

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**QUÍMICA AGRÁRIA**

**TESE**

**Efeitos de Ácidos Húmicos e Óxido Nítrico no Crescimento  
e Metabolismo de Raízes Transformadas de Manjeriço  
(*Ocimum basilicum* L.)**

**Flávio Couto Cordeiro**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
QUÍMICA AGRÁRIA**

Efeitos de Ácidos Húmicos e Óxido Nítrico no Crescimento e Metabolismo de Raízes Transformadas de Manjerição (*Ocimum basilicum* L.)

**FLÁVIO COUTO CORDEIRO**

*Sob a orientação da Professora*  
**Sonia Regina de Souza**

*e Co-orientação da Professora*  
**Rosane Nora Castro**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Agrária

Seropédica, RJ  
Agosto de 2010

número  
código  
T

Cordeiro, Flávio Couto, 1979- **Efeitos dos Ácidos Húmicos e do Óxido Nítrico no Crescimento e Metabolismo de Raízes Transformadas de Manjeriço (*Ocimum basilicum L.*)**

/ Flávio Couto Cordeiro – 2010.

XX f. : il.

Orientador: Sonia Regina de Souza.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. XX-XX

1. Química - Teses. 2. Ácido Húmico – Teses. 3. Óxido Nítrico – Teses. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX. I. Souza, Sonia Regina de, 1962-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

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

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
QUÍMICA AGRÁRIA**

**FLÁVIO COUTO CORDEIRO**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Agrária.

TESE APROVADA EM 25/08/2010

---

Dra. Sonia Regina de Souza, UFRRJ

---

Dr. David Vilas Boas de Campos, Embrapa CNPS

---

Dr. Ednaldo da Silva Araújo, Embrapa CNPAB

---

Dr. Luiz Mors Cabral, UFF

---

Dr. Victor Marcos Rumjanek, UFRRJ

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a vida, fortalecendo-me espiritualmente para colocar a ciência em prática, abençoando e protegendo minha vida para conseguir esta realização e colocar as pessoas certas para fazerem parte da minha caminhada durante esses anos.

À minha orientadora, Sonia Regina de Souza, pelos preciosos ensinamentos, permanente apoio, incentivo, paciência e, acima de tudo, pela amizade ao longo de nossa convivência, acreditando neste trabalho e principalmente em mim, não só por essa tese, mas também pelo meu crescimento profissional alcançado nesta jornada, muito obrigado.

À Mariam Lis, minha querida amiga, pela amizade, incentivo e valiosos conselhos, que foram fundamentais para a elaboração desta tese, além do apoio incondicional ao meu crescimento profissional, agradeço por tudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química, pelo compartilhamento de seus conhecimentos comigo, em especial a professora Rosane Nora Castro.

Aos professores Claudete Santa-Catarina e Vanildo Silveira, por abrirem às portas do seu laboratório na UENF, pela amizade, dedicação e paciência, nas horas e horas de microscopia, apostando neste trabalho, me ensinando técnicas fundamentais para a elaboração e enriquecimento desta tese, muito obrigado.

Ao professor Marcos Gervásio Pereira do Departamento de Solos da UFRRJ que desde o mestrado, quando fui seu orientado, tem contribuído e apoiado meu crescimento científico.

Aos professores David Vilas Boas de Campos, Ednaldo da Silva Araújo, Luiz Mors Cabral e Victor Marcos Rumjanek por terem aceitado o convite para comporem a banca examinadora de tese, o que muito me gratifica.

Aos grandes amigos da Química Analítica, professores Cristina, Evelton, Leila e Otavio e aos técnicos André e Vagner pela amizade, companheirismo e excelente ambiente de trabalho.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica de Plantas e Nutrição Mineral de Plantas.

Ao amigo David, pela amizade e incentivo, acreditando no meu potencial, sempre me convidando para dar palestras sobre o tema desta tese.

Aos amigos Duda e Gláucio, pela amizade e compreensão nos momentos de minha ausência durante este período.

Ao amigo Leonardo Barros Dobbss, pela amizade, acolhida em sua casa em Campos e ajuda na extração das substâncias húmicas para a elaboração desta tese.

À minha família, pelo apoio incondicional desde o começo desta jornada, sempre acreditando no meu potencial e pela compreensão nos momentos de minha ausência, que foram muitos, mas que foram imprescindíveis para a elaboração desta tese, muito obrigado.

À minha amada Daiana, que me mostrou uma nova forma de ver a vida, que tem me apoiado, incentivado e também por agüentar os momentos de estresse e compreender os momentos de minha ausência para a elaboração desta tese, obrigado simplesmente pelo fato de existir.

A CAPES, pela concessão da bolsa, tornando possível este trabalho.

## RESUMO

CORDEIRO, F.C. **Efeitos de Ácidos Húmicos e Óxido Nítrico no Crescimento e Metabolismo de Raízes Transformadas de *Ocimum basilicum* L.** 2010. 100p Tese (Doutorado em Química, Química Agrária). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Foi realizado um estudo de caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos extraídos de solos (AH1-Latossolo Vermelho-Amarelo, AH2-Chernossolo Háplico e AH3-Organossolo Háplico) (Experimento 1), para verificar a diferença entre estes ácidos húmicos. De acordo com o espectro de IV – TF, não houve diferença significativa entre os ácidos húmicos extraídos dos três solos estudados. O índice de condensação e de hidrofobicidade que expressão o grau de humificação dos solos demonstraram que os ácidos húmicos provenientes dos solos estudados são bastante estáveis e resistentes a degradação oxidativa. Posteriormente foi realizado um experimento (Experimento 2), com o objetivo de avaliar os parâmetros de crescimentos de raízes transformadas de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) tratadas com os ácidos húmicos extraídos dos diferentes solos estudados e também com nitroprussiato de sódio (SNP), como doador de óxido nítrico (NO), nas doses de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mM de Carbono L<sup>-1</sup> e 0, 0,1, 10, 50, 100 e 200 µM de SNP L<sup>-1</sup> de meio de cultura, respectivamente, com avaliações realizadas na montagem, 5 e 15 dias de experimento. Verificou-se que a dose de 3mM de Carbono L<sup>-1</sup> para os ácidos húmicos e a dose de 100 µM de SNP L<sup>-1</sup> (óxido nítrico) foram as doses que proporcionaram as melhores respostas nos parâmetros de crescimento. Com os resultados obtidos nesse experimento foram montados mais dois ensaios, o primeiro (Experimento 3), com o objetivo de avaliar o metabolismo do nitrogênio, as respostas das bombas de prótons, atividade da enzima catalase e a histolocalização de NO e de espécies reativas de oxigênio (ROS) *in vivo* nas raízes transformadas de manjerição, coletadas aos 5 e 15 dias após a montagem do experimento. O segundo ensaio (Experimento 4) teve o objetivo de avaliar a histolocalização de NO e de ROS *in vivo*, e a atividade de enzimas importantes envolvidas no crescimento e absorção de nutrientes, sendo este ensaio coletado após seis horas de tratamento. As raízes foram tratadas com duas concentrações de nitrato, uma dose baixa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5mM) e outra alta (5,0mM), nas quais foram adicionadas as substâncias bioativas (3mM de Carbono L<sup>-1</sup> de AH3 e 100 µM de SNP L<sup>-1</sup>). Para todos os parâmetros de crescimento radicular avaliados, os tratamentos com ácidos húmicos e óxido nítrico apresentaram maiores sobre o crescimento radicular, em relação ao controle. Além disso, conforme a avaliação dos parâmetros do metabolismo do nitrogênio nas duas doses testadas de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, as substâncias bioativas proporcionaram aumento de atividades enzimáticas e conteúdo de nutrientes, em relação aos controles, principalmente na dose mais baixa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Já é consenso na comunidade científica que a bioatividade dos ácidos húmicos está relacionada principalmente com a presença de moléculas análogas a auxina e possivelmente com outros fitormônios. A geração de óxido nítrico em plantas está relacionada ao crescimento de raízes, e este crescimento pode ser proporcionado pela produção endógena de auxina, pela aplicação de análogos sintéticos auxínicos ou aplicação de ácidos húmicos. Dessa forma a sinalização de óxido nítrico pode estar relacionada à bioatividade dos ácidos húmicos. Estes efeitos foram evidenciados, pelo aumento do crescimento radicular, absorção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ativação de da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática em raízes transformadas de manjerição. Do mesmo modo, foi observado o aumento da atividade da catalase, enzima relacionada ao crescimento de raiz, por proporcionar a dismutação do peróxido de hidrogênio, produzidos nos processos de diferenciação e expansão celular. Do mesmo modo, foi observado aumento na detecção de

ROS *in vivo*, com os tratamentos com as substâncias bioativas. Nossos resultados indicam que a utilização de ácidos húmicos poderão servir como uma ferramenta biotecnológica, na produção de fertilizantes organominerais, para o cultivo de plantas em solos de baixa fertilidade e também como componentes na produção de inoculantes de microrganismos benéficos.

**Palavras-chave:** Ácido Húmico, Espécies Reativas de Oxigênio, Óxido Nítrico

## ABSTRACT

CORDEIRO, F.C. **Humic Acid and Nitric Oxide Effects on Growth and Metabolism of Transforms Hairy Roots Basil (*Ocimum basilicum* L.)**. 2010. 100p Thesis (Ph.D. in Chemistry, Agricultural Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

A study carried out of chemical and spectroscopic characterization in humic acids extracted from soils (AH1-Red-Yellow Latosols (Oxisols); AH2-Haplic Chernosol and AH3-Haplic Organosols (Histosols)) (Experiment 1) to verify the difference between these humic acids. Subsequently an experiment was performed (Experiment 2), to evaluate the parameters of growth of transformed roots of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) treated with the humic acids extracted from different soils and with sodium nitroprusside (SNP) as a donor of nitric oxide (NO) at doses of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 mM Carbon L<sup>-1</sup> and 0, 0.1, 10, 50, 100 and 200 μM SNP L<sup>-1</sup> medium, respectively, with assessments conducted in the assembly, 5 and 15 days of experiment. It was found that the dose of carbon 3mM L<sup>-1</sup> for the humic acids and the dose of 100 μM SNP L<sup>-1</sup> (nitric oxide) were the doses provided the best responses in growth parameters. With the results of this study were mounted two more tests, the first (Experiment 3), to evaluate the nitrogen metabolism, the responses of proton pumps, catalase activity and NO histolocalization and reactive oxygen species (ROS) *in vivo* in roots transformed basil, collected at 5 and 15 days after installation of the experiment. The second trial (Experiment 4) was to evaluate the NO and ROS histolocalization *in vivo*, and the activity of important enzymes involved in the growth and nutrient uptake, and this essay collected six hours after treatment. The roots were treated with two concentrations of nitrate, a low dosage of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0.5 mM) and high (5.0 mM) were added in which the bioactive substances (AH3-3mM Carbon L<sup>-1</sup> and 100 μM SNP L<sup>-1</sup>). In all parameters evaluated root growth, the treatments with humic acid and nitric oxide showed higher growth compared to control. Moreover, the evaluation of the parameters of nitrogen metabolism in the two tested doses of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. bioactive substances provided with increased enzyme activities and nutrient content, compared to controls, especially at the lower dose of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. It is a consensus among scientists that the bioactivity of humic acid is mainly related to the presence of molecules similar to auxin and possibly other hormones. The generation of nitric oxide in plants is related to root growth and this growth can be provided by endogenous production of auxin by application of synthetic auxin analogs or application of humic acids. Thus the signaling of nitric oxide may be related to the bioactivity of humic acids. These effects were evidenced by the increase of root growth, uptake N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> of -activation of H<sup>+</sup>-ATPase plasma membrane in transformed roots of basil. Similarly, we observed increased activity of catalase, an enzyme related to root growth, by providing the dismutation of hydrogen peroxide produced in the processes of cell differentiation and expansion as well as to detect ROS *in vivo*, increased in treatments with bioactive substances. With the results in this thesis can give the use of humic acids may serve as a biotechnological tool in the production of biofertilizers fertilizers, for growing plants in soils of low fertility and also as components in the production of inoculants of beneficial microorganisms.

**Keywords:** Humic Acid, Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide

## ABREVIACOES E SMBOLOS

AF	cido Fúlvico
AH	cido Húmico
ATP	Adenosina Trifosfato
cPTIO	2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-xido
DAF-FM-DA	4,5-diacetato de diaminofluorescena
DAR	Dias Após Repicagem
E4/E6	ndice de Humificação
<i>g</i>	Gravidade
GOGAT	Glutamato Sintase
GS	Glutamina Sintetase
H	Hidrognio
H <sup>+</sup>	Próton
H <sup>+</sup> -PPase	Próton pirofosfatase vacuolar
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
IC	ndice de Condensação
IH	ndice de Hidrofobicidade
IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier
MM	Meio Mínimo
MP	Membrana Plasmática
NiR	Nitrito Redutase
NO	xido Nítrico
NR	Nitrato Redutase
P-H <sup>+</sup> -ATPase	Próton ATPase de membrana plasmática
Pi	Fosfato Inorgânico
PPi	Pirofosfato
ppm	Partes por milhão
SNP	Nitroprussiato de sódio
SH	Substâncias Húmicas
UV-Vis	Ultravioleta Visível
v/v	Razão volume por volume
V-H <sup>+</sup> -ATPase	Próton ATPase vacuolar

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Resumo das vias de síntese do ácido indol-3-il-acético, dependente e independente do triptofano.....	10
<b>Figura 2.</b> Teoria quimiosmótica, demonstrando o transporte passivo e ativo de auxina nos compartimentos celulares (Adaptado de Davies, 1995). .....	11
<b>Figura 3.</b> Respostas promovidas pela acidificação da parede celular e conseqüente crescimento das células de plantas, ocasionadas por auxina (Adaptado de Raven et al., 2001).....	12
<b>Figura 4.</b> Via da sinalização promovida por auxina. ....	14
<b>Figura 5.</b> Modelo estrutural do Ácido Húmico (A) (STEVENSON, 1982) e Ácido Fúlvico (B) (BUFFLE et al., 1977). .....	15
<b>Figura 6.</b> Estrutura para o ácido húmico proposta por Dragunov's e reportada por Kononova em 1966. ....	16
<b>Figura 7.</b> Estrutura hipotética para o ácido húmico segundo Flaig (1975). ....	16
<b>Figura 8.</b> Estrutura proposta por Schnitzer & Khan (1972) para o ácido fúlvico. ....	16
<b>Figura 9.</b> Estrutura proposta para o ácido húmico por Schulten (1995).....	17
<b>Figura 10.</b> Modelo estrutural de ácido húmico baseado no arranjo supramolecular, proposto por Piccolo (1996) e adaptado por Canellas e colaboradores (2005). ....	17
<b>Figura 11.</b> Mecanismos de formação das substâncias húmicas (Adaptado de Stevenson, 1994). .....	18
<b>Figura 12.</b> A acidificação da rizosfera das plantas promove o rearranjo das moléculas presentes na supra-estrutura dos ácidos húmicos, permitindo a liberação de moléculas com atividade auxínica, causando o crescimento das raízes e parte aérea. ....	22
<b>Figura 13.</b> Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) dos ácidos húmicos estudados. ....	37
<b>Figura 14.</b> Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos sobre a densidade de sítios mitóticos de raízes transformadas de manjerição. ....	39
<b>Figura 15.</b> Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e óxido nítrico sobre a densidade de sítios mitóticos de raízes transformadas de manjerição. ....	40
<b>Figura 16.</b> Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos sobre o comprimento radicular de raízes transformadas de manjerição. ....	42
<b>Figura 17.</b> Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e óxido nítrico sobre o comprimento radicular de raízes transformadas de manjerição.....	43

<b>Figura 18.</b> Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos sobre a área radicular de raízes transformadas de manjeriço. ....	44
<b>Figura 19.</b> Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e óxido nítrico sobre a área radicular de raízes transformadas de manjeriço. ....	45
<b>Figura 20.</b> Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e óxido nítrico sobre o incremento radicular de raízes transformadas de manjeriço. ....	46
<b>Figura 21:</b> Efeito de diferentes doses de ácido húmico e de óxido nítrico no crescimento de raízes transformadas de manjeriço, aos 15 dias após o tratamento. ....	46
<b>Figura 22.</b> Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos sobre a área de acidificação radicular de raízes transformadas de manjeriço.....	48
<b>Figura 23.</b> Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e óxido nítrico sobre a área de acidificação radicular de raízes transformadas de manjeriço. ....	48
<b>Figura 24.</b> Correlação de Pearson dos parâmetros de crescimento de Raízes Transformadas de Manjeriço. ....	49
<b>Figura 25.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da nitrato redutase em raízes transformadas de manjeriço. ....	50
<b>Figura 26.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico no teor de nitrato em raízes transformadas de manjeriço. ....	51
<b>Figura 27.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico no teor de amónio em raízes transformadas de manjeriço. ....	52
<b>Figura 28.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico no teor de açúcares solúveis em raízes transformadas de manjeriço. ....	53
<b>Figura 29.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico no teor de N-amino livre em raízes transformadas de manjeriço. ....	54
<b>Figura 30.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da glutamina sintetase em raízes transformadas de manjeriço. ....	55
<b>Figura 31.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da catalase em raízes transformadas de manjeriço.. ....	56
<b>Figura 32.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da P H <sup>+</sup> -ATPases em raízes transformadas de manjeriço. ....	57
<b>Figura 33.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da V H <sup>+</sup> -ATPase em raízes transformadas de manjeriço. ....	58

<b>Figura 34.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da $H^+$ -PPase em raízes transformadas de manjeriço. ....	59
<b>Figura 35.</b> Correlação de Pearson dos parâmetros do metabolismo de N das Raízes Transformadas de Manjeriço. ....	60
<b>Figura 36.</b> Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico no incremento radicular relativo (comprimento radicular) de raízes transformadas de manjeriço.....	61
<b>Figura 37.</b> Efeito da incubação com AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono $L^{-1}$ ) e SNP como doador de NO (100 $\mu$ M SNP $L^{-1}$ de solução) nos níveis endógenos de NO em ápice radicular de raízes transformadas de manjeriço.....	63
<b>Figura 38.</b> Efeito da incubação com AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono $L^{-1}$ ) e NO- Nitroprussiato de Sódio (SNP) como doador de óxido nítricoNO (100 $\mu$ M SNP $L^{-1}$ de solução) nos níveis endógenos de ROS (espécies reativas de oxigênio) em ápice radicular de raízes transformadas de manjeriço.....	64
<b>Figura 39.</b> Efeito do ácido húmico na atividade da nitrato redutase de raízes transformadas de manjeriço durante 24 horas. ....	68
<b>Figura 40.</b> Atividade da Nitrato Redutase (A), Atividade da Catalase (B), Atividade das Bombas de Prótons [P $H^+$ -ATPase (C); V $H^+$ -ATPase (D); $H^+$ -PPase (E)] de raízes transformadas de manjeriço coletadas 6 horas após a adoção dos tratamentos.....	68
<b>Figura 41.</b> Efeito da incubação com AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono $L^{-1}$ ) e SNP) como doador de NO (100 $\mu$ M SNP $L^{-1}$ de solução) nos níveis endógenos de NO em ápice radicular de raízes transformadas de manjeriço.....	70
<b>Figura 42.</b> Efeito da incubação com AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono $L^{-1}$ ) e SNP) como doador de NO (100 $\mu$ M SNP $L^{-1}$ de solução) nos níveis endógenos de ROS (espécies reativas de oxigênio) em ápice radicular de raízes transformadas de manjeriço. ....	71

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Análise de rotina dos três solos estudados. ....	34
<b>Tabela 2.</b> Teores de carbono das frações da matéria orgânica (Ácido Fúlvico, Ácido Húmico e Humina) de amostras de solos estudados. ....	34
<b>Tabela 3.</b> Valores de composição elementar, as suas relações atômicas, acidez total, carboxílica, fenólica e da relação $E_4/E_6$ dos ácidos fúlvicos e húmicos das amostras de terra provenientes dos solos estudados. ....	35

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	4
<b>2.1. Raízes transformadas</b>	4
<b>2.2 Absorção de Nutrientes pelas Células Vegetais</b>	5
2.2.1 Absorção e Assimilação de Nitrato em Raízes	6
2.2.2 Bombas eletrogênicas	7
2.2.2.1 P H <sup>+</sup> -ATPase	7
2.2.2.2 V H <sup>+</sup> -ATPase	7
2.2.2.3 H <sup>+</sup> -PPase	8
<b>2.3 Hormônios Vegetais</b>	9
2.3.1. Auxinas	9
2.3.2. Síntese de AIA	10
2.3.3. Transporte de Auxinas	10
2.3.4. Teoria do Crescimento Ácido	12
2.3.5. Sinalização promovida por auxinas	13
<b>2.4 Substâncias Húmicas e Matéria Orgânica do Solo</b>	13
2.4.1 Origem e Formação das Substâncias Húmicas	18
2.4.2 Dinâmica da Absorção das Frações Solúveis da Matéria Orgânica	19
2.4.3 Efeitos Fisiológicos dos Ácidos Húmicos em Plantas	20
<b>2.5 Óxido Nítrico</b>	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	24
<b>3.1 Experimento 1: Extração e caracterização da matéria orgânica humificada dos solos</b>	24
<b>3.2 Experimento 2: Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e de óxido nítrico no crescimento de raízes transformadas de manjeriço</b>	25
3.2.1. Material vegetal e condições de crescimento e tratamentos	25
3.2.2. Delineamento experimental e análise estatística	25
3.2.3. Avaliações realizadas	25
3.2.3.1. Mensuração do crescimento radicular	25
3.2.3.2. Frequência de sítios mitóticos	25
3.2.3.3. pH Rizosférico	26
<b>3.3 Experimento 3: Efeitos do ácido húmico e do óxido nítrico submetido a duas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no crescimento de raiz, metabolismo do nitrogênio, atividade das bombas de prótons, catalase e histolocalização radicular de NO e ROS em raízes transformadas de manjeriço</b>	26
3.3.1. Material vegetal e condições de crescimento e tratamentos	27
3.3.2. Delineamento experimental e análise estatística	27
3.3.3. Determinações realizadas	27
3.3.3.1.1 Isolamento de vesículas de plasmalema e tonoplasto para atividade das bombas de prótons	28
3.3.3.1.2 Quantificação de proteína	28
3.3.3.1.3. Atividade das P- H <sup>+</sup> -ATPases, V- H <sup>+</sup> -ATPases e H <sup>+</sup> -PPases	28
3.3.3.2. Atividade da Nitrato redutase	28

3.3.3.3. Dosagem de N-amino livre	29
3.3.3.4. Dosagem de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	29
3.3.3.5. Dosagem de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	29
3.3.3.6. Dosagem de açúcares solúveis	30
3.3.3.7. Atividade da Glutamina Sintetase (GS)	30
3.3.3.8. Atividade da Catalase	30
3.3.3.9. Histolocalização radicular de NO e ROS	31
3.3.3.9.1. Histolocalização radicular do NO	31
3.3.3.9.2. Histolocalização radicular das ROS	31
3.3.3.10. Mensuração do crescimento radicular	31
<b>3.4 Experimento 4: Efeitos do ácido húmico e do óxido nítrico submetido a duas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na atividade das enzimas nitrato redutase, bombas de prótons, catalase e a histolocalização radicular de NO e ROS em raízes transformadas de manjerição em experimento de curta duração</b>	32
3.4.1. Material vegetal e condições de crescimento e tratamentos	32
3.4.2. Delineamento experimental e análise estatística	32
	33
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	34
<b>4.1 Experimento 1: Extração e caracterização da matéria orgânica humificada dos solos</b>	34
<b>4.2 Experimento 2: Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e de óxido nítrico no crescimento de raízes transformadas de manjerição</b>	38
<b>4.3 Experimento 3: Efeitos do ácido húmico e do óxido nítrico submetido a duas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no crescimento de raiz, metabolismo do nitrogênio, atividade das bombas de prótons, catalase e histolocalização radicular de NO e ROS em raízes transformadas de manjerição</b>	49
<b>4.4 Experimento 4: Efeitos do ácido húmico e do óxido nítrico submetido a duas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na atividade das enzimas nitrato redutase, bombas de prótons, catalase e a histolocalização radicular de NO e ROS em raízes transformadas de manjerição em experimento de curta duração</b>	65
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b>	72
<b>6 CONCLUSÕES</b>	78
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	79

## 1 INTRODUÇÃO

Grande parte das pesquisas com plantas se concentra em estudos apenas de sua parte aérea. Isso é surpreendente uma vez considerada a importância das raízes na sustentação física de plantas, na absorção de nutrientes e água, e nas interações planta-microrganismos. DAVIDSON (1978), há mais de três décadas mencionava ser surpreendente a existência de tão poucos dados relacionados a pesquisas sobre raízes.

Entretanto essa perspectiva foi mudada com o advento da biotecnologia, na qual a cultura de raízes isoladas de plantas e a produção de raízes transformadas geneticamente, pela possibilidade da transferência de DNA das bactérias do gênero *Agrobacterium* para as plantas, ampliaram as áreas de estudo com raízes (GUILLON et al. 2006). Estes estudos tornam-se importantes à medida que o conhecimento gerado permite obter mais entendimento sobre o metabolismo vegetal na nutrição mineral de plantas e suas aplicações nas diversas áreas do conhecimento.

De todos os elementos minerais requeridos pelas plantas, o nitrogênio é um dos necessários em maiores quantidades e o que mais freqüentemente limita o crescimento. O nitrogênio pode estar presente no solo como amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), aminoácidos, peptídeos solúveis e outras formas complexas insolúveis. No entanto, este nutriente é absorvido principalmente na forma inorgânica como  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  através do sistema radicular. O nitrogênio é um constituinte mineral que se integra a compostos de carbono, dando origem a diversas proteínas estruturais, ácidos nucleicos, aminoácidos, nucleotídeos, coenzimas e hormônios vegetais e muitos outros componentes celulares importantes, como as membranas. Portanto, a deficiência desse nutriente pode implicar em decréscimo do crescimento vegetativo e rendimento nos cultivos (TAIZ & ZEIGER, 2004; WILLIAMS & MILLER, 2001).

As plantas adquirem  $\text{NO}_3^-$  da solução do solo ou do meio de cultura, absorvendo-o através de transportadores específicos localizados na membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz. Uma vez no interior da célula, o  $\text{NO}_3^-$  pode ser reduzido ou estocado no vacúolo. O primeiro passo na redução é realizado no citossol pela enzima nitrato redutase (NR) produzindo nitrito, que entra no plastídeo (cloroplasto na parte aérea) e é reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela enzima nitrito redutase (NiR). O  $\text{NH}_4^+$  é transformado pelo sistema GS/GOGAT em aminoácidos (glutamina/ glutamato) que servem como substrato para reações de transaminação para produzir outros aminoácidos (TISCHNER, 2000).

Os estudos do metabolismo de nitrogênio em plantas vêm sendo desenvolvidos em diferentes espécies vegetais com diversos objetivos, tais como: formas de N mais absorvidas; como as diferentes fontes de N são assimiladas; quais as enzimas envolvidas na assimilação; a localização de cada uma dessas; os fatores que influenciam na atividade de cada enzima; os mecanismos que desencadeiam esses processos, dentre outros.

As substâncias húmicas desempenham um papel importante na qualidade dos sistemas agrícolas, pois interferem na disponibilidade de nutrientes para as plantas, são fontes de energia para os microrganismos do solo, influenciam de maneira decisiva nas características químicas, físicas e biológicas do solo (MIELNICZUK, 1999) e exercem efeitos diretos sobre o desenvolvimento das plantas (STEVENSON & COLE, 1999).

A relação entre estrutura e função das substâncias húmicas é hoje objeto de crescente interesse nas pesquisas e cada vez mais são utilizados métodos precisos de análise química estrutural para tentar melhor compreender suas propriedades (CANELLAS, 1999) e os efeitos diretos de sua composição no desenvolvimento das plantas.

As substâncias húmicas, em particular os ácidos húmicos são absorvidas pelas raízes e translocadas para a parte aérea das plantas, podem modificar ativamente o seu metabolismo (VAUGHAN & MALCOM, 1985; MUSCOLO & NARDI, 1999). Estas substâncias podem

apresentar função hormonal, tal como a de auxina (DELL'AGNOLA & NARDI, 1987; NARDI et al., 1988), também pode induzir modificações no genoma estimulando a expressão de alguns genes (ATTINÀ et al., 1992). Pinton et al. (1999) mostraram que o ácido húmico estimulou a extrusão de prótons (vanadato-sensível) através das raízes, embora este aumento aparecesse somente após 2 - 4 h de incubação. Esse efeito tem sido interpretado como consequência de um estímulo direto do ácido húmico no bombeamento de prótons pela H<sup>+</sup>-ATPase (próton ATPase de membrana plasmática). Os ácidos húmicos também poderiam estimular a atividade de H<sup>+</sup>-ATPase de isolados da membrana plasmática (VARANINI et al., 1993), determinando assim, um aumento no gradiente de prótons de substâncias eletroquímicas, e que poderiam ser, pelo menos em parte, responsáveis pelo estímulo da absorção do ânion NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (PINTON et al., 1999).

Nos últimos anos, o óxido nítrico (NO) vem se destacando como importante molécula sinalizadora para os vegetais, atuando em diversos processos de crescimento e desenvolvimento, bem como nas respostas de defesa a estresses bióticos ou abióticos (LAMATTINA et al., 2003; NEILL et al., 2007). O NO é um gás reativo, facilmente formado e rapidamente difundido em um sistema biológico. No metabolismo celular existe um paradoxo em relação ao NO, isto porque este gás pode atuar como oxidante (altamente tóxico) ou como antioxidante (efeito protetor). Estes eventos são demonstrados dependendo da condição celular e da concentração do gás presente na célula, ou seja, esta molécula atua como sinalizadora no metabolismo vegetal.

Em situações que as espécies reativas de oxigênio são predominantes, o NO pode atuar na regulação da homeostase celular, proporcionando efeito antioxidante. Ele pode atuar como um sinalizador contra o dano oxidativo e conseqüente morte celular (BELIGNI et al., 2006), desta forma previne-se a apoptose. Essa molécula atua no controle do crescimento de raízes (GOUVÊA et al., 1997; PAGNUSSAT et al., 2004), na germinação de sementes (KEELEY & FOTHERINGHAM, 1997), na extensão foliar (LESHEM & HARAMATY, 1996), na fotomorfogênese (PAGNUSSAT et al., 2003), na lignificação da parede celular (FERRER & ROS-BARCELÓ, 1999), na diferenciação de células do xilema (GABALDON et al., 2005) e na senescência de folhas e maturação dos frutos (LESHEM & HARAMATY, 1996). ROCKEL et al. (2002) observaram que a regulação da produção de NO era modulada pela atividade da nitrato redutase (NR), mostrando que este sistema tem interação com a fotossíntese e metabolismo vegetal, sinalizando eventos bioquímicos.

A partir das evidências científicas do efeito benéfico do ácido húmico e do óxido nítrico, surgiram algumas hipóteses de trabalho, tais como que, as raízes transformadas, dependendo das condições de cultivo e da dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, poderiam apresentar crescimento e metabolismo diferenciado, influenciado pela qualidade da matéria orgânica, através dos ácidos húmicos, assim como da molécula sinalizadora Óxido Nítrico. Essas substâncias atuam no crescimento e metabolismo das raízes das plantas, dependendo de sua concentração no meio de cultivo. Este efeito pode estar sendo estimulado pela sinalização auxínica por estas moléculas e a presença destes compostos no meio de cultivo podem favorecer o crescimento de raízes transformadas, através do transporte de íons, decorrente de uma maior atividade das bombas de prótons (H<sup>+</sup>-ATPases de membrana plasmática e do tonoplasto).

Neste trabalho os objetivos foram: isolar, quantificar e caracterizar quimicamente os ácidos húmicos de três solos do Estado do Rio de Janeiro, monitorando os parâmetros de crescimento, de acordo com a dose dos diferentes ácidos húmicos e aplicação de óxido nítrico nas raízes transformadas ao longo do tempo, assim como avaliar o metabolismo de nitrogênio e a atividade das bombas de prótons e atividade da catalase em raízes transformadas, na presença de ácidos húmicos e óxido nítrico em duas doses de nitrato no meio de cultivo. Também foi realizada a histolocalização *in vivo* de óxido nítrico e espécies reativas de

oxigênio após o tratamento com ácido húmico e nitroprussiato de sódio como doador de NO, nas doses de  $\text{NO}_3^-$  estudadas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Raízes transformadas

Há mais três décadas Davidson (1978) mencionava ser surpreendente a existência de tão poucos dados relacionados a pesquisas sobre raízes. A maior parte das pesquisas com plantas se concentra em estudos apenas de sua parte aérea. Isso é surpreendente uma vez considerada sua importância da raiz na sustentação física de plantas, na absorção de nutrientes e água, e nas interações planta-microrganismos. Entretanto essa perspectiva foi mudada com o advento da biotecnologia vegetal.

O domínio da cultura de órgãos e tecidos de plantas tem importância crucial. A cultura *in vitro* compreende a cultura de células, tecidos ou órgãos, em condições de assepsia, em um meio de cultura, sob condições axênicas, sendo necessária periodicamente a manipulação das culturas (repicagem e troca de meio de cultura) para a manutenção das condições mínimas requeridas pelo explante (BERBARA & FONSECA, 1996).

Dentre as áreas de aplicação biotecnológica, tem-se como exemplo a cultura de raízes, que se apresenta mais vantajosa do que a cultura de calos e suspensão celular, no que se refere à produção de moléculas bioativas. A dependência de auxina exógena, grande quantidade de inóculo requerido para crescimento adequado, raízes com poucas ramificações, e em muitos casos rendimentos de metabólitos inferiores às raízes de planta inteira são algumas das desvantagens desse tipo de cultura, assim como o manuseio laborioso dessa parte vegetal (CANTO-CANCHÉ & LOYOLA-VARGAS, 1999).

Uma estratégia alternativa à cultura de raízes normais, devido as suas desvantagens, é a cultura de raízes transformadas geneticamente (*hairy roots*, *raízes em cabeleira*), promovidas via infecção pela bactéria *Agrobacterium rhizogenes*, uma bactéria gram negativa de solo, capaz de promover a proliferação excessiva de raízes em cabeleira de um hospedeiro.

O processo infeccioso ocorre com a transferência e integração de um segmento de DNA de transferência (T-DNA) do plasmídeo bacteriano (indutor de raízes – Ri) ao genoma da célula do hospedeiro (FLORES, 1992). O vegetal infectado passa então a produzir enzimas responsáveis pela síntese de opinas, que são utilizadas pela *Agrobacterium* como fonte de energia, e de hormônios que alteram a produção e a sensibilidade das células vegetais a auxinas provocando um desbalanço no metabolismo celular que passam, então, a se propagar desordenadamente, induzindo alta proliferação de raízes adventícias de rápido crescimento na região de infecção.

Segundo Godwin e colaboradores (1992), a utilização de *A. rhizogenes* oferece vantagens sob vários aspectos:

- Nos vegetais, a competência para formação de raízes adventícias normalmente é maior que aquela observada para a formação de gemas a partir de tecidos não meristemáticos;
- As raízes transgênicas (“*hairy roots*”) são clones celulares, reduzindo a possibilidade de ocorrência de plantas quiméricas;
- O cultivo das raízes isoladas é feito em meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento, permitindo uma seleção prévia dos clones transformados e tornando o processo menos oneroso;
- As culturas de raízes isoladas podem ser mantidas por muitos meses, permanecendo o crescimento vigoroso característico;
- Tomando as raízes por objeto de estudo, podem ser criados sistemas extremamente funcionais para a produção de metabólitos, obtenção de plantas adequadas para uso como porta-enxerto e para a investigação de mecanismos de resistência a patógenos de solo e metais, como o alumínio;

- Protocolos de transformação simples e rápidos podem ser facilmente estabelecidos.

Os estudos com culturas de raízes transformadas geneticamente tornam-se importantes à medida que o conhecimento gerado permite obter maior entendimento sobre a absorção de nutrientes na nutrição de plantas e produção de moléculas bioativas de interesse (SANTIAGO et al., 2000).

## 2.2 Absorção de Nutrientes pelas Células Vegetais

As células vegetais possuem uma membrana plasmática que separa o ambiente interno, relativamente constante, do entorno, altamente variável que, além de formar uma barreira hidrofóbica à difusão, tem a função de facilitar e regular continuamente o trânsito de íons e moléculas selecionados para dentro e para fora. O mesmo é válido para membranas internas, as quais separam os diversos compartimentos dentro de cada célula (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os sistemas de transporte presentes nas biomembranas podem ser divididos em dois grupos: os sistemas primários, que compreendem bombas eletrogênicas ou eletroneutras, que são capazes de gerar um gradiente eletroquímico ao transportarem íons contra um gradiente de concentração, utilizando-se da energia liberada na quebra de ligações covalentes; e os sistemas secundários, desempenhados por canais, carreadores ou transportadores, nos quais o transporte de íons através da membrana não envolve quebra de ligações covalentes, mas depende do desequilíbrio de cargas e  $\Delta\text{pH}$  gerado na membrana pelos sistemas primários (LOGAN et al., 1997).

A absorção de íons nas membranas biológicas ocorre necessariamente através de sítios específicos, de origem protéica (proteínas integrais da membrana), que permite a passagem dos íons do meio externo para o interior das células (FERNANDES & SOUZA, 2006). Estas proteínas integrais de membrana formam os três sistemas que atuam no transporte de íons, segundo Fernandes & Souza (2006):

- Bombas iônicas: atuam no transporte unidirecional de íons (uniporte) e estão acopladas a sistemas geradores de energia. A velocidade e transporte destas bombas iônicas são de  $100 \text{ íons s}^{-1}$ .
- Transportadores de íons: podem ser tanto unidirecionais (uniporte), e quanto atuar na troca de uma espécie iônica por outra (antiporte), ou ainda, no transporte simultâneo de íons (simporte). Geram mudanças conformacionais durante o transporte, cuja velocidade pode variar de  $300$  a  $1000 \text{ íons s}^{-1}$ .
- Canais iônicos: apresentam alta velocidade de transporte de íons, na ordem de  $10^6$  a  $10^8 \text{ íons s}^{-1}$ . Transportam apenas a favor de gradientes de potencial eletroquímico.

Os transportadores de íons podem transportar íons através da plasmalema a favor de um gradiente de potencial eletroquímico denominado transporte passivo, sem troca por outra espécie iônica de mesma carga (uniporte), ou permitir a troca de uma espécie iônica de cargas opostas (antiporte). Estes transportadores podem também fazer o transporte ativo de íons, ou seja, contra um gradiente de potencial eletroquímico, em sistemas de co-transporte (simporte), em que o íon a ser transportado (cátion ou ânion) entra na célula contra o seu gradiente de potencial eletroquímico, sendo que a energia necessária para esse processo é obtida com a entrada simultânea de um outro íon, que entra a favor do seu gradiente de potencial eletroquímico (FERNANDES & SOUZA, 2006).

Nas plantas, o transporte passivo por canais é proeminente numa série de adaptações rápidas para condicionar às flutuações abióticas, envolvendo ajuste de turgor, regulação da abertura dos estômatos, e estabilização do potencial de membrana (SCHROEDER et al., 1995), então não é surpreendente que hormônios, luz, fitotoxinas e estresses ambientais

influenciam o gradiente eletroquímico de prótons da membrana plasmática (SERRANO, 1989). Os papéis homeostáticos da circulação de  $H^+$  através da membrana plasmática e vacúolos representam também a manutenção do pH citoplasmático, apesar das flutuações da acidificação do ambiente. Em *Arabidopsis*, Young et al. (1998) verificaram que a maior expressão da  $H^+$ -ATPase permitiu aumento da acidificação.

As  $H^+$ -ATPases são as principais bombas eletrogênicas responsáveis pela interconversão da energia química, elétrica e luminosa nas células de todos os organismos vivos. Nas membranas das células vegetais, encontram-se três tipos de  $H^+$ -ATPases (a  $H^+$ -ATPase da membrana vacuolar-tipo V, a  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática (tipo P) e a  $H^+$ -ATPase das membranas do cloroplasto e da mitocôndria – tipo F) que se distinguem por suas estruturas, funções, mecanismos de ação e evolução, cada uma representando uma das três classes de ATPases translocadoras de cátions. Outra classe de enzimas, as pirofosfatases ( $H^+$ -PPases) têm sido caracterizadas, tanto em nível bioquímico quanto molecular, e, atualmente, são consideradas como um grupo de enzimas translocadoras capazes de acoplar a hidrólise do pirofosfato inorgânico à translocação de prótons através do tonoplasto (REA et al., 1992).

As bombas de prótons são proteínas abundantes, quando comparadas a outros transportadores de membrana. Esta abundância reflete a sua baixa taxa de transporte. Cada bomba de prótons pode representar, na realidade, de 1 a 5% da proteína purificada da membrana. As bombas de próton primárias dependem da energia metabólica obtida diretamente da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP), e podem ser analisadas através de suas atividades hidrolítica de ATP, que podem ser mensurada em diferentes meios, inclusive a determinação de adenosina difosfato (ADP) acoplado às enzimas (PULLMAN et al., 1960), medindo a liberação de  $^{32}P$  [hidrólise de  $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP (MARTINS & DE MEIS, 1985), ou através de reações colorimétricas (DEBRUYNE, 1983). Muitos processos metabólicos que requerem energia se acoplam ao processo enzimático de hidrólise de ATP para ADP com a liberação de ortofosfatos livres (Pi) (SZE et al., 1999).

### 2.2.1 Absorção e Assimilação de Nitrato em Raízes

A absorção de nitrato ( $NO_3^-$ ) é um processo ativo, que ocorre contra um gradiente de potencial eletroquímico, e precisa da geração de um gradiente de próton através da membrana plasmática, sendo, portanto dependente da atividade das bombas de próton (P- $H^+$ -ATPase) dessas membranas (GLASS et al., 1992). A absorção de nitrato é realizada por transportadores de alta e baixa afinidade, que são codificados por uma família multigênica. Alguns dos transportadores de nitrato são constitutivos, enquanto outros são induzidos pelo  $NO_3^-$ . Altos conteúdos de  $NO_3^-$  na parte aérea são positivamente correlacionados com a absorção de  $NO_3^-$  e com os níveis de mRNA para transportadores de alta afinidade, sugerindo que altos influxos de  $NO_3^-$  são devido ao aumento na expressão dos transportadores.

Quando ocorre a assimilação do nitrogênio nas raízes, aminoácidos são transportados para as folhas maduras via fluxo transpiratório, pelo xilema (MARSCHNER et al., 1997). O nitrogênio também pode ser transportado através da membrana plasmática de certas células, em outras formas tais como peptídeos menores (STEINER et al., 1994), bases purínicas e pirimidínicas e seus derivados (GILLISSEN et al., 2000).

O  $NO_3^-$  é considerado a mais importante fonte de N mineral para o crescimento de plantas em solos aeróbicos. As plantas adquirem  $NO_3^-$  da solução do solo, absorvendo-o através de transportadores específicos localizados na membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz. Uma vez no interior da célula, o  $NO_3^-$  pode ser reduzido ou estocado no vacúolo. O primeiro passo na redução é realizado no citossol pela NR (nitrato redutase) produzindo nitrito, que entra nos plastídeos (cloroplasto na parte aérea) e é reduzido a  $NH_4^+$  pela NiR (nitrito redutase). O amônio é fixado pelo sistema enzimático GS/GOGAT

em aminoácidos (glutamina/glutamato) os quais servem como substrato para reações de transaminação para produzir todos os outros aminoácidos protéicos (TISCHNER, 2000).

## **2.2.2 Bombas eletrogênicas**

### **2.2.2.1 P H<sup>+</sup>-ATPase**

A enzima H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática (P-H<sup>+</sup>-ATPase) de plantas desempenha funções chave na fisiologia das plantas superiores, usando ATP como fonte de energia. Essa enzima bombeia prótons através da membrana plasmática do citoplasma para o exterior da célula (apoplasto), a H<sup>+</sup>-ATPase caracteriza-se por assumir dois estados conformacionais designados E1 e E2 (SERRANO, 1989), sendo formada por um único polipeptídeo, de 100 KDa, que é ativo nas formas monomérica e homodimérica. O monômero tem 10 domínios transmembranares e uma grande alça hidrofílica contendo a região de ligação do ATP. As ATPases de membrana plasmática são inibidas por ortovanadato (H<sub>2</sub>VO<sub>4</sub><sup>-</sup>), que compete com o fosfato (SZE et al., 1999) e por complexos de fluoreto de alumínio (FAÇANHA & DE MEIS, 1995).

A H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática de plantas também participa em outras funções essenciais para o crescimento normal da planta como a ativação do sistema de transporte secundário (MORSOMME & BOUTRY, 1999), tolerância à salinidade (BRESSAN et al., 1998), regulação do pH intracelular (KURKDJIAN, 1989), expansão celular (RAYLE & CLELAND, 1992; COSGROVE, 1997), abertura dos estômatos e enchimento do floema (CAMONI et al., 2000; PALMGREN, 2001).

A dependência da H<sup>+</sup>-ATPase de acordo com o pH foi demonstrado em ensaios *in vitro* e varia de acordo com o tipo de isoforma (LUO et al., 1999) ou com o estado de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase. Seu papel na manutenção do pH e no crescimento celular vem sendo discutido, mas não está claro como a H<sup>+</sup>-ATPase está envolvida na regulação do pH intracelular, que permanece constante entre pH 7,0 a 7,2 durante todo o crescimento da planta (KURKDJIAN, 1989).

Esta enzima é regulada pela concentração de substrato (ATP) e temperatura (SZE et al., 1999). Moléculas individuais de H<sup>+</sup>-ATPase podem ser reversivelmente ativadas ou desativadas em resposta a uma variedade de sinais, tais como luz, hormônios, ataque de patógenos, dentre outros. Esse tipo de regulação é mediado por um especializado domínio alto inibitório da região C-terminal da cadeia polipeptídica, a qual age como uma válvula, regulando a atividade da bomba de prótons (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O pH ótimo para a H<sup>+</sup>-ATPase é levemente abaixo de 7,0. Isto provoca uma acidificação do citosol e leva a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase, aumentando a extrusão de prótons e, conseqüentemente, a manutenção do citosol alcalinizado (MORSOMME & BOUTRY, 2000; FELLE, 1996). Concomitante a este processo, ocorre acidificação do meio externo o que leva ao início do processo de expansão celular (RAYLE & CLELAND, 1992), um mecanismo conhecido por teoria do crescimento ácido, que deve estar associado a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase pelo hormônio auxina através de um mecanismo ainda obscuro (SZE, 1985; MORSOMME & BOUTRY, 2000).

Importante progresso foi alcançado relativo à identificação e organização dos genes das H<sup>+</sup>-ATPases, sua expressão, e também, a cinética e a regulação individual das isoformas de H<sup>+</sup>-ATPases (MICHELET & BOUTRY, 1995). Molecularmente, agora está claro que as H<sup>+</sup>-ATPases são codificadas por uma família de aproximadamente 10 genes (MORSOMME & BOUTRY, 1999).

### **2.2.2.2 V H<sup>+</sup>-ATPase**

O vacúolo é a maior organela da maioria das células vegetais, podendo compreender mais de 90% do espaço intracelular de uma célula madura (TAIZ & ZEIGER, 2004). No

tonoplasto encontram-se duas diferentes bombas de prótons, uma  $H^+$ -ATPase do tipo V e uma próton-pirofosfatase ( $H^+$ -PPase) ligadas à membrana (REA et al., 1992). Ambas as enzimas são capazes de gerar um gradiente eletroquímico de prótons no tonoplasto pela hidrólise de ATP ou de PPI, os quais são utilizados para energizar a translocação de solutos (como íons inorgânicos, açúcares e ácidos orgânicos) do citoplasma para o interior do vacúolo, criando um potencial de membrana vacuolar de +30mV e de uma força próton-motriz para o transporte de solutos no tonoplasto (SZE et al., 1999; FAÇANHA & DE MÉIS, 1998; RATAJCZAK, 2000).

A  $H^+$ -ATPase vacuolar (V- $H^+$ -ATPase) é um complexo de pelo menos 10 subunidades e está localizada em compartimentos funcionalmente distintos dentro da célula. Assim, a regulação da expressão de genes das V- $H^+$ -ATPase, síntese e ativação da enzima, e ativação poderia ser consideravelmente mais complexo do que para a  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática.

A ATPase de tonoplasto, que possui um peso molecular de aproximadamente 730 kDa, consiste de várias subunidades polipeptídicas, as quais estão localizadas em dois domínios maiores, um domínio globular na periferia da membrana ( $V_1$ ), contendo o sítio de ligação nucleotídica, e um domínio integral da membrana ( $V_0$ ), contendo o canal de próton (RATAJCZAK, 2000).

Essas enzimas são estimuladas por ânions, como o cloreto, e, especificamente, inibidas por nitrato, bafilomicina A1 e concanamicina, e podem, também, ser inibidas pelo ADP, que compete com o ATP pelo sítio catalítico. Entretanto, são insensíveis ao inibidor da ATPase de membrana plasmática (ortovanadato) e ao inibidor da ATPase do tilacóide e da membrana mitocondrial (azida). Outros diferentes mecanismos estão envolvidos na regulação da atividade dessas enzimas, tais como: fosforilação das subunidades da ATPase do tonoplasto, modificações do estado redox da enzima por oxidação e redução de grupos sulfidrilais essenciais, presentes nas subunidades A e B da ATPase do tonoplasto. Mudanças na disponibilidade do substrato Mg-ATP-2 no citoplasma e os fosfolípídeos presentes na fase cristalina líquida do tonoplasto são importantes para a regulação, o que mostra a complexidade dos mecanismos regulatórios da atividade dessas enzimas (RATAJCZAK, 2000).

A distribuição onipresente de bombas V- $H^+$ -ATPase em células eucarióticas indica que, essencialmente, a sua função vai além da energização iônica e do fluxo metabólico. A acidificação das vesículas pode ser um componente crítico na ligação de receptores e obrigatoriamente na dissociação de interações proteína-proteína. (MATSUOKA et al., 1997).

Estudos têm sugerido que mudanças nas funções da membrana plasmática de células das raízes estão primariamente envolvidas em diferentes tipos de estresses. Quando a planta sofre estresse há reduções na atividade das ATPases da membrana plasmática (ANH et al., 2001) e, alguns dados evidenciam aumentos nas atividades de  $H^+$ -ATPase e  $H^+$ -PPase vacuolares (KASAI et al., 1992). A  $H^+$ -ATPase vacuolar é uma enzima que pode ser ativada em resposta a distúrbios nutricionais e cuja expressão nas membranas pode ser regulada por condições ambientais e de desenvolvimento, que devem agir como mecanismos de percepção de injúrias, assim como na detoxificação de metais pesados (DIETZ et al., 2001).

### 2.2.2.3 $H^+$ -PPase

A  $H^+$ -PPase vacuolar é a principal enzima capaz de hidrolisar (pirofosfato) PPI presente nas membranas microssomais, o estímulo observado deve estar relacionado com a ativação desta enzimas induzidas pelas concentrações de ácido húmico (RAMOS et al., 2005). Nas plantas em diversas condições fisiológicas e de estresse, o pirofosfato pode assumir o papel de doador de energia metabólica da célula (STITT, 1998). No tonoplasto, a  $H^+$ -PPase é funcional na energização dos sistemas de transporte secundário da membrana vacuolar,

atuando também no controle da homeostase citoplasmática, em sincronismo com a V-ATPase de tonoplasto e com a H<sup>+</sup>-ATPase de plasmalema (REA et al., 1992; SZE et al., 1999).

Em sistema vegetais, o PPI tem sido considerado um substrato alternativo ao ATP podendo ativar o metabolismo em condições de estresse energético, quando ocorre a depleção dos níveis de ATP citosólico (STITT, 1998). Uma hipótese recente descreve um possível acoplamento entre as duas bombas de prótons vacuolares, onde o gradiente eletroquímico gerado pela H<sup>+</sup>-PPase energizaria a reversão do ciclo catalítico da H<sup>+</sup>-ATPase, favorecendo a síntese de ATP (FAÇANHA & DE MEIS, 1998; FAÇANHA, et al., 2005).

### 2.3 Hormônios Vegetais

O desenvolvimento vegetal é influenciado tanto por fatores externos, como luz, temperatura, gravidade, água, como por fatores internos, provenientes de moléculas orgânicas que atuam como mensageiros químicos altamente específicos denominados hormônios (DAVIES, 1995). O termo hormônio originou-se do grego, *horman*, que significa estímulo (mensageiro químico) (RAVEN et al., 2001). Os hormônios vegetais são substâncias orgânicas de ocorrência natural, ativas em quantidades mínimas (< 1,0 µM), sintetizadas em determinadas partes do vegetal e transportadas para outras, induzindo efeitos específicos no crescimento e desenvolvimento das plantas (IVANCHENCO et al., 2008).

Porém nem todo estímulo ao crescimento ou desenvolvimento vegetal pode ser atribuído a um hormônio, uma vez que íons inorgânicos, tais como K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, também induzem eventos importantes e não são considerados hormônios, pois não são sintetizados pela planta (BERNIER et al., 1993).

Os hormônios vegetais clássicos são agrupados de acordo com o efeito produzido nas plantas em: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico e o etileno (IVANCHENCO et al., 2008). Outros compostos como os brassinoesteróides, os jasmonatos, o ácido salicílico, as poliaminas (SANTA-CATARINA et al., 2004; TUN et al., 2006) e o óxido nítrico (CORREA-ARAGUNDE et al., 2004) podem também ser considerados hormônios vegetais, embora não se tenham definido se eles apresentam efeitos em todas as plantas (RAVEN et al., 2001). Diversos autores que relacionam os efeitos das substâncias húmicas com a ação de fitormônios, descrevendo, principalmente, a atividade semelhante à das auxinas (GUMINSKI, 1968; MUSCOLO et al., 1999; CANELLAS et al., 2002; QUAGGIOTTI et al., 2004; NARDI et al., 2005).

#### 2.3.1. Auxinas

Os hormônios vegetais da classe das auxinas atuam potencialmente em todos os aspectos relacionados ao desenvolvimento vegetal (ACHARD et al., 2006), incluindo o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário, o fototropismo e o gravitropismo, a dominância apical e a formação de raízes laterais e adventícias (MACDONALD, 1997).

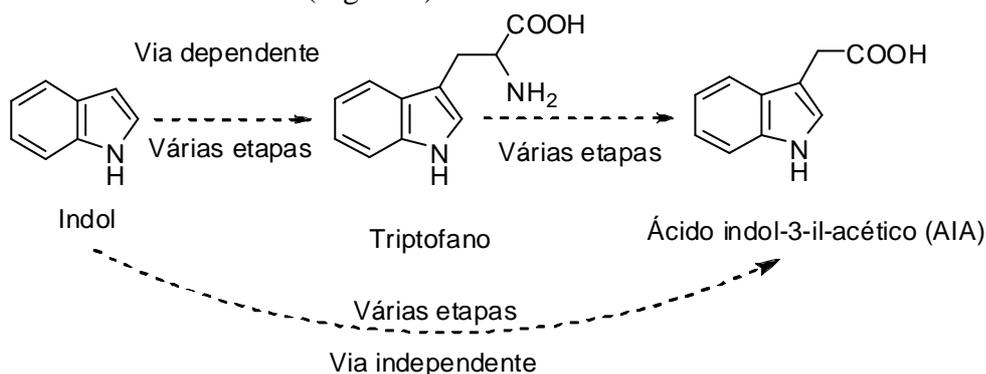
A forma mais comum de auxina presente nas plantas é o ácido indol-3-il-acético (AIA), sendo ativa em concentrações extremamente baixas. Além do AIA, existem mais de 50 análogos naturais e sintéticos diferentes que podem expressar a atividade biológica da auxina (BERTOSA et al., 2003).

Quando se faz a comparação entre os compostos que possuem atividade de auxina observa-se que em pH neutro, eles apresentam uma forte carga negativa sobre o grupo carboxilato da cadeia lateral e está separada por uma carga positiva na estrutura do anel, por uma distância de cerca de 0,5 nm (PORTER & THIMANN, 1965; Farrimond et al., 1978). Esta separação de cargas é um requisito estrutural essencial para a atividade de auxina. Dessa forma, verificou-se que, o anel indólico não era essencial para a atividade, apesar de um anel aromático ou aromático fundido em um intervalo de determinado tamanho fosse necessário. Edgerton e colaboradores (1994) propuseram um conjunto de requisitos para validação da

atividade de moléculas de auxinas, com base em estudos de ligação de vários análogos de auxina, com uma proteína, denominada proteína de ligação da auxina (ABP1), que é o receptor da auxina. Seu modelo define três regiões essenciais do sítio de ligação: uma plataforma aromática planar do anel de ligação, um sítio de ligação ácido carboxílico, e uma região de transição hidrofóbica que separa os dois locais de ligação.

### 2.3.2. Síntese de AIA

As vias de crescimento e desenvolvimento adotadas pelos tecidos das plantas podem ser determinadas pela sensibilidade das células à auxina, pela concentração de auxina ativa e pelas concentrações relativas de outros hormônios. A auxina é prontamente conjugada a outras moléculas na planta, produzindo conjugados que podem reter ou perder a atividade auxínica (LJUNG et al., 2005). A conjugação e o catabolismo podem diminuir os níveis de auxina ativa nas células. Dessa forma, a síntese de novo e a hidrólise dos conjugados contribuem para a regulação dos níveis do hormônio auxina nas células, e para aumento dos níveis de auxina ativa (WOODWARD et al., 2007). A síntese de auxina não é restrita a tecidos jovens da parte aérea, mas também ocorre nos tecidos radiculares, particularmente no meristema apical da raiz primária (WOODWARD & BARTEL, 2005). Auxina é sintetizada a partir do indol através de vias dependente e independente do aminoácido triptofano, que é resumidamente demonstrada na (Figura 1).



**Figura 1. Resumo das vias de síntese do ácido indol-3-il-acético, dependente e independente do triptofano.**

### 2.3.3. Transporte de Auxinas

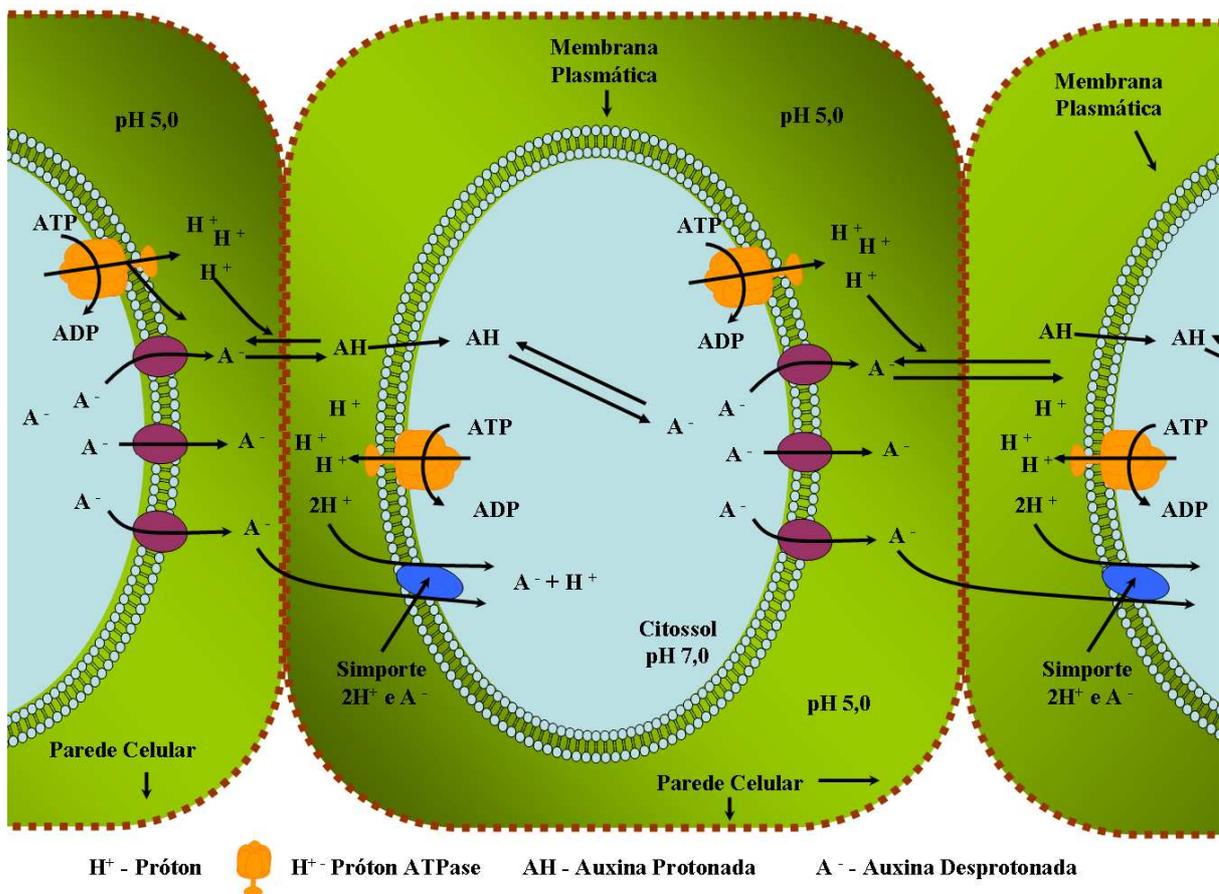
Importância fundamental de auxina no crescimento e desenvolvimento das plantas é dada pelo seu transporte polar, que é unidirecional (basípeto em caules e folhas e acrópeto nas raízes), sendo este fator determinante nos processos de expansão - alongamento celular, divisão e diferenciação celular, entre outros processos (LEYSER, 2006).

A teoria mais aceita sobre o transporte de auxinas é a teoria quimiosmótica (Figura 2), que considera que tanto a entrada quanto a saída de AIA nas células dependem de um gradiente eletroquímico favorável entre o apoplasta e o citoplasma da célula vegetal (CASIMIRO et al., 2003).

Por apresentar características lipofílicas e ser um ácido fraco, o AIA pode existir nas formas aniônica ou protonada, dependendo do pH dos compartimentos celulares. Por exemplo, no apoplasto o pH está em torno de 5,0, o que garante o predomínio da forma protonada (mais lipofílica que a forma aniônica), permitindo assim que nessas condições o AIA protonado penetre mais facilmente através da membrana plasmática, difundindo-se a favor de um gradiente de concentração, entrando na célula. No citoplasma são encontrados valores de pH em torno de 7, ocasionando o predomínio da forma desprotonada. Essa diferença de pH entre o apoplasto e o citoplasma mantém o gradiente de concentração de AIA

protonado, estimulando a entrada contínua dessa forma de AIA na célula. Com isso ocorre um acúmulo da forma dissociada no interior da célula, pois essa forma não se difunde facilmente na membrana. Já a saída do AIA desprotonado acumulado anteriormente, segue para a célula adjacente através da membrana plasmática, o que é favorecido pelo potencial de membrana, pois o meio extracelular está positivo (MARCHANT et al., 2002; OKADA et al., 1991). Dessa maneira ocorre o transporte polar de AIA pelas células. Para prevenir o acúmulo de prótons no citoplasma e manter um potencial de membrana favorável, enzimas localizadas na membrana plasmática, denominadas de  $H^+$ -ATPases, fazem o bombeamento de prótons para o apoplasto, mantendo a eletrogenicidade desse compartimento (REINHART et al., 2003).

O transporte de auxina também pode ser realizado por proteínas transportadoras. Pesquisas com plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* com fenótipos alterados (FRIML et al., 2004) demonstraram a existência de proteínas transportadoras de AIA na membrana plasmática. Esse transporte utiliza um mecanismo simporte de prótons e AIA protonado, além disso, nessas plantas o gene *aux1* codifica uma proteína (AUX1), carregando essas moléculas (LEYSER, 2006). A saída do AIA desprotonado é realizada por outros tipos de proteínas transportadoras. O gradiente de auxina é dependente da proteína PIN1 (*PINformed1*) que promove o efluxo deste hormônio. As plantas mutantes *pin* são defectivas na produção de raízes laterais (BENKOVÁ et al., 2003). Geldner e colaboradores, 2001 demonstraram que quando o tráfego de vesículas contendo proteínas PIN1 é bloqueado a formação de raízes laterais é inibida.



**Figura 2. Teoria quimiosmótica, demonstrando o transporte passivo e ativo de auxina nos compartimentos celulares (Adaptado de Davies, 1995).**

### 2.3.4. Teoria do Crescimento Ácido

Em plantas, o crescimento em tamanho das células não meristemáticas pode ser caracterizado por um aumento irreversível de seu volume, podendo ser uma expansão, quando ocorrido em duas ou três dimensões, ou alongamento, quando esse aumento se dá em apenas em uma direção (comprimento, por exemplo). Muitos fatores afetam a taxa de expansão-alongamento da célula, tais como a presença de fitormônios (auxina, giberelina, citocinina, entre outros), tipo de célula e idade, ou fatores ambientais, como a disponibilidade de água, luz e nutrientes (DAVIES, 1995).

O crescimento celular pode ser ilustrado pela teoria de Mitchell ou teoria do crescimento ácido (Figura 3) que explica como a auxina promove um aumento da extensibilidade da parede celular, pela acidificação do apoplasto, por estimular a célula competente a exsudar prótons. Essa acidificação aciona uma cascata de eventos, promovendo a ativação de enzimas que causam o afrouxamento da parede celular (HAGEN & GUILFOYLE, 2002). Concomitante a esses processos, ocorre a ativação das enzimas  $H^+$ -ATPases preexistentes na membrana plasmática e a síntese de novas  $H^+$ -ATPases, sendo esses eventos dependentes de energia, além da síntese de proteínas de parede celular (expansinas) que catalisam o afrouxamento da parede por atuarem nas ligações de hidrogênio existentes entre as microfibrilas de celulose e as hemiceluloses. O aumento subsequente da extensão é obtido por meio da atividade de enzimas hidrolases específicas que são ativadas em pH ácido, como celulasas, hemicelulasas, glucanases e pectinases (COSGROVE, 1997).

Assim o afrouxamento da parede celular permite a absorção de água e nutrientes, e também outros processos importantes, que proporcionam a continuidade do crescimento celular, como a atividade de enzimas relacionadas com a biossíntese de parede. A auxina pode induzir a síntese de outros hormônios vegetais, como a giberelina, que também atua no alongamento celular. O controle no crescimento de raiz pela interação auxina-citocinina é um exemplo de como a interação hormonal pode influenciar o desenvolvimento e controle do desenvolvimento de plantas (ROSS et al., 2000).

O término do crescimento ocorre durante a maturação da célula, aumentando a rigidez da parede celular.

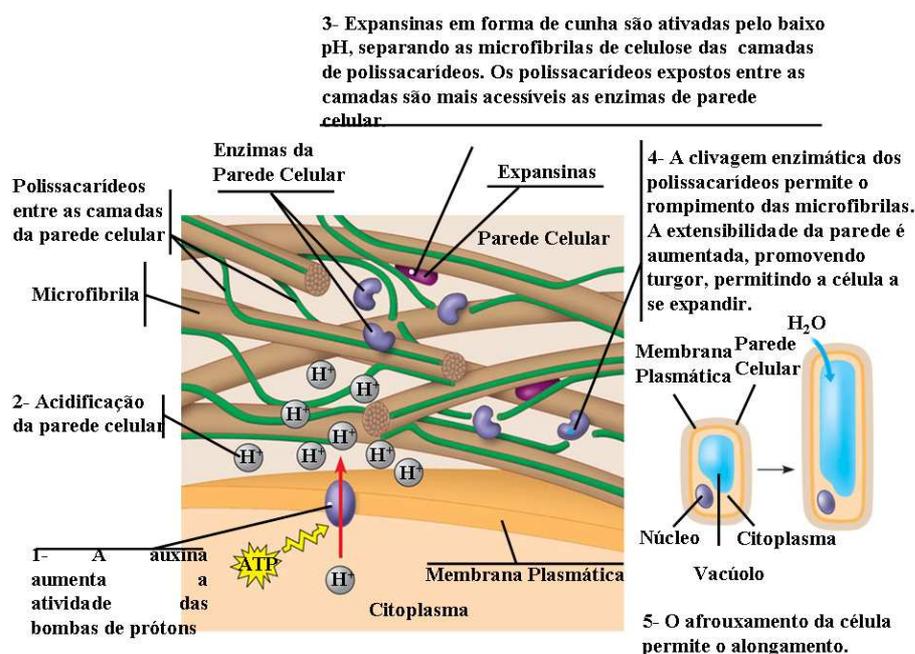


Figura 3. Respostas promovidas pela acidificação da parede celular e conseqüente crescimento das células de plantas, ocasionadas por auxina (Adaptado de Raven et al., 2001).

### 2.3.5. Sinalização promovida por auxinas

Abordagens moleculares para elucidar ação da auxina identificaram vários genes que apresentam um aumento rápido e específico da expressão em resposta a auxina exógena (QUINT & GRAY, 2006). Entre os mais bem caracterizados estão três famílias de genes (SAURs [Small Auxin-Up RNAs], GH3s e Aux / AIA), que são induzidos poucos minutos após a aplicação de auxina. As regiões promotoras de vários genes responsivos a auxina podem conter um ou mais elementos responsivos a ela (AuxRE), que são capazes de conferir a expressão de genes regulados auxina a repórter construtor (Ulmasov et al., 1995). Muitos aspectos do processo de sinalização da auxina ainda não são conhecidos. Existem várias evidências da existência de uma proteína receptora para AIA no lado externo da membrana plasmática conhecida como ABP1 (auxin binding protein) (RUCK et al., 1993; NAPIER et al., 2002). Por outro lado, foi também descrito um receptor intracelular sensível a presença de auxina (CLAUSSEN et al., 1996). YAMAGAMI et al. (2004) indicam a via independente de ABP1 como a mais provavelmente envolvida no controle do crescimento em casos de concentrações endógenas de AIA. Além disso, estudos com plantas de tomate mutante diageotrópica (dgt) sugerem ser bastante plausível a funcionalidade de receptores tanto intra como extracelulares (CHRISTIAN et al., 2003).

A resposta sinalizadora de auxina (Figura 4) se inicia a partir da interação deste fitormônio com receptores, através dos quais o sinal parece ser promovido por diferentes vias (IVANCHENCO et al., 2008), o que ocasiona a ativação ou repressão de genes (ROGG & BARTEL, 2001). Estas respostas são mediadas por algumas famílias de receptores: os codificados pelos genes *aux1*, da família Aux/AIA (Proteína responsiva à Auxina/proteína induzida por Ácido Indol Acético), que atuam como reguladores negativos da expressão gênica, os quais possuem os AuxREs (elementos de Resposta à Auxina) (NAPIER et al., 2002). Outros receptores são os ARFs (Fatores de Resposta à Auxina) (WEIJERS et al., 2005), que são fatores de transcrição que se ligam à AuxREs nos promotores dos genes de respostas primárias, desencadeiam a produção de mRNA, ocasionando posteriormente, a resposta fisiológica (REMINGTON et al., 2004; WORLEY et al., 2000). Recentemente foi descoberto outro receptor de auxina, uma proteína do tipo F-box TIR1 (Resposta de Inibição de Transporte) (DHARMASIRI et al., 2005). Estudos demonstram que a auxina estabiliza a interação entre TIR1 e os Aux/AIA, onde a auxina é continuamente necessária para esse efeito. Deste modo, a auxina é percebida pelo receptor TIR1 que direciona a degradação das proteínas repressoras Aux/AIA, liberando os ARF, onde a ubiquitina encaminha a proteína Aux/AIA para o proteossomo (CASIMIRO et al., 2003; SANTNER et al., 2009).

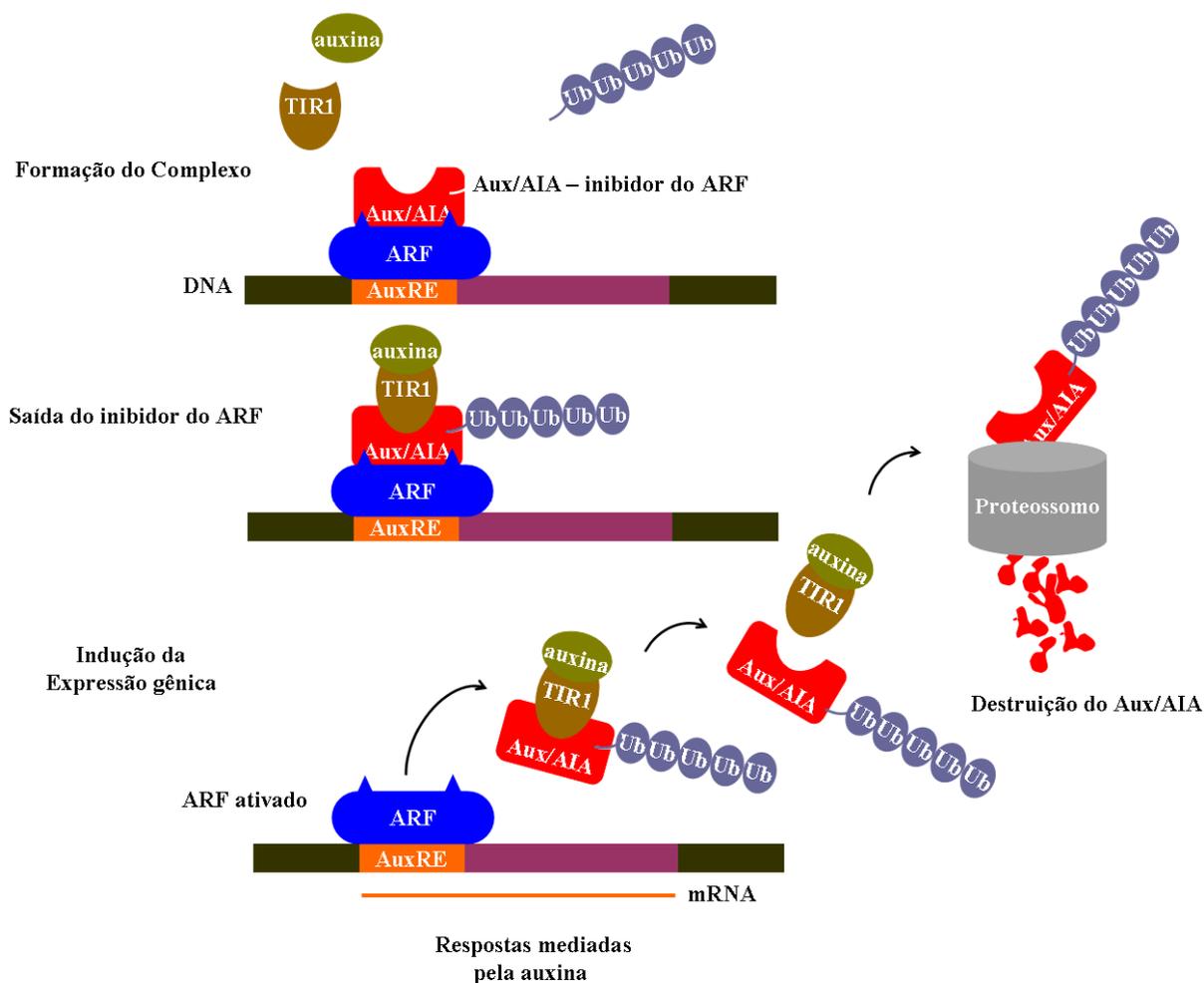
## 2.4 Substâncias Húmicas e Matéria Orgânica do Solo

No início do século 20, Bottomley (1917) publicou uma série de documentos nos quais demonstrou que substâncias húmicas em soluções com nutrientes minerais aumentaram o crescimento de várias espécies de plantas. Este autor concluiu que as substâncias húmicas agiram como hormônios de crescimento e as chamou de "auximones" (do grego *crecer*).

A matéria orgânica do solo é de suma importância como fonte de energia e de nutrientes para os organismos e para as plantas, na capacidade de troca de cátions e no tamponamento. Ela participa, também, como agente cimentante na agregação do solo, influenciando, diretamente, a retenção de água e o arejamento (FELLER & BEARE, 1997).

Para Stevenson e Cole (1999) os constituintes orgânicos do solo podem ser reunidos em dois grandes grupos: I – Não humificados e II – Humificados. Os componentes da matéria orgânica não humificada incluem aqueles compostos orgânicos de estrutura química definida (tais como lipídeos, carboidratos, nucleotídeos, aminoácidos, hormônios, ácidos orgânicos, etc.), resíduos animais e vegetais parcialmente decompostos e pela biomassa microbiana. Os componentes da matéria orgânica humificada representam a maior porção, consistindo de

substâncias húmicas, sendo elas amorfas, hidrofílicas, ácidas, parcialmente aromáticas e quimicamente complexas, que variam em peso molecular de poucas centenas até milhares de kDa (THENG et al., 1989). As substâncias húmicas por sua vez, são convencionalmente subdivididos em ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e huminas em função da solubilidade (em qualquer meio aquoso, em meio básico, e a fração residual insolúvel, respectivamente) (SANTOS & CAMARGO, 1999).



**Figura 4. Via da sinalização promovida por auxina.** Ativação, inativação e destruição dos receptores envolvidos nas respostas mediadas pela auxina (Adaptado de Santner et al., 2009). Aux/AIA (Proteína responsiva à Auxina/proteína induzida por Ácido Indol Ácético), AuxREs (elementos de REsposta à Auxina), ARFs (Fatores de Resposta à Auxina), F-box TIR1 (Resposta de Inibição de Transporte), Ub (Ubiquitina).

As substâncias húmicas são macromoléculas de alto peso molecular, sem fórmula molecular definida e geralmente compostas de cadeias aromáticas e alifáticas, grupos cetônicos, fenólicos, enólicos, entre outros, que também estão presentes no vermicomposto (Figuras 5 a 10) (SANTOS & CAMARGO, 1999).

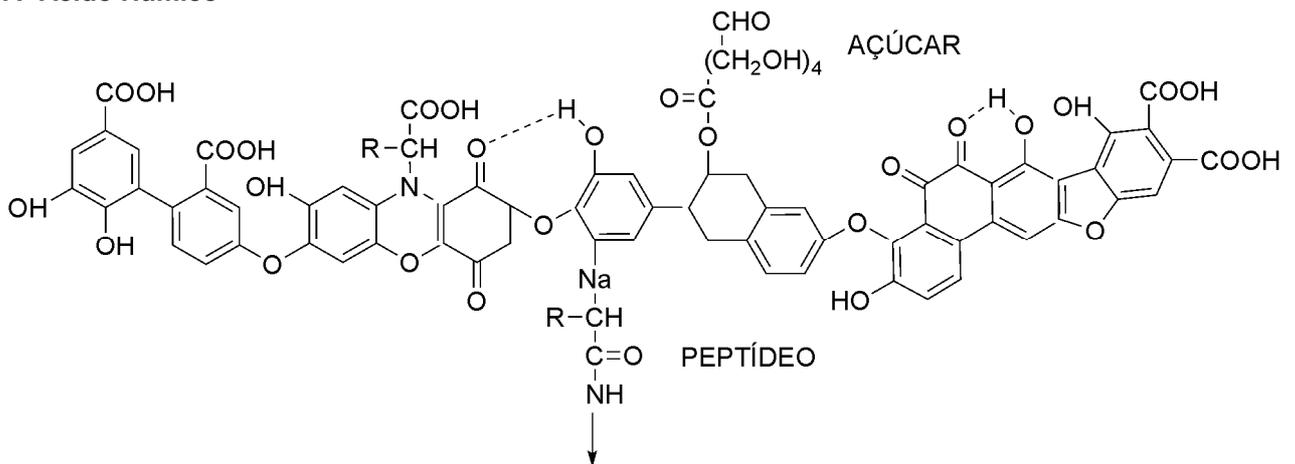
Porém, Piccolo (2002) definiu que as substâncias húmicas são associações supramoleculares de pequenas moléculas orgânicas que se mantêm reunidas devido a forças de atração fraca (ligações hidrofóbicas Van der Waals,  $\pi$ - $\pi$  e CH- $\pi$  e ligações de H). Outros grupos de pesquisa independentes confirmaram essa nova visão da estrutura química das

substâncias húmicas. Dessa forma, a definição das frações das substâncias húmicas foi revista, como se segue: Os ácidos fúlvicos são pequenas moléculas hidrofílicas associadas de forma que existam grupos funcionais ácidos suficientes para mantê-los dispersos em qualquer pH; os ácidos húmicos são compostos predominantemente hidrofóbicos associados que são estabilizados em pH neutro e podem flocular conforme o pH é reduzido. A estrutura dos ácidos húmicos em especial afeta diversos processos centrais na funcionalidade do ecossistema do solo incluindo a biodisponibilidade de nutrientes e a atividade biológica (MIELNICZUCK et al., 2003).

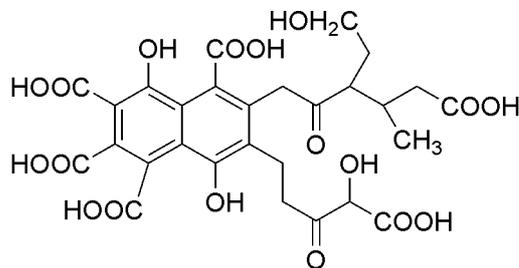
Estas moléculas desempenham um papel importante na qualidade dos sistemas agrícolas, pois interferem na disponibilidade de nutrientes para as plantas, são fontes de energia para os microrganismos do solo, influenciam de maneira decisiva nas características químicas, físicas e biológicas do solo (MIELNICZUK, 1999) e exercem efeitos diretos sobre o desenvolvimento das culturas (STEVENSON & COLE, 1999).

A relação entre estrutura e função das substâncias húmicas é objeto de crescente interesse nas pesquisas e cada vez mais são utilizados métodos precisos de análise química estrutural para tentar melhor compreender suas propriedades (CANELLAS, 1999; CHUKOV, 2000).

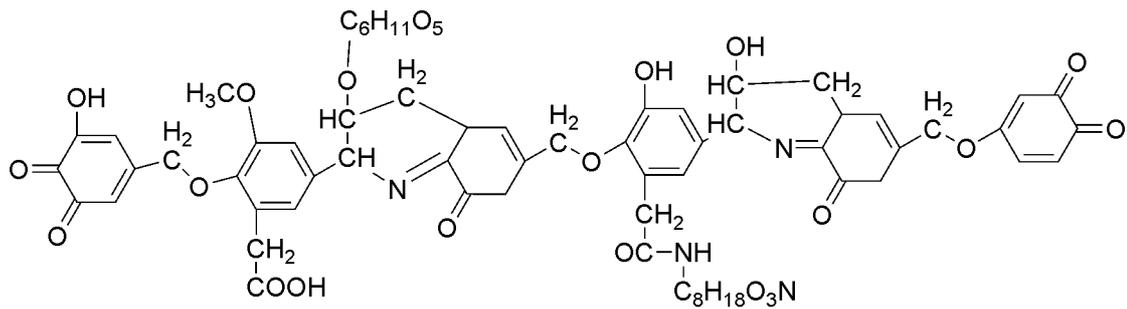
#### A- Ácido Húmico



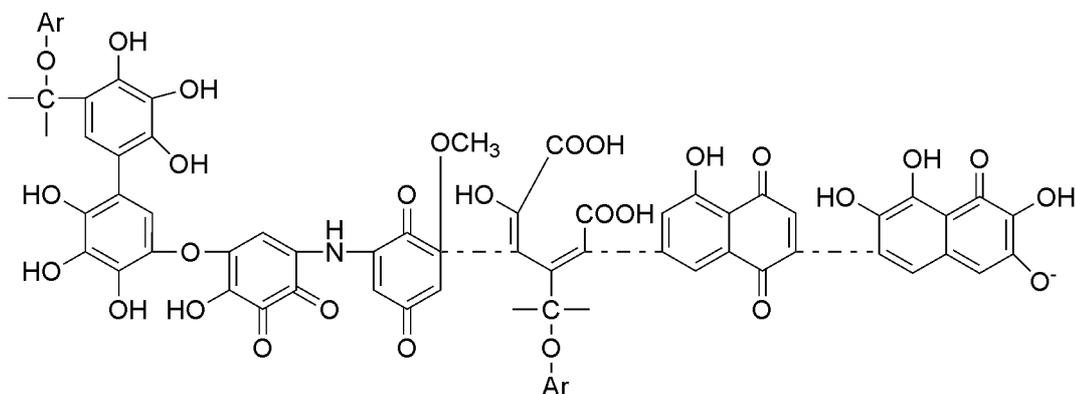
#### B- Ácido Fúlvico



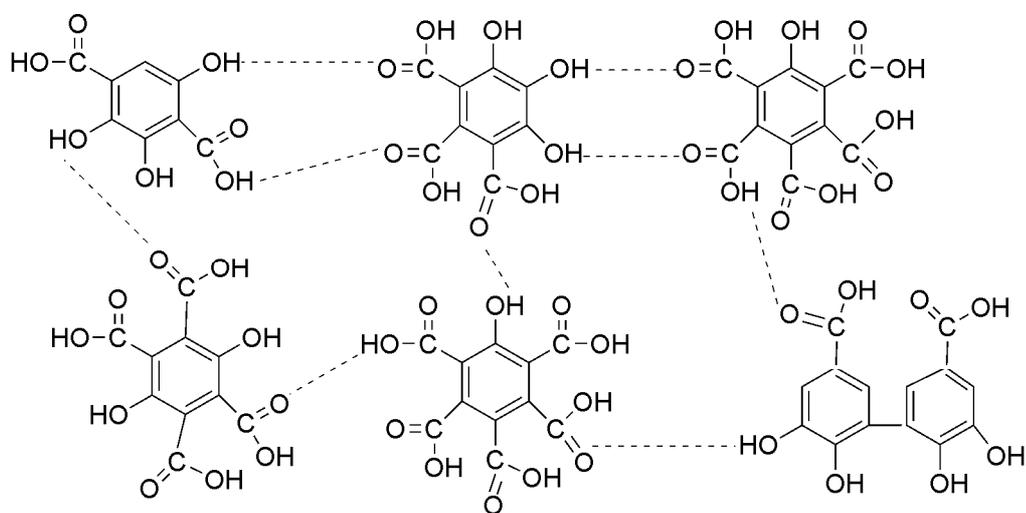
**Figura 5. Modelo estrutural do Ácido Húmico (A) (STEVENSON, 1982) e Ácido Fúlvico (B) (BUFFLE et al., 1977).**



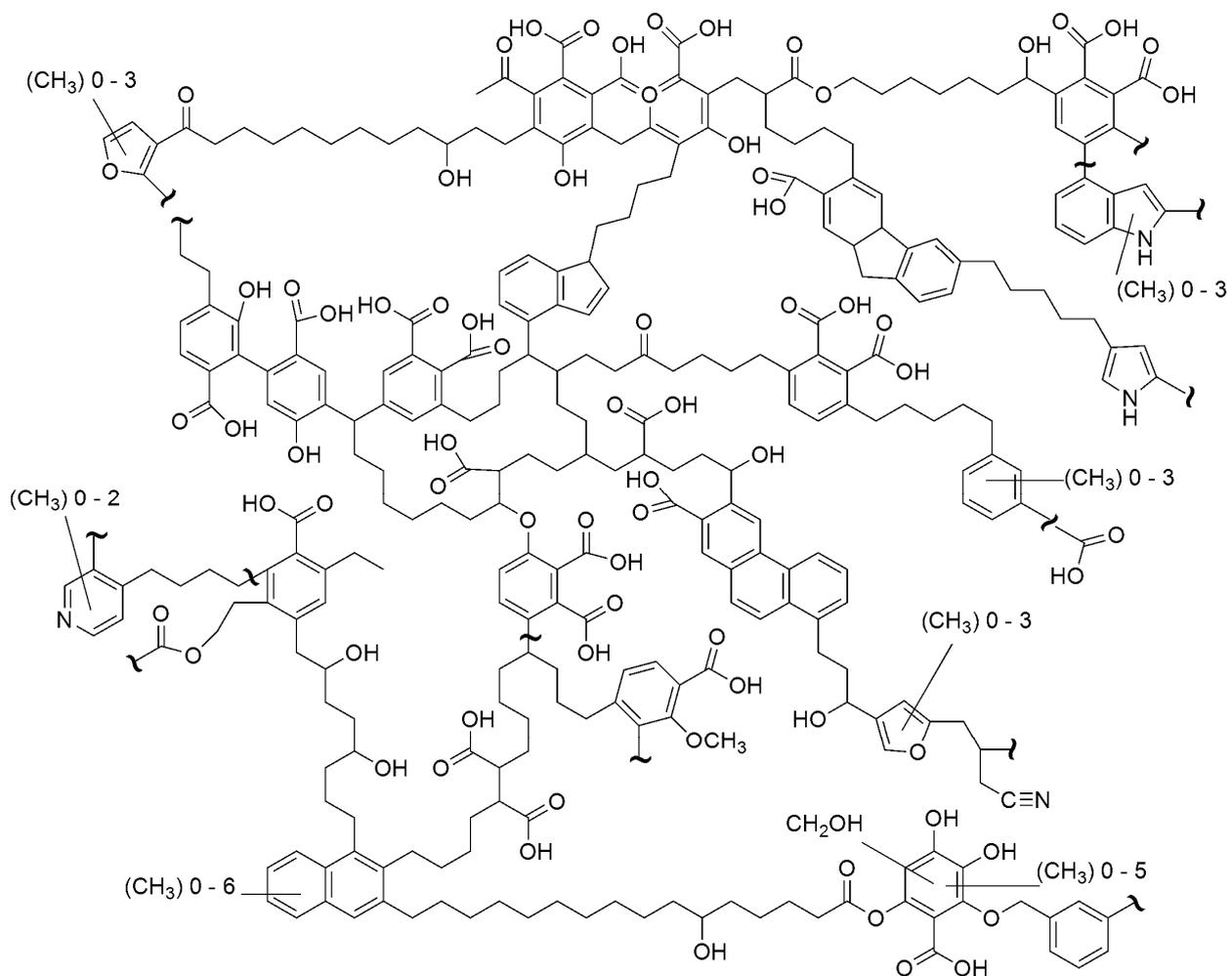
**Figura 6. Estrutura para o ácido húmico proposta por Dragunov's e reportada por Kononova em 1966.**



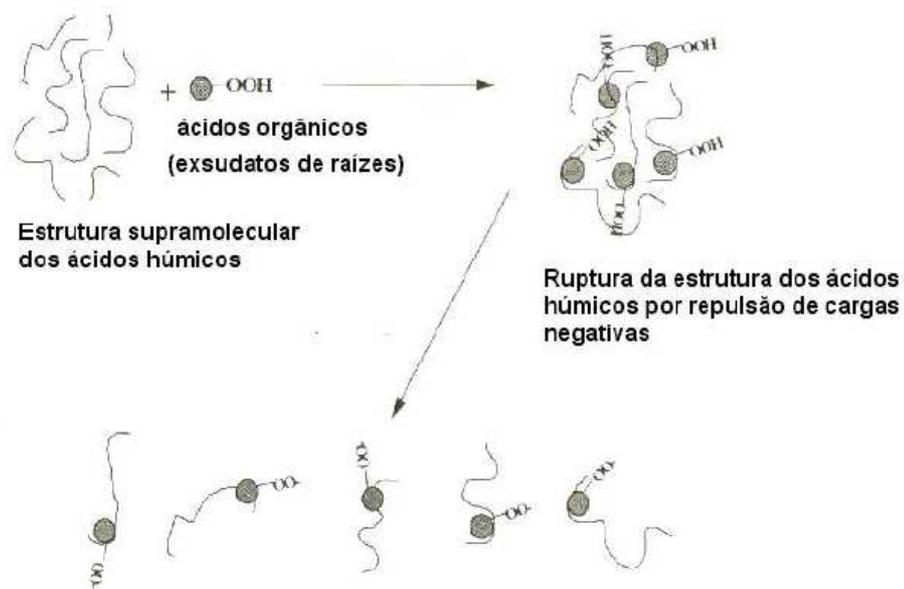
**Figura 7. Estrutura hipotética para o ácido húmico segundo Flaig (1975).**



**Figura 8. Estrutura proposta por Schnitzer & Khan (1972) para o ácido fúlvico.**



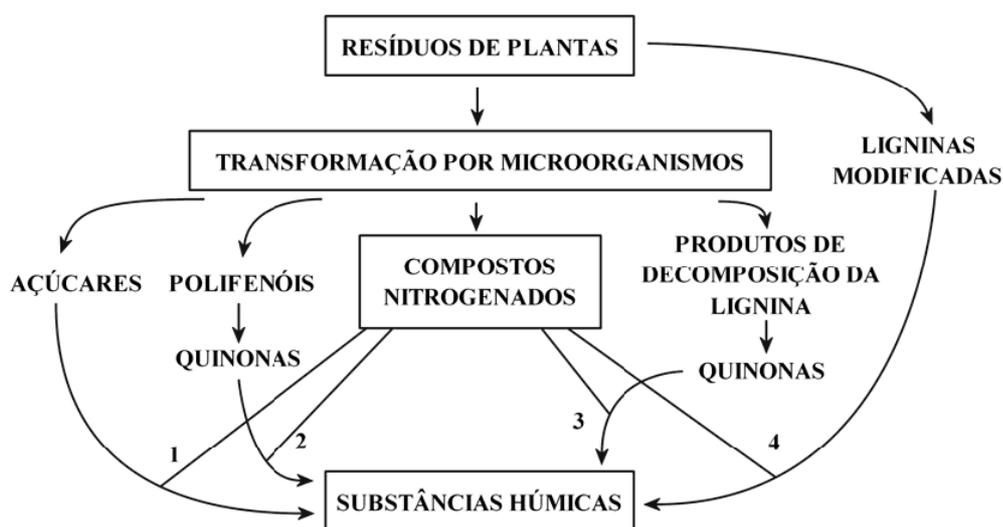
**Figura 9. Estrutura proposta para o ácido húmico por Schulten (1995).**



**Figura 10. Modelo estrutural de ácido húmico baseado no arranjo supramolecular, proposto por Piccolo (1996) e adaptado por Canellas e colaboradores (2005).**

### 2.4.1 Origem e Formação das Substâncias Húmicas

Existem pelo menos quatro vias principais (Figura 11) pelas quais as substâncias húmicas (SH) podem ser formadas durante a decomposição da matéria orgânica (Stevenson, 1994).



**Figura 11. Mecanismos de formação das substâncias húmicas (Adaptado de Stevenson, 1994).** Via 1 – teoria da condensação amino-açúcar; Vias 2 e 3 – teoria dos polifenóis; Via 4 – teoria das ligninas.

A teoria de formação de substâncias húmicas a partir de açúcares (teoria da condensação amino-açúcar – via 1 da Figura 11) é, talvez, a mais antiga. Maillard, em 1916, acreditava que as substâncias húmicas eram produtos da reação exclusivamente química entre açúcares redutores e aminoácidos (estes sim originados da atividade microbiana). Esse autor inclusive sintetizava compostos de coloração escura “semelhantes às substâncias húmicas”.

Surge então o conceito de humificação, que considera que a formação das substâncias húmicas se deve à decomposição microbiológica da matéria orgânica. Em 1921, Fischer & Schrader postularam uma nova teoria na qual se preconizava que as substâncias húmicas seriam essencialmente ligninas parcialmente modificadas (via 4 da Figura 11). A lignina é um biopolímero de estrutura complexa, formado pela combinação de unidades fenilpropanóides (álcoois coniferílico, cumárico e sinapílico) com outras subunidades, tais como éter guaiacilglicerol- $\beta$ -coniferílico, álcool diidroconiferílico, pinorresinol e dibenzodioxocina.

De acordo com Stevenson (1994), as vias 2 e 3 da Figura 11 formam as bases da chamada teoria dos polifenóis. Essas duas vias são muito semelhantes, diferindo apenas na fonte de polifenóis. Na via 2, os polifenóis originam-se de fontes de carbono não lignínicas ou são sintetizados por microrganismos específicos. Na via 3, a fonte de polifenóis é a lignina.

Os aldeídos e ácidos fenólicos, originados a partir da degradação parcial do biopolímero, podem sofrer recombinações entre si ou com outras moléculas orgânicas convertendo-se em quinonas. Essas quinonas poderiam sofrer reações de condensação com a amônia e outros compostos nitrogenados, como aminoácidos e proteínas, originando dessa forma as substâncias húmicas (STEVENSON, 1994).

Estruturalmente, os ácidos húmicos apresentam quatro grandes subunidades formadas por: (i) longas cadeias alquílicas, (ii) polissacarídeos e compostos nitrogenados, (iii) derivados aromáticos e (iv) grupamentos carboxílicos.

A composição dessas subunidades estruturais difere substancialmente entre os diferentes tipos de solos e cobertura podendo ser usada como um marcador das modificações do ambiente, apresentando uma maior importância como indicador ambiental (ZECH et al., 1997).

O grau de evolução dos ácidos húmicos indica a extensão do processo de humificação com aumento de massa molecular e com grau de complexidade estrutural. Os parâmetros físico-químicos mais comuns que norteiam o conceito de evolução dos ácidos húmicos (e das substâncias húmicas em geral) é a diminuição do grau de oxigenação, ou seja, diminuição no conteúdo de grupamentos  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{OH}$  e  $\text{OCH}_3$  (KÖGEL-KNABER et al., 1997); a diminuição da absorvância nos ácidos húmicos mais evoluídos (KUMADA, 1987); a maior razão E4/E6 que se relaciona inversamente com o menor grau de evolução dos ácidos húmicos apresentando valores entre 2 e 5 (KONONOVA, 1966) com a diminuição do teor de radicais livres do tipo quinonas e, finalmente, o aumento do conteúdo de C elementar com a evolução (SCHNITZER & KHAN, 1978). A relação entre a estrutura e a bioatividade dos ácidos húmicos é ainda um desafio.

Estes ácidos influenciam a fertilidade do solo através de uma melhoria geral das condições químicas e físicas para a atividade biológica tendo, além disso, substâncias ativas fisiologicamente (GUMINSKI, 1968; CANELLAS et al., 2001) podendo influenciar também a biota rizosférica.

#### **2.4.2 Dinâmica da Absorção das Frações Solúveis da Matéria Orgânica**

O efeito das substâncias húmicas na absorção pelas raízes não é facilmente explicável, devido a sua complexidade e natureza química desconhecida destas substâncias. Além disso, os efeitos descritos nos diversos trabalhos são de difíceis comparações, porque utilizaram substâncias húmicas com características diferentes (devido à origem do solo e dos métodos de extração). É possível que as substâncias húmicas possam apresentar efeitos diferentes em função do tipo de planta e que algumas destas podem resultar, diretamente ou indiretamente, em uma modulação na absorção de íons. (DELL'AGNOLA & FERRARI, 1971; DELL'AGNOLA, 1981). Por exemplo, Vaughan et al. (1985) demonstraram que as substâncias húmicas, de alto e de baixo peso molecular, estimulado pelo  $\text{NO}_3^-$  promoveram a expressão de proteínas do seu transportador específico e que também resultou na modificação dos parâmetros cinéticos (CACCO et al., 2000).

Os efeitos das substâncias húmicas, de baixo e de alto peso molecular, na absorção de  $\text{NO}_3^-$  também poderia ser explicada considerando que estas substâncias podem apresentar função de fitohormônio específico (NARDI et al., 1988), ou pelo fato destes induzem modificações do genoma, estimulando a expressão de alguns genes (ATTINÀ et al., 1992). Para isto em particular, foi mostrado por Nardi et al. (2000) que só as substâncias húmicas de baixo peso molecular, juntamente com atividade semelhante de giberelina, poderia aumentar a absorção de  $\text{NO}_3^-$ . Por outro lado, estas substâncias inibiram fortemente atividade de ATPases microsomal e a extrusão de prótons ( $\text{H}^+$ ) através das raízes, da mesma maneira que a giberilina ácida. Em todo caso, os mecanismos sugeridos podem explicar porque o efeito estimulatório das substâncias húmicas de baixo peso molecular na absorção  $\text{NO}_3^-$  requer longos períodos de incubação (NARDI et al., 2002).

Como é conhecido o transporte ativo e primário, através das células das plantas, depende da presença de uma bomba de prótons vanadato sensível ( $\text{H}^+$ -ATPase) e este efeito cria um gradiente de prótons eletro-químico, na membrana plasmática (MORSOMME & BOUTRY, 2000). Posteriormente o transporte ativo secundário é energizado, realizado por transportadores protéicos via simporte ou antiporte. Neste contexto,  $\text{NO}_3^-$  é transportado para a parte aérea por indução dos  $\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  via simporte com uma estequiometria de 2:1 (MILLER & SMITH, 1996).

Outras evidências são propostas pela hipótese de que as substâncias húmicas de baixo peso molecular pudessem interagir com o transporte de proteínas (adequado), principalmente na modulação de absorção de  $\text{NO}_3^-$ . Esta regulação é reforçada pela observação de que as substâncias húmicas de baixo peso molecular podem alcançar o apoplasto e interagir com a membrana plasmática das raízes (VAUGHAN, 1986) e de células de culturas de cenoura (MUSCOLO & NARDI, 1999). A primeira evidência para um efeito das substâncias húmicas está no transporte de proteínas e o estímulo na atividade de  $\text{K}^+$ -ATPase (semelhante ao  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática) de frações microssomais (MAGGIONI et al., 1987; PINTON et al., 1992).

Resultados semelhantes também foram obtidos mostrando que o ácido húmico estimulou a extrusão de prótons (vanadato-sensível) através das raízes, embora este aumento apareça somente após 2-4 h de incubação (PINTON et al., 1997). Não obstante, este efeito tem sido interpretado como consequência de um estímulo direto do ácido húmico na bomba de prótons ( $\text{H}^+$ -ATPase). Substâncias húmicas de baixo peso molecular também poderiam estimular a atividade de  $\text{H}^+$ -ATPase de isolados da membrana plasmática (VARANINI et al., 1993), determinando assim um aumento no gradiente de prótons de substâncias eletroquímicas, e que poderiam ser, pelo menos em parte, responsável pelo estímulo da absorção de  $\text{NO}_3^-$  (PINTON et al., 1999).

Finalmente, devido a sua natureza polianiónica (ácida), as substâncias húmicas simplesmente podem agir como moléculas bioativas (NARDI et al., 2002; LIMA, 2004).

### 2.4.3 Efeitos Fisiológicos dos Ácidos Húmicos em Plantas

Além de fornecer nutrientes para as plantas através da mineralização, as substâncias húmicas podem estimular diretamente o crescimento e a produtividade das plantas. Os efeitos dos ácidos húmicos sobre o metabolismo das plantas são atribuídos por Nannipieri e colaboradores (1993) aos seguintes fatores:

- (i) Influência positiva sobre o transporte de íons, facilitando a absorção,
- (ii) Aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs, resultando em maior produção de ATP,
- (iii) Aumento no conteúdo de clorofila,
- (iv) Aumento na velocidade e síntese de ácidos nucleicos,
- (v) Efeito seletivo sobre a síntese protéica, e
- (vi) Aumento ou inibição da atividade de enzimas.

A atuação da auxina no desenvolvimento radicular é bastante estudada (FRÍAS et al., 1996). A iniciação de raízes laterais é influenciada por sinais do ambiente como a disponibilidade de nutrientes, água,  $\text{NaCl}$  e matéria orgânica (MALAMY 2005; DOBBS et al. 2007). As raízes laterais se originam de células maduras do periciclo da raiz. A sinalização desencadeada pela auxina leva à divisão das células do periciclo, formando-se sítios mitóticos, precursores de raízes laterais (DE SMET et al., 2006; ZANDONADI et al., 2007). O controle da arquitetura e morfologia das raízes não é influenciado somente pela auxina produzida pelas plantas. A indução de raízes laterais por auxinas exógenas é um fenômeno natural, uma vez que este hormônio está presente no ambiente em diferentes formas, inclusive associado às substâncias húmicas (NARDI et al., 2000).

Está estabelecido na literatura que o mecanismo de ação da auxina envolve a ativação da  $\text{H}^+$ -ATPase de membrana plasmática (FRÍAS et al., 1996), enzima responsável pela regulação de funções-chaves na célula vegetal, incluindo a absorção de nutrientes, expansão da parede celular e respostas a estresses. O mecanismo do crescimento ácido, fundamentado na acidificação da parede celular é relacionado também com a ativação da  $\text{H}^+$ -ATPase e o consequente decréscimo do pH apoplástico (HAGER, 2003). Tem sido proposto que as

substâncias húmicas podem aumentar o crescimento das raízes de uma maneira semelhante à promovida pela auxina, por ativar também, além da bomba de prótons ( $H^+$ ) da plasmalema (CANELLAS et al., 2002; QUAGGIOTTI et al., 2004; ELENA et al., 2009), as bombas de  $H^+$  do vacúolo (ZANDONADI et al., 2007). Embora alguns estudos tenham demonstrado que algumas substâncias húmicas podem aumentar o desenvolvimento de raízes provenientes de ramos por afetar o transporte de auxina (NARDI et al., 1994), outras frações (solúveis em água) parecem atuar de uma maneira independente dos elementos de resposta a auxina (AuxRes) em raízes de *Arabidopsis thaliana* (SCHMIDT et al., 2007). Além disso, os ácidos húmicos provenientes de diferentes solos e resíduos, normalmente estimulam o crescimento radicular mais intensamente do que o AIA fornecido exógenamente, sugerindo a presença de moléculas com atividade biológica nessas substâncias ainda não identificadas (ZANDONADI et al. 2007). Aparentemente ainda não está claro se a fração ácido húmico poderia alterar o desenvolvimento vegetal influenciando o transporte e/ou a sinalização da auxina, ou mesmo por outra via hormonal não estudada.

O estudo da ação direta das substâncias húmicas sobre o metabolismo e o crescimento das plantas tem sido pautado, principalmente, sobre os ácidos fúlvicos, ou seja, a fração humificada considerada de menor massa molecular, pois não era possível conceber que uma substância de massa dois ou três milhões de vezes maiores como os ácidos húmicos (na ordem de micrômetros) pudessem passar por poros ou espaços aparentes no apoplasto (na ordem de nanômetros) (VALDRIGHI et al., 1996). No entanto, baseando-se na concepção emergente do arranjo supra-estrutural de substâncias húmicas, compostos de reconhecida capacidade de regulação e estimulação do crescimento vegetal tais como os hormônios vegetais (moléculas com atividade auxínica) podem estar fracamente unidos à supra-estrutura das substâncias húmicas e serem liberados para a solução do solo e para a absorção das plantas por uma simples variação de pH na interface das raízes decorrentes da exsudação de ácidos orgânicos. Assim, os ácidos húmicos e seus domínios hidrofóbicos podem atuar como um reservatório de compostos químicos, capazes de promover a liberação de determinados componentes de acordo com sinais químicos emitidos entre a planta e seu ambiente de crescimento. O produto desta interação causa alterações físico-químicas no ambiente radicular externo, que, por conseguinte promovem alterações estruturais nas partículas supra-estruturais dos ácidos húmicos (QUAGGIOTTI et al., 2004). Tais alterações, podem supostamente gerar subunidades/fragmentos de baixo peso molecular, potencialmente capazes de induzirem alterações no metabolismo celular de plantas (Figura 12). Embora os detalhes moleculares que respondem pelas alterações fisiológicas na planta sejam pouco explorados, tais subprodutos de baixo peso molecular podem ser reconhecidos por receptores presentes na plasmalema ou mesmo de modo não conhecido serem internalizados (via apoplasto/simplasto) e elicitarem respostas em nível celular, eventos de transcrição e transdução específicos, resultando em alterações estruturais e fisiológicas na planta (CANELLAS et al., 2010).

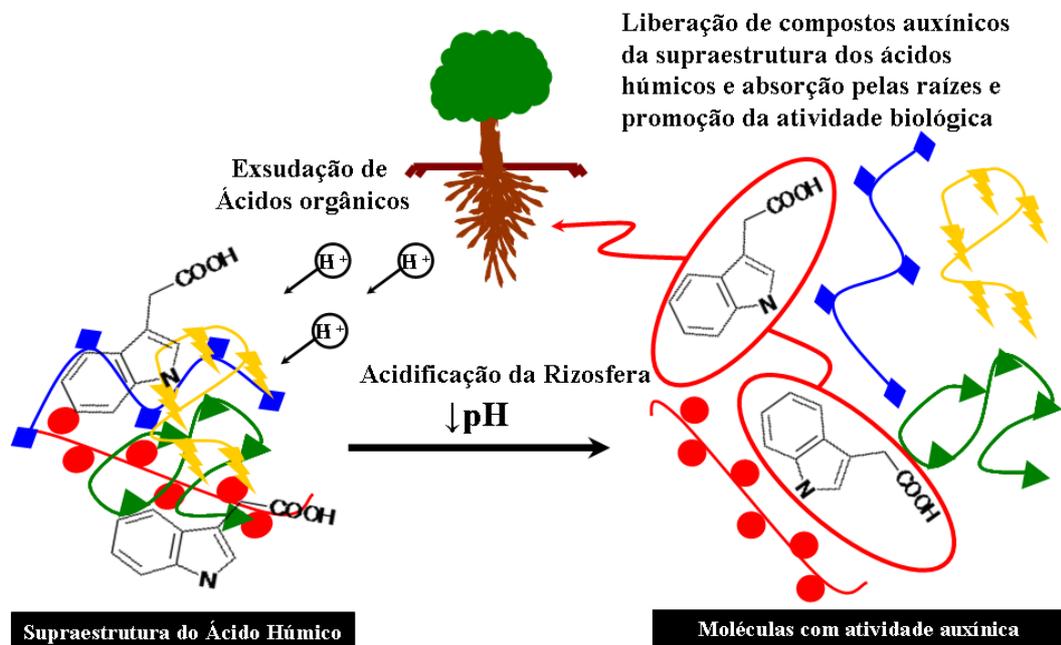
De acordo com Guminski (1968), o estímulo ocasionado pelas substâncias húmicas influenciam direta e indiretamente os processos bioquímicos da planta. Os efeitos diretos são aqueles que alteram o metabolismo vegetal, enquanto os efeitos indiretos afetam as qualidades físicas do solo (aumento do conteúdo de água e redução da compactação do solo, por exemplo) ou a eficiência dos fertilizantes químicos.

Muitos trabalhos explicam a estimulação do crescimento pelos efeitos indiretos das substâncias húmicas sobre a complexação de íons importantes à nutrição mineral vegetal (Chen & Aviad, 1990; Chen et al., 2004). Realmente a absorção de íons é alterada pela presença de ácidos húmicos (VAUGHAN & MALCOM, 1985), os quais podem estimular síntese de proteínas carreadoras de íons. As substâncias húmicas podem facilitar a absorção

de Fe auxiliando a redução de Fe (III) para Fe (II) em plantas sob deficiência de Fe (PINTON et al., 1999).

Entretanto, além de fornecer nutrientes para as plantas através da mineralização, os ácidos húmicos também podem estimular diretamente o crescimento e a produtividade das plantas. Os efeitos das substâncias húmicas sobre o desenvolvimento vegetal são dependentes da fonte de obtenção, das doses utilizadas e da espécie da planta estudada (VAUGHAN & MALCOM, 1985)

Diante de efeitos tão diversos, os alvos para estudo da interação ácidos húmicos-planta são difíceis de serem estabelecidos, particularmente devido à natureza complexa da estrutura dos ácidos húmicos e da diversidade bioquímica do organismo vegetal (QUAGGIOTTI et al., 2004). Exemplificando, as enzimas  $H^+$ -ATPases de membrana plasmática são enzimas chaves na absorção de nutrientes (FAÇANHA et al., 2002) e crescimento radicular (CANELLAS et al., 2008; DOBBS et al., 2007; DE SMET et al., 2006; QUAGGIOTTI et al., 2004) influenciando o metabolismo e a adaptação de plantas ao meio ambiente, podendo estas serem consideradas como alvos sensíveis para a identificação de respostas da atividade biológica dos ácidos húmicos.



**Figura 12.** A acidificação da rizosfera das plantas promove o rearranjo das moléculas presentes na supra-estrutura dos ácidos húmicos, permitindo a liberação de moléculas com atividade auxínica, causando o crescimento das raízes e parte aérea.

## 2.5 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora fundamental tanto para as plantas quanto para os mamíferos. O radical NO vem emergindo como um importante mensageiro, que regula uma diversidade de processos biológicos em diferentes espécies (BELIGNI e LAMATTINA, 2001).

O NO é uma molécula neutra com 11 elétrons na camada de valência, que possui um elétron não-emparelhado. Seu caráter radicalar lhe confere uma alta reatividade (meia-vida de 5 a 10 s *in vitro*) (IGNARRO, 1990), especialmente frente a outras moléculas paramagnéticas, tais como oxigênio molecular ( $O_2$ ) e ânion superóxido ( $O_2^-$ ). O NO pode também complexar-se com metais de transição como o ferro, deslocando o elétron desemparelhado para os orbitais *d* vazios do metal.

Em seu estado puro, sob condições normais de temperatura e pressão, o NO é um gás. Sua solubilidade é moderada em água (1,9 mM a 25°C), sendo muito mais solúvel em solventes apolares, tais como hexano (0,13 M a 25°C) (SHAW & VOSPER, 1977). Desta forma, quando presente em sistemas biológicos, o NO tende a se concentrar em ambientes lipofílicos, como membranas e domínios hidrofóbicos de proteínas (KERWIN et al. 1995).

Essa importante molécula tem se destacado como sinalizadora, atuando em diversos processos de crescimento e desenvolvimento, bem como nas respostas de defesa a estresses bióticos ou abióticos (LAMATTINA et al., 2003; NEILL et al., 2007). O NO é um gás reativo, facilmente formado e rapidamente difusível em um sistema biológico. No metabolismo celular existe um paradoxo em relação ao NO, isto porque, este gás pode atuar como oxidante (altamente tóxico) ou como antioxidante (efeito protetor). Estes eventos são demonstrados dependendo da condição celular e da concentração do gás presente na célula, ou seja, esta molécula atua como sinalizadora no metabolismo vegetal.

Em situações que as espécies reativas de oxigênio são predominantes, o NO pode atuar na regulação da homeostase celular, proporcionando efeito antioxidante. Ele pode atuar como um sinalizador contra o dano oxidativo e conseqüente morte celular (BELIGNI et al., 2006), desta forma previne-se a morte celular programada. Essa molécula atua no controle do crescimento de raízes (GOUVÊA et al., 1997; PAGNUSSAT et al., 2004), na germinação de sementes (KEELEY & FOTHERINGHAM, 1997), na extensão foliar (LESHEM & HARAMATY, 1996), na fotomorfogênese (PAGNUSSAT et al., 2003), na lignificação da parede celular (FERRER & ROS-BARCELÓ, 1999), na diferenciação celular (GABALDON et al., 2005; SANTA-CATARINA et al., 2007) e na senescência de folhas e maturação dos frutos (LESHEM & HARAMATY, 1996).

As enzimas que catalisam a síntese deste radical e as cascatas de sinalização que mediam os efeitos do NO são objetos de estudo e descoberta recentes, levando a um melhor entendimento de como este radical atua influenciando na resposta vegetal a vários estímulos (WENDEHENNE et al., 2004).

Até o momento, existem duas vias de produção enzimática para o NO, das quais uma seria dependente de L-Arg via atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Ribeiro, 1999). A outra via enzimática envolve a nitrato redutase citoplasmática (YAMASALI et al., 2000; ROCKEL et al. 2002) e a nitrito/NO redutase (Ni-NOR) da membrana plasmática (STOHR et al., 2001). Por outro lado, há evidências de um mecanismo independente das enzimas citadas anteriormente, no qual o NO é sintetizado no apoplasto em pH baixo a partir do nitrito (BETHKE et al., 2004).

É conhecido que a molécula NO desempenha um papel central na determinação da morfologia e no padrão de desenvolvimento de raízes (LOMBARDO et al., 2006). As primeiras evidências acerca da participação do NO no desenvolvimento de raízes induzido por auxina foram providas por Gouvêa e colaboradores (1997). O acúmulo de NO em resposta ao tratamento com auxina foi mostrado por Pagnussat e colaboradores (2002) em enxertos de pepino durante a formação de raízes adventícias.

A aplicação de auxina em raízes resultou na produção localizada de NO durante a formação de raízes laterais, assim como o acúmulo assimétrico de NO no ápice da raiz durante a resposta gravitrópica (CORREA-ARAGUNDE et al. 2004; LOMBARDO et al. 2006). A formação de raízes laterais e adventícias, bem como a resposta gravitrópica da raiz foi prevenida pela aplicação do seqüestrador de NO, o cPTIO, sugerindo uma importante função do NO endógeno mediando estes processos (PAGNUSSAT et al., 2002).

Há, portanto, crescentes evidências de que o NO desempenha funções importantes em diversos processos fisiológicos em plantas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Experimento 1: Extração e caracterização da matéria orgânica humificada dos solos

Foram retiradas amostras de terra na camada de 0 - 20 cm da superfície de dois solos localizados em Pinheiral-RJ e classificados como Latossolo Vermelho-Amarelo e Chernossolo Háptico segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2006) e um solo proveniente de Santa Cruz-RJ, classificado como Organossolo Háptico pelo mesmo sistema. Os solos apresentavam em sua cobertura a gramínea braquiária (*Brachiaria decumbens*), manejada com rotação de piquetes, com gado da raça Nelore.

Foi feita a análise de rotina das amostras de terra para verificação da composição de nutrientes, segundo a metodologia da EMBRAPA, 1997.

O fracionamento químico quantitativo das substâncias húmicas foi realizado segundo Benites et al., (2003), sendo obtidas as frações humina (H), ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF).

A determinação quantitativa de carbono dos extratos nas frações obtidas foi feita através da oxidação do carbono com dicromato de potássio e titulação do excesso, com sulfato ferroso amoniacal de acordo com Yeomans e Bremner (1988). Foram obtidos os valores absolutos de cada fração e da soma destes, em miligrama de carbono por grama de solo, e também o percentual de cada fração em relação ao carbono total.

A extração química e purificação dos ácidos húmicos para fins analíticos foram realizadas na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), conforme o método da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), na UENF, cujo protocolo metodológico encontra-se descrito em Swift (1996), com modificações do protocolo para o pré-tratamento da amostra de solo com solução de HCl a pH entre 1 e 2, para redução do conteúdo de cinzas (remoção de metais adsorvidos), e utilização do  $K^+$  para remoção dos sólidos em suspensão (NOVOTNY, 2002). O extrato contendo o ácido húmico foi seco por liofilização para posterior caracterização química e físico-química.

Para a determinação da composição elementar dos ácidos húmicos foi utilizado o analisador elementar automático C H N, em amostras de 20mg de ácido húmico em triplicata, onde o conteúdo de oxigênio foi calculado pela diferença entre a massa total menos a massa dos elementos C H N.

A acidez total foi determinada conforme descrito por Schintzer e Gupta (1965), adicionando-se em amostras de 50mg de ácidos húmicos em kitasato, 20mL de  $Ba(OH)_2$  0,125mol L<sup>-1</sup> preparado com água sem CO<sub>2</sub> dissolvido a partir da água fervida e uma amostra branco.

A acidez carboxílica foi determinada pelo método do acetato por titulação potenciométrica, conforme SCHINITZER & GUPTA (1965).

O grau de humificação dos ácidos húmicos (relação E4/E6) foi obtida através da razão da absorvância na região do ultra- violeta visível (UV-Vis) de uma solução de ácido húmico (4mg em 100mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,05mol L<sup>-1</sup>) em absorvância de 465 nanômetros (nm) (E4) e 665 nm (E6), em triplicata.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) dos ácidos húmicos (STEVENSON, 1994; STEVENSON & GOH, 1971) foram obtidos na faixa de intensidade de ondas (número de ondas cm<sup>-1</sup>) de 400cm<sup>-1</sup> até 4000cm<sup>-1</sup>, utilizando-se pastilhas com 1,00 mg de ácido húmico em 100mg de KBr (TAN, 1995), com correção da linha base para absorção igual a zero em 4000cm<sup>-1</sup> e posteriormente em 2000cm<sup>-1</sup>.

O índice de condensação (IC) foi estabelecido pela razão aromático/alifáticos (grupamentos aromáticos, quinonas e/ou carboxilatos) e estiramento C-H do grupamento hidrofóbico -CH<sub>3</sub> alifático. Foi realizado o índice de hidrofobicidade (IH), que avalia a

resistência, através da relação alifáticos/polissacarídeos (estiramento C-H do grupamento hidrofóbico -CH<sub>3</sub> alifático) e estiramento C-O de grupamentos hidrofóbicos de polissacarídeos.

**3.2 Experimento 2:** Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e de óxido nítrico no crescimento de raízes transformadas de manjeriço

### 3.2.1. Material vegetal e condições de crescimento e tratamentos

As raízes transformadas de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.) clone MR3 desenvolvida por Nicomedes Junior (2003) foram obtidas do laboratório de Bioquímica de Plantas da UFRRJ. As raízes foram cultivadas sob condições esterilizadas e no escuro. Para a padronização das raízes, dois segmentos de três centímetros de ápice radicular foram multiplicados *in vitro*, em erlenmeyer contendo 75 mL de Meio Mínimo (MM) (BÉCARD & FORTIN, 1988) modificado para ½ Força Iônica, pH ajustado para 5,8 e crescidas durante 35 dias, sob agitação de 80rpm e temperatura controlada de 25°C ± 1. Após a padronização, segmentos de ápice radicular de três centímetros foram repicados para placas de Petri vertidas com Meio Mínimo (MM) (BÉCARD & FORTIN, 1988) modificado para ½ Força Iônica e pH ajustado para 5,8, acrescidos dos tratamentos com os ácidos húmicos em doses equivalentes a 0; 1; 2; 3; 4 e 5mM Carbono L<sup>-1</sup> e nitroprussiato de sódio (SNP) (doador de óxido nítrico), nas doses de 0; 0,1; 10; 50, 100 e 200µM de SNP L<sup>-1</sup>, cultivadas em câmara de crescimento, com temperatura controlada de 25°C ± 1. Os ácidos húmicos dos três solos estudados (AH1-Chernossolo Háplico, AH2-Latossolo Vermelho-Amarelo e AH3-Organossolo Háplico) foram extraídos e liofilizados conforme procedimento adotado pela sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS) descrito por SWIFT (1996). As concentrações de ácido húmico foram calculadas em função do teor de carbono encontradas na análise da composição elementar (Experimento 1).

Foram feitas duas quantificações, sendo a primeira feita aos cinco dias (5 dias) e a segunda aos 15 dias após a montagem do experimento. Os controles consistiram de plantas crescidas sem as substâncias bioativas.

### 3.2.2. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições (sendo cada repetição composta por duas placas), no esquema fatorial 3 X 6 X 2 (três ácidos húmicos: AH1-Chernossolo Háplico, AH2-Latossolo Vermelho-Amarelo e AH3-Organossolo Háplico); (seis doses de ácido húmico); e (dois dias de quantificação para avaliar o incremento nos parâmetros de crescimento). O esquema de fatores para os tratamentos com óxido nítrico foi o 6 X 2, sendo seis doses de SNP e dois dias de quantificação.

Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se o programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas – Universidade Federal de Viçosa) (RIBEIRO JÚNIOR, 2001). Foram realizados os testes de normalