **Trends in plant science**, v. 14, n. 5, p. 242-247, 2009.

KÖGEL-KNABNER, I.; ZECH, W.; HATCHER, P. G. Chemical structural studies of forest soil humic acids: aromatic carbon fraction. **Soil Science Society of America Journal**, v. 55, n. 1, p. 241-247, 1991.

KOTUR, Z.; MACKENZIE, N.; RAMESH, S.; TYERMAN, S. D.; KAISER, B. N.; GLASS, A. D. Nitrate transport capacity of the Arabidopsis thaliana NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. **New Phytologist**, v. 194, n. 3, p. 724-731, 2012.

KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. Compartmentation and flux characteristics of ammonium in spruce. **Planta**, v. 196, n. 4, p. 691-698, 1995.

LAMBERS, H.; SHANE, M. W.; CRAMER, M. D.; PEARSE, S. J.; VENEKLAAS, E. J. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. **Annals of botany**, v. 98, p. 693-713, 2006.

LANE, D. R.; BASSIRIRAD, H. Differential responses of tallgrass prairie species to nitrogen loading and varying ratios of NO_3^- to NH_4^+ . **Functional Plant Biology**, v. 29, n. 10, p. 1227-1235, 2002.

LARIGAUDERIE, A.; RICHARDS, J. H. Root proliferation characteristics of seven perennial arid-land grasses in nutrient-enriched microsites. **Oecologia**, v. 99, p. 102-111, 1994.

LASKOWSKI, M. J.; WILLIAMS, M. E.; NUSBAUM, H. C.; SUSSEX, I. M.; Formation of lateral-root-meristems is a 2-stage process. **Development**, v. 121, p. 3303-3310, 1995.

LEITA, L.; de NOBILI, M.; CATALANO, L.; MOIRA, A; FONDA, E.; VLAIC, G. Complexation of iron-cyanide by humic substances. **In:** SWIFT, R. S.; SPARKS, K. M. (Ed.). *Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments and Waters*, St. Paul-MN: International Humic Science Society, 2001. p. 477-482.

LI, B.; WEI, A.; SONG, C.; LI, N.; ZHANG, J. R. Heterologous expression of the TsVP gene improves the drought resistance of maize. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, p. 146-159, 2008.

LIMA, W. L. **Metabolismo do nitrogênio e atividade de bomba de prótons em raízes transgênicas com ácidos húmicos e simbiose micorrízica arbuscular. 2008.** 156f. Tese. (Doutorado em Agronomia, Ciências do Solo). Instituto de Agronomia. Departamento de Solos. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2008.

LIVAK, K. J.; CHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LEINWEBER, P.; FRÜND, R.; REUTER, G. A ^{13}C -NMR study on the formation of soil organic matter from grass residues. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v. 156, n. 5, p. 415-420, 1993.

LOFFREDO, E.; PALAZZO, A. J.; SENESI, N.; CLAPP, C. E.; BASHORE, T. L. Germination and early growth of slickspot peppergrass (*Lepidium papilliferum*) as affected by desert soil humic acids. **Soil Science**, v. 175, p. 186-193, 2010.

LÓPEZ-BUCIO, J.; HERNÁNDEZ-ABREU, E.; SÁNCHEZ-CALDERÓN, L.; NIETO-JACOBO, M. F.; SIMPSON, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. **Plant physiology**, v. 129, n. 1, p. 244-256, 2002.

LOQUE, D.; LALONDE, S.; LOOGER, L. L.; WIREN, N.; FROMMER, W.B. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. **Nature**, v. 446, p. 195-198, 2007.

LÜTHJE, S.; DÖRING, O.; HEUER, S.; LÜTHEN, H.; BÖTTGER, M. Oxidoreductases in plant plasma membranes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1331, n. 1, p. 81-102, 1997.

LYNCH, J. Root architecture and plant productivity. **Plant physiology**, v. 109, p. 7-13, 1995.

LYNCH, J. P. Roots of the second green revolution. **Australian Journal of Botany**, v. 55, p. 493-512, 2007.

MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 6, p. 250-258, 2009.

MAESHIMA, M.; YOSHIDA, S. Purification and properties of the V-PPases from mung bean. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 20068-20073, 1989.

MAESHIMA, M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1465, p.37-51, 2000.

MAESHIMA, M. Tonoplast transporters: organization and function. **Annual review of plant biology**, v. 52, n. 1, p. 469-497, 2001.

MAGGIONI, A.; VARANINI, Z.; NARDI, S.; PINTON, R. Action of soil humic matter on plant roots: stimulation of ion uptake and effects on (Mg²⁺⁺ K⁺) ATPase activity. **Science of the Total Environment**, v. 62, p. 355-363, 1987.

MALAGOLI, M.; DAL CANAL, A.; QUAGGIOTTI, S.; PEGORARO, P.; BOTTACIN, A. Differences in nitrate and ammonium uptake between Scots pine and European larch. **Plant and Soil**, v. 221, n. 1, p. 1-3, 2000.

MARSCHNER, H. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. **Field Crops Research**, v. 56, n. 1-2, p. 203-207, 1998.

MARSCHNER, P. M. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. San Diego: Academic Press, 2012. 651p.

MATERECHERA, S.A.; ALSTON, A. M.; KIRBY, J. M.; DEXTER, A. R. Influence of root diameter on the penetration of seminal roots into a compacted subsoil. **Plant and Soil**, v. 144, p. 297-303, 1992.

MESSIAS, R. A. **Avaliação estrutural de ácidos húmicos de vermicomposto e turfa por diferentes técnicas de caracterização**. 119 f. 2004. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

MILLER, M. H.; ASHTON, G. C. The Influence of fertilizer placement and rate of nitrogen on fertilizer phosphorus utilization by oats as studied using a central composite design. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 40, n. 2, p. 157-167, 1960.

MILLER, A. J.; SMITH, S. J. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 7, p. 843-854, 1996.

MITSUDA, N.; ENAMI, K.; NAKATA, M.; TAKEYASU, K.; SATO, M. H. Novel type *Arabidopsis thaliana* H⁺-PPase is localized to the golgi apparatus. **FEBS Letters**, v.488, p. 29-33, 2001a.

MØLLER, J. V.; JUUL, B.; LE MAIRE, M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1286, n. 1, p. 1-51, 1996.

MORA, V.; BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, A. M.; AGUIRRE, E.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; GARCÍA-MINA, J. M. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins-polyamines and mineral nutrients. **Journal of plant physiology**, v. 167, n. 8, p. 633-642, 2010.

MORA, V.; BAIGORRI, R. BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, A. M.; GARCÍA-MINA, J. M. The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. **Environmental and Experimental Botany**, v. 76, p. 24-32, 2012.

MORI, I. C.; SCHROEDER, J. I. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. **Plant Physiology**, v.135, n. 2, p. 702-708, 2004.

MORIAU, L. Expression analysis of two gene subfamilies encoding the plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia* reveals the major transport functions of this enzyme. **The Plant Journal**, v. 19, n. 1, p. 31-41, 1999.

MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: Structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1465, n. 1, p. 1-16, 2000.

MORSOMME, P.; D'EXAERDE, A.D.; DEMEESTER, S.; THINES, D.; GOFFEAU, A.; BOUTRY, M. Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* increase H⁺-pumping and permit yeast growth at low pH. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 20, p. 5513-5526, 1996.

MUSCOLO, A.; FELICI, M.; CONCHERI, G.; NARDI, S. Effect of humic substances on peroxidase and esterase patterns during growth of leaf explants of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 15, n. 2, p. 127-131, 1993.

MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M. R.; ABENAVOLI, M. R.; CONCHERI, G.; NARDI, S. Effect of molecular complexity and acidity of earthworm faeces humic fractions on glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Daucus carota* II cells. **Biology and Fertility of Soils**, v. 22, p. 83-88, 1996.

MUSCOLO, A.; CUTRUPI, S.; NARDI, S. IAA detection in humic substances. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 8-9, p. 1199-1201, 1998.

MUSCOLO, A.; BOVALO, F.; GIONFRIDDO, F.; NARDI, S. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 9, p. 1303-1311, 1999.

MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M. R.; SIDARI, M. NARDI, S. Effect of two different humic substances on some glycolytic enzymes in callus culture of *Pinus Laricio*. **Humic Substances in the Environment**, v. 2, n. 1-4, p. 19-24, 2000.

MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M. R.; SIDARI, M.; NARDI, S. The effects of humic substances on *Pinus callus* are reversed by 2,4 - dichlorophenoxy acetic acid. **Journal of chemical ecology**, v. 31, n. 3, p. 577-590, 2005.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures. **Journal of chemical ecology**, v.33, n.1, p.115-129, 2007a.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; ATTINÀ, E.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. **Soil Science Society of America Journal**, v. 71, n. 1, p. 75-85, 2007b.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; NARDI, S. Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 57-63, 2013.

MYLONAS, V. A.; MCCANTS, C.B. Effects of humic and fulvic acids on growth of tobacco, 2. Tobacco growth and ion uptake. **Journal of Plant Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 377-393, 1980.

NANNIPIERI, P.; GREGO, S.; DELL'AGNOLA, G.; NARDI, S. Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica, **In: NANNIPIERI, P. (Ed.). Ciclo della sostanza organica del suolo**, Bologna: Patron Editore, 1993. p. 67-78.

NARDI, S.; CONCHERI, G.; DELL'AGNOLA, G.; SCRIMIN, P. Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, p. 833-836, 1991.

NARDI, S.; PANUCCIO, M. R.; ABENAVOLI, M. R.; MUSCOLO, A. Auxin-like effect of humic substances extracted from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1341-1346, 1994.

NARDI, S.; CONCHERI, G.; DELL'AGNOLA, G. Biological activity of humus. **In: PICCOLO, A. (Ed.). Humic Substances in Terrestrial Ecosystems**. Netherlands: Elsevier, 1996. p. 361-406.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; REMIERO, F.; MUSCOLO, A. Biological activity of humic substances extracted from soils under different vegetation cover. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 30, n. 5-6, p. 621-634, 1999.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; REMIERO, F.; RASCIO, N. Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth. **Soil Science Society of America Journal**, v. 64, n. 2, p. 639-645, 2000.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 11, p. 1527-1536, 2002.

NARDI, S.; VACCARO, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; BAIANO, S.; PICCOLO, A. Effetto di differenti frazioni di sostanze umiche sul metabolismo glicolitico e respiratorio in

foglie di plantule di mais (*Zea mays L.*). **In:** VI Congresso Sezione Italiana dell'International Humic Substances Society, Perugia, Italy, 2005. p. 61-63.

NARDI, S.; CARLETTI, P.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A. Biological activities of humic substances, **In:** SENESI, N.; XING, B.; HUANG, P.M. (Ed.). Volume 2 - Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems, PART I, Fundamentals and impact of mineral-organic-biota interactions on the formation, transformation, turnover, and storage of natural nonliving organic matter (NOM), New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken, 2009. p. 305-339.

NOBRE, C. P.; HUERTAS, O. C. T.; TARDIN, J. R. F.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; FONSECA, H. M. A. C.; BERBARA, R. L. L. Biostimulation of inoculation with *Glomus proliferum* and application of humic acid in the in vitro growth of *Lunularia cruciata*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 773-778, 2013.

NGUYEN, H.T.; BABU, R.C.; BLUM, A. Breeding for drought resistance in rice: physiological and molecular genetics considerations. **Crop Science**, v. 37, p. 1426-1434, 1997.

NOVOTNY, E. H.; MANTOVANI, E. C.; BONAGAMBA, T. J.; DE AZEVEDO, E. R.; CRUZ, J. C.; BENITES, V. D. M. Aplicação de novas técnicas de ressonância magnética nuclear no estado sólido como metodologia para o estudo da matéria orgânica ambiental-quantificação de estruturas aromáticas condensadas. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, (Embrapa Milho e Sorgo. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 1**), 2004. 22 p.

O'DONNELL, R. W. The auxin-like effects of humic preparations from leonardite. **Soil Science**, v. 116, n. 2, p. 106-112, 1973.

OKAMOTO, M.; KUMAR, A.; LI, W.; WANG, Y.; SIDDIQI, M. Y.; CRAWFORD, N. M.; GLASS, A. D. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*. **Plant physiology**, v. 140, n. 3, p. 1036-1046, 2006.

OJWANG', L. M.; COOK, R. L. Environmental Conditions That Influence the Ability of Humic Acids to Induce Permeability in Model Biomembranes. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 15, p. 8280-8287, 2013.

ORLOV, D. S.; AMMOSOVA, Y. A. M.; GLEBOVA, G. I. Molecular parameters of humic acids. **Geoderma**, v. 13, p. 211-229, 1975.

ORLOV, R. **Humic acids of soils**. Washington-DC: USDA, The National Science Foundation, 1985. 378p.

PACHECO-VILLALOBOS, D.; HARDTKE, C. S. Natural genetic variation of root system architecture from *Arabidopsis* to *Brachypodium*: towards adaptive value. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 367, n. 1595, p. 1552-1558, 2012.

PAUL, E. A. **Soil microbiology, ecology and biochemistry**. Fourth edition. San Diego, CA: Academic press. 2014.

PALMGREN, M. G. Proton gradients and plant growth: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Advances in Botanical Research**, v. 28, n. 1, p. 1-70, 1998.

PALMGREN, M. G.; HARPER, J. F. Pumping with plant P-type ATPases. *Journal of Experimental Botany*, p. 883-893, 1999.

PALMGREN, M. G.; BÆKGAARD, L.; LÓPEZ-MARQUÉS, R. L.; FUGLSANG, A. T. Plasma membrane ATPases. **In:** MURPHY, A. S.; PEER, W.; SCHULZ, B. (Ed.). *The Plant Plasma Membrane*. Plant Cell Monographs. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2011. p. 177-192.

PANDEYA, S. B.; SINGH, A. K.; DHAR, P. Influence of fulvic acid on transport of iron in soils and uptake by paddy seedlings. **Plant and Soil**, v. 198, p. 117-125, 1998.

PASSERA, C.; NICOLAO, L.; FERRETTI, M.; RASCIO, N.; GHISI, R. Effect of humic substances of enzyme-activities of sulfate assimilation and chloroplast ultrastructure of maize leaves. **Photosynthetica**, v. 25, n. 1, p. 39-45, 1991.

PEDERSEN, P.L.; CARAFOLI, E. Ion motive ATPases. **Trends in Biochemical Sciences**, v.12, p.146–150, 1987.

PEI, Z. M.; MURATA, Y.; BENNING, G.; THOMINE, S.; KLÜSENER, B.; ALLEN, G. J.; GRILL, E.; SCHROEDER, J. I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 731, 2000.

PERES, L. E.; MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPLC e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, n. 3, p. 169-176, 1997.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 373-380, 1992.

PICCOLO, A.; CELANO, G.; PIETRAMELLARA, G. Effects of fractions of coal-derived humic substances on seed-germination and growth of seedlings (*Lactuca sativa* and *Lycopersicon esculentum*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 16, n. 1, p. 11-15, 1993.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. **European Journal of Soil Science**, v. 47, n. 3, p. 319-328, 1996a.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. **Chemosphere**, v. 33, p. 595-600, 1996b.

PICCOLO, A.; CONTE, P. Molecular size of humic substances, Supramolecular associations versus macromolecular polymers. **Advances in Environmental Research**, v. 3, n. 4, p. 508-521, 1999.

PICCOLO, A.; CONTE, P.; COZZOLINO, A. Effects of mineral and monocarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. **European Journal of Soil Science**, v. 50, p. 687-694, 1999.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 810-832, 2001.

PICCOLO, A.; COZZOLINO, A.; CONTE, P.; SPACCINI, R. Polymerization of humic substances by an enzyme catalyzed oxidative coupling. **Naturwissenschaften**, v. 87, p. 391-394, 2000.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Advances in Agronomy**, v. 75, p. 57-134, 2002.

PINTON, R.; VARANINI, Z.; VIZZOTTO, G.; MAGGIONI, A. Soil humic substances affect transport properties of tonoplast vesicles isolated from oat roots. **Plant and Soil**, v. 142, p.203-210, 1992.

PINTON, R.; CESCO, S.; SANTI, S.; VARANINI, Z. Effect of soil humic substances on surface redox activity of oat roots. **Journal of plant nutrition**, v. 18, n. 10, p. 2111-2120, 1995.

PINTON, R.; CESCO, S.; SANTI, S.; VARANINI, Z. Soil humic substances stimulate proton release by intact oat seedling roots. **Journal of plant nutrition**, v. 20, n. 7-8, p. 857-869, 1997.

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

PINTON, R.; CESCO, S.; IACOLETTI, G.; ASTOLFI, S.; VARANINI, Z. Modulation of NO₃⁻ uptake by water-extractable humic substances: Involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant and Soil**, v. 215, p. 155-161, 1999a.

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

PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. Role of humic substances in the rhizosphere. **In: SENESI, N.; XING, B.; HUANG, P. M. (Ed.). Volume 2 - Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems, PART I, Fundamentals and impact of mineral-organic-biota interactions on the formation, transformation, turnover, and storage of natural nonliving organic matter (NOM)**, New Jersey: John Wiley & Sons, Hoboken, 2009. p. 341-366.

PIZZEGHELLO, D.; NICOLINI, G.; NARDI, S. Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvatica* L. forests. **New Phytologist**, v. 151, n. 3, p. 647-657, 2001.

PIZZEGHELLO, D.; NICOLINI, G.; NARDI, S. Hormone-like activities of humic substances in different forest ecosystems. **New Phytologist**, v. 155, n. 3, p. 393-402, 2002.

PIZZEGHELLO, D.; TREVISAN, S.; QUAGGIOTTI, S.; REPERTI, B.; PALME, K.; NARDI, S. Effetto di sostanze umiche sullo sviluppo della radice in *Arabidopsis thaliana*. In: XXIV Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria, Alghero-Italy, 2006. p.92.

PRÁT, S.; POSPÍŠIL, F. Humic acids with ^{14}C . **Biologia Plantarum**, v. 1, n. 1, p. 71-80, 1959.

PRESTON, C. M.; NEWMAN, R. H.; ROTHER, P. Using ^{13}C CPMAS NMR to assess effects of cultivation on the organic matter of particle size fractions in a grassland soil. **Soil Science**, v. 157, n. 1, p. 26-35, 1994.

PRIMO, D. C.; MENEZES, R. C.; SILVA, T. O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-13, 2011.

QUAGGIOTTI, S.; RUPERT, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays L.*). **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 803-813, 2004.

QUAN, L. J.; ZHANG, B.; SHI, W. W.; LI, H. Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.50, n.1, p.2-18, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, R: **A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, R Development Core Team. 2013.

RANATHUNGE, K.; EL-KEREAMY, A.; GIDDA, S.; BI, Y-M.; ROTHSTEIN, S.J. *OsAMT1.1* transgenic rice plants with enhanced NH_4^+ permeability show superior growth and higher yield under optimal and suboptimal NH_4^+ conditions. **Journal of Experimental Botany**. v. 65, n. 4, p. 965-979, 2014.

RATAJCZAK, R.; HINZ, G.; ROBINSON, D.G. Localization of pyrophosphatase in membranes of cauliflower inflorescence cells. **Planta**, v. 208, p. 205-211, 1999.

RAUTHAN, B. S.; SCHNITZER, M. Effect of soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumis sativum*) plants. **Plant and Soil**, v.63, p.491-495, 1981.

RAVEN, J. A.; SMITH, F. A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. **New Phytologist**, v. 76, p. 415-431, 1976.

REGENT INSTRUMENTS. WinRHIZO *arabidopsis* 2012b manual. Québec-Canada: Régent Instruments Inc., 2012. 142p.

RÖMHELD, V.; NEUMANN, G. The rhizosphere: Contributions of the soil – root interface to sustainable soil Systems. In: UPHOFF, N.; BALL, A. S.; FERNANDES, E.; HERREN H.; HUSSON O.; LAING M.; PALM C.; PRETTY J.; SANCHEZ P.; SANGINGA N.; THIES J. (Ed.). Biological Approaches to Sustainable soil Systems. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 91-107.

ROSE M.T.; PATTI A.F.; LITTLE, K.R.; BROWN, A.L.; JACKSON W.R.; CAVAGNARO, T.R. A Meta-Analysis and Review of Plant-Growth Response to Humic Substances: Practical Implications for Agriculture. **Advances in Agronomy**, v.124, p. 37-89, 2014.

RUIZ, H. A. Estimativa dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} por uma aproximação gráfico-matemática. **Revista Ceres**, v. 32, p. 79-84, 1985.

RUSSELL, L.; STOKES, A. R.; MACDONALD, H.; MUSCOLO, A.; NARDI, S. Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A2. **Plant and Soil**, v. 283, p. 175-185, 2006.

SAMAL, D.; SADANA, U. S.; GILL, A. A. S. Mechanistic approach to study manganese influx and its depletion in the rhizosphere of wheat and raya. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 34, n. 19-20, p. 3033-3044, 2003.

SAMSON, G.; VISSER, S.S. Surface-active effects of humic acids on potato cell membrane properties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 343-347, 1989.

SANTI, S.; LOCCI, G.; PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. Plasma membrane H^+ -ATPase in maize roots induced for NO_3^- uptake. **Plant Physiology**, v. 109, n. 4, p.1 277-1283, 1995.

SANTI, S.; LOCCI, G.; MONTE, R.; PINTON, R.; VARANINI, Z. Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high affinity nitrate transporter and plasma membrane H^+ -ATPase isoforms. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 389, p. 1851-1864, 2003.

SANTOS, G. de A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênese; 1999, 508p.

SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Metabolismo de nitrogênio em arroz sob níveis decrescentes de nitrato, **Agronomia**, v. 39, n. 1-2, p. 28-33, 2005.

SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Effects of nitrogen stress on proton-pumping and nitrogen metabolism in rice. **Journal of plant Nutrition**, v. 32, p. 549-564, 2009.

SANTOS, L. A.; SANTOS, W. A.; SPERANDIO, M. V. L.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrate uptake kinetics and metabolic parameters in two rice varieties grown in high and low nitrate. **Journal of plant Nutrition**, v. 34, n. 7, p. 988-1002, 2011.

SARAFIAN, V.; KIM, Y.; POOLE, R.J.; REA, P.A. Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphateenergized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, p. 1775-1779, 1992.

SCHIAVON, M.; ERTANI, A.; NARDI, S. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 11800-11808, 2008.

SCHIAVON, M.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; FRANCIOSO, O.; NARDI, S. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). **Journal of chemical ecology**, v. 36, n. 6, p. 662-669, 2010.

SCHMIDT, W.; SCHIKORA, A. Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development. **Plant Physiology**, v.125, p. 2078-2084, 2001.

SCHMIDT, W.; SANTI, S.; PINTON, R.; VARANINI, Z. Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in *Arabidopsis*. **Plant and soil**, v. 300, n. 1-2, p. 259-267, 2007.

SCHMIDT, M. W.; TORN, M. S.; ABIVEN, S.; DITTMAR, T.; GUGGENBERGER, G.; JANSSENS, I. A.; NANNIPIERI, P. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 49-56., 2011.

SEUFFERHELD, M. J.; KIM, K. M.; WHITFIELD, J.; VALERIO, A.; CAETANO-ANOLLÉS, G. Evolution of vacuolar proton pyrophosphatase domains and volutin granules: clues into the early evolutionary origin of the acidocalcisome. **Biology direct**, v. 6, n. 1, p. 50, 2011.

SERRAJ, R.; KRISHNAMURTHY, L.; KASHIWAGI, J. W.; KUMAR, J.; CHANDRA, S.; CROUCH, J. H. Variation in root traits of chickpea (*Cicer arietinum* L.) grown under terminal drought. **Field Crops Research**, v. 88, n. 2-3, p. 115-127, 2004.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M.; RUTH, T. J.; RUFTY, J. R. T. W. Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx. **Plant Physiology**, v. 93, p. 1426-1432, 1990.

SKAGGS, T. H.; SHOUSE, P. J. Roots and root function: introduction. **Vadose Zone Journal**, v. 7, n. 3, p. 1008-1009, 2008;

SILVA, F. L. I. M.; FERNANDES, M. S.; MAGALHÃES, J. R. Study of ionic balance affecting nutrient uptake by corn. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 22, p. 331, 1987.

SIMPSON, A. J.; KINGERY, W. L.; HAYES, M. H.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; DVORTSAK, P.; KERSSEBAUM, R.; GODEJOHANN, M.; HOFMANN, M. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. **Naturwissenschaften**, v.89, n.2, p. 84-88, 2002.

SCHWERTMANN, U. Inhibitory effect of soil organic matter on the crystallization of amorphous ferric hydroxide. **Nature**, v. 212, p. 645-646, 1966.

SEQUI, P.; GUIDI, G.; PETRUZZELLI, G. Influence of metals on solubility of soil organic matter. **Geoderma**, v. 13, p. 153-161, 1975.

SLADKÝ, Z. The effect of extracted humus substances on growth of tomato plants. **Biologia Plantarum**, v.1, p.142-150, 1959.

SLADKÝ, Z.; TICHÝ, V. Applications of humus substances to over ground organs of plants. **Biologia Plantarum**, v.1, p.9-15, 1959.

SONDERGAARD, T.E.; SCHULZ, A.; PALMGREN, M.G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, v. 136, p.2475-2482, 2004.

SONG, G.; NOVOTNY, E.H.; SIMPSON, A.J.; CLAPP, C.E.; HAYES, M.H.B. Sequential exhaustive extraction of a Mollisol soil, and characterizations of humic components, including humin, by solid and solution state NMR. **European journal of soil Science**, v. 59, n. 3, p. 505-516, 2008.

SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; VON WIRÉN, N.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p. 726-734, 2003.

SORGONA, A.; LUPINI, A.; MERCATI, F.; DI DIO, L.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M. R. Nitrate uptake along the maize primary root: an integrated physiological and molecular approach. **Plant, cell & environment**, v. 34, n. 7, p. 1127-1140, 2011.

SOUSA, S.M.; CLARK, R.T.; MENDES, F.F.; DE OLIVEIRA, A.C.; DE VASCONCELOS, M.J.V.; PARENTONI, S.N.; MAGALHÃES, J.V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 11, p. 925-935, 2012.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. **In: FERNANDES, M.S. (Ed.). Nutrição Mineral de plantas**, Vicosa: SBCS, 2006. p. 215-252.

SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Molecular characterisation of compost at increasing stages of maturity. II: Thermochemolysis-GC-MS and ¹³C-CPMAS-NMR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2303-2311, 2007.

SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; FERNANDES, M. S.; DE SOUZA, S. R. Isoforms of plasma membrane H⁺-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO₃⁻ or NH₄⁺. **Plant Science**, v. 180, n. 2, p. 251-258, 2011.

SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; DE ARAÚJO, O. J. L.; BRAGA, R. P.; COELHO, C. P.; DE MATOS NOGUEIRA, E.; FERNANDES, M. S.; DE SOUZA, S. R. Response of nitrate transporters and PM H⁺-ATPase expression to nitrogen flush on two upland rice varieties contrasting in nitrate uptake kinetics. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 4, p. 568, 2014.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: Genesis, composition, reactions**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1994. 496p.

STEEL, R.; TORRY, J.; DICKEY, D. **Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach**. Third Edition, 1997. 178p.

SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: The new view. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 23, p. 9009-9015, 2005.

SWIFT, R. S. Organic matter characterization. **In:** SPARKS, D. L. (Ed.). *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*. Madison, WI: Soil Science Society of America, 1996. p. 1018-1020.

TAN, K. H. **Humic Matter in Soil and the Environment: principles and controversies**. Boca Raton, FL: CRC Press. 2014. 495p.

TOMASI, N.; MONTE, R.; RIZZARDO, C.; VENUTI, S.; ZAMBONI, A.; CESCO, S.; PINTON, R.; VARANINI, Z. Effects of water-extractable humic substances on molecular physiology of nitrate uptake in two maize inbred lines with different nitrogen use efficiency. **In:** *Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI*. 2009. p. 1-5.

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

TREVISAN, S.; BOTTON, A.; VACCARO, S.; VEZZARO, A.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S. Humic substances affect *Arabidopsis* physiology altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, p. 45-55, 2011.

TURANO, F.J.; DASHNER, R.; UPADHYAYA, A.; CALDWELL, C.R. Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. **Plant Physiology**, v.112, p.1357-1364, 1996.

VAN DE VENTER, H.A.; FURTER, M.; DEKKER, J.; CRONJE, I. J. Stimulation of seedling root growth by coal-derived sodium humate. **Plant and Soil**, v. 138, p. 17-21, 1991.

VARANINI, Z.; PINTON, R.; DE BIASI, M.G.; ASTOLFI, S.; MAGGIONI, A. Low molecular weight humic substances stimulated H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. **Plant and Soil**, v. 153, p. 61-69, 1993.

VARANINI, Z.; PINTON, R. Humic substances and plant nutrition. **In:** LÜTTGE, U. (Ed.). *Progress in Botany*, v.56. Berlin:Springer, 1995. p. 97-117.

VARANINI, Z.; PINTON, R. Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. **In:** PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *The Rhizosphere*, Basel:Marcel Dekker, 2001. p.141-158.

VASCONCELOS, A.C.F.; ZHANG, X.; ERVIN, E.H.; CASTRO, J.K. Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. **Scientia Agricola**, v.66, n.3, p.395-402, 2009.

VAUGHAN, D. The stimulation of invertase development in aseptically stored tissue slices by humic acids. **Soil Biology and Biochemistry**, v.1, n.1, p.15-28, 1967a.

VAUGHAN, D. Effect of humic acid on the development of invertase activity in slices of beet root tissues washed under aseptic conditions. **Humus et Planta**, v.4, p.268-271, 1967b.

VAUGHAN, D.; BAKER, C.D.; WILLOUGHBY, L.G. Some aspects of humic acid on two different biological systems. **Plant and Soil**, v.40, p.429-434, 1974a.

VAUGHAN, D.; CHESHIRE, M.V.; MUNDIE, C.M. Uptake by beet root tissue and biological activity of ¹⁴C-labelled fractions of soil organic matter. **Biochemical Society Transactions**, v.2, n.1, p.126-129, 1974b.

VAUGHAN, D.; LINEHAN, D.J. The growth of wheat plants in humic acid solutions under axenic conditions. **Plant and Soil**, v.44, p.445-449, 1976.

VAUGHAN, D.; MALCOM, R.E. Influence of humic substances on growth and physiological processes. **In: VAUGHAN, D.; MALCOM, R.E. (Ed.). Soil organic matter and biological activity**, Dordrecht: Martinus Nijhoff/Junk W, 1985. p.37-76.

VAUGHAN, D.; ORD, B.G. Uptake and incorporation of ¹⁴C-labelled soil organic matter by roots of *Pisum sativum* L. **Journal of Experimental Botany**, v.32, n.4, p.679-687, 1981.

VIANELLO, A.; MACRÌ, F. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at the surface of plant cells. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.23, n.3, p.409-423, 1991.

VISSER, S.A. Effect of humic substances on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. **Science of the Total Environment**, v.62, p.347-354, 1987.

VITART, V.; BAXTER, I.; DOERNER, P.; HARPER, J. F. Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H⁺-ATPase in the root endodermis. **The Plant Journal**, v.27, n.3, p.191-201, 2001.

VON WIRÉN, N.; GAZZARRINI, S.; GOJON, A.; FROMMER, W.B. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.254-261, 2000.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v.63, p.153-182, 2012.

YAMAUCHI, A.; KONO, Y.; TATSUMI, J. Comparison of root system structures of 13 species of cereals. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 56, n. 4, p.618-631, 1987.

YAMAUCHI, Y.; PARDALES, J.R.; KONO, Y. Root system structure and its relation to stress tolerance. **In: ITO, O.; KATAYAMA, K.; JOHANSEN, C.; KUMAR-RAO, J.V.D.K.; ADUGYAMIF, J.; REGO, T. J. (Ed.). Roots and Nitrogen in Cropping Systems of the Semi-Arid Tropics**. Tsukuba, Japan: JIRCAS Publication, 1996. p.211-234.

YAMBAO, E.B.; INGRAM, K.T.; REAL, J.G. Root xylem influence on the water relations and drought resistance of rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, n. 7, p.925-932, 1992.

YAN, F.; ZHU, Y.; MÜLLER, C.; ZÖRB, C.; SCHUBERT, S. Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺ ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. **Plant physiology**, v.129, n.1, p.50-63, 2002.

YAN, M.; FAN, X.; FENG, H.; MILLER, A.J.; SHEN, Q.; XU, G. Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. **Plant, Cell & Environment**, v. 34, n. 8, p.1360-1372, 2011.

YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of amino-acid with ninhydrin, **Analytical Biochemistry**, v.80, p.209-213, 1955.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone, **Biochemistry**, v.57, p.508-514, 1954.

YOSHIDA, S.; BHATTACHARJEE, D.P.; CABUSLAY, G.S. Relationship between plant type and root growth in rice. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 28, n. 4, p.473-482, 1982.

YUE, G.; SUI, Z.; GAO, Q.; ZHANG, J. Molecular cloning and characterization of a novel H⁺-translocating pyrophosphatase gene in *Zea mays*. **DNA Sequence**, v.19, n.2, p.79-86, 2008.

WANG, H.; INUKAI, Y.; YAMAUCHI, A. Root development and nutrient uptake. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 3, p.279-301, 2006.

ZANDONADI, D.B.; CANELLAS, L.P.; FACANHA, A.R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺-pumps activation. **Planta**, v.225, p.1583-1595, 2007.

ZANDONADI, D.B.; SANTOS, M.P.; DOBBSS, L.B.; OLIVARES, F.L.; CANELLAS, L.P.; BINZEL, M.L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L.; FAÇANHA, A.R. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. **Planta**, v.231, n.5, p.1025-1036, 2010.

ZANDONADI, D. B.; SANTOS, M. P.; BUSATO, J. G.; PERES, L. E. P.; FAÇANHA, A. R.. Plant physiology as affected by humified organic matter. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v.25, n.1, p.13-25, 2013.

ZHAO, F. Y.; ZHANG, X. J.; LI, P. H.; ZHAO, Y. X.; ZHANG, H. Co-expression of the Suaeda salsa SsNHX1 and Arabidopsis AVP1 confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single SsNHX1. **Molecular Breeding**, v.17, n.4, p.341-353, 2006.

9. ANEXOS

Anexo A1. Estatística descritiva de 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 24h até 144h em plântulas de arroz var, piaui sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água.

	Var	Média	Mínimo	Máximo	DP	Variância		Média	Mínimo	Máximo	DP	Variância		Média	Mínimo	Máximo	DP	Variância
	L	211,93	73,00	354,37	74,60	5565,54		374,2	191,2	611,4	93,6	8765,6		583,73	325,63	1009,55	147,61	21789,68
	A	244,91	87,65	404,57	75,51	5701,05		424,0	231,0	716,1	100,7	10148,1		611,92	363,48	982,68	126,97	16120,72
	D	3,75	3,18	5,93	0,40	0,16		3,7	2,8	5,6	0,6	0,3		3,38	2,74	3,98	0,25	0,06
	V	22,77	8,38	47,98	7,12	50,76		39,1	21,9	80,7	13,2	175,5		51,32	30,31	76,12	9,30	86,55
	T	111,49	57,00	217,00	41,02	1682,40		158,2	57,0	301,0	52,6	2771,3		237,06	132,00	449,00	60,97	3717,35
	F	151,11	56,00	296,00	66,99	4487,36		216,3	63,0	407,0	80,1	6420,4		325,35	126,00	614,00	97,67	9539,03
	L1	55,29	8,07	132,47	30,76	946,31		110,3	25,3	245,2	47,9	2291,3		192,64	47,68	411,44	74,61	5567,33
	L2	43,18	10,84	94,41	23,11	534,24		87,4	33,9	176,0	33,3	1108,8		140,47	42,90	319,77	52,59	2765,85
2d	L3	96,55	34,63	154,16	23,75	563,98	3d	151,7	104,3	217,8	29,3	859,3	4d	217,25	115,84	316,44	37,50	1406,48
	A1	16,96	1,58	43,98	9,70	94,18		34,8	8,4	73,2	14,7	217,4		61,06	15,22	135,15	23,61	557,44
	A2	29,33	7,55	63,36	14,96	223,74		58,9	22,1	114,4	22,7	513,1		95,33	27,52	215,20	35,13	1233,99
	A3	154,90	55,94	262,66	42,43	1800,58		247,0	149,5	416,4	60,0	3596,3		339,56	179,33	484,82	62,94	3961,50
	V1	0,44	0,03	1,23	0,26	0,07		0,9	0,2	1,9	0,4	0,1		1,64	0,42	3,73	0,63	0,40
	V2	1,71	0,40	3,77	0,83	0,70		3,4	1,1	6,5	1,4	1,9		5,52	1,53	12,12	2,02	4,06
	V3	21,25	7,44	38,14	7,27	52,79		34,1	17,5	69,1	11,0	121,5		44,70	23,66	67,86	9,57	91,54
	T1	51,64	22,00	105,00	19,63	385,49		70,8	17,0	133,0	25,9	670,7		114,02	59,00	205,00	32,11	1031,10
	T2	15,58	2,00	34,00	6,63	43,99		24,5	11,0	46,0	8,4	70,0		34,25	14,00	64,00	10,30	106,09
	T3	10,00	2,00	20,00	4,79	22,93		10,3	3,0	28,0	4,9	23,7		12,36	3,00	27,00	5,45	29,72

Anexo A2. Continuação da estatística descritiva de 18 variáveis radiculares mensuradas em intervalos de 24h até 144h em plântulas de arroz var, piaui sob doses crescentes de ácido húmico extraído com água.

	Var	Média	Mínimo	Máximo	DP	Variância		Média	Mínimo	Máximo	DP	Variância
	L	719,98	387,68	1120,05	174,55	30466,95		865,9	509,7	1420,5	208,7	43574,6
	A	740,44	464,11	1138,18	151,09	22828,11		868,7	570,8	1323,5	173,9	30257,7
	D	3,31	2,81	4,03	0,26	0,07		3,2	2,6	3,8	0,2	0,1
	V	60,96	39,34	93,35	11,56	133,62		69,8	46,6	114,5	13,1	171,7
	T	314,20	171,00	449,00	72,58	5267,96		399,5	223,0	629,0	96,7	9351,6
	F	412,37	166,00	666,00	121,90	14860,53		518,2	230,0	880,0	151,3	22895,9
	L1	250,47	53,75	472,13	96,02	9219,29		322,2	104,1	634,8	127,3	16212,0
	L2	169,08	56,84	309,31	54,06	2923,02		214,1	113,7	349,0	54,8	3001,0
5d	L3	255,37	161,67	373,77	42,46	1802,61	6d	283,9	156,8	404,5	51,1	2611,8
	A1	78,39	17,09	146,49	29,76	885,41		100,0	33,1	200,4	38,2	1459,2
	A2	116,60	39,09	203,33	36,74	1349,78		152,3	86,3	243,6	36,6	1342,6
	A3	396,30	243,42	585,52	73,13	5347,35		436,1	252,1	637,2	86,9	7544,5
	V1	2,08	0,47	3,84	0,78	0,61		2,6	0,9	5,3	1,0	1,0
	V2	6,89	2,38	12,62	2,19	4,80		9,3	5,5	14,5	2,2	4,7
	V3	51,78	27,72	75,25	11,00	120,89		56,5	33,4	84,9	13,1	171,1
	T1	156,10	62,00	249,00	41,29	1704,71		224,3	101,0	384,0	62,6	3921,0
	T2	46,66	21,00	89,00	13,42	180,20		63,0	24,0	118,0	18,7	349,4
	T3	13,98	3,00	28,00	5,28	27,85		14,2	5,0	36,0	5,2	27,4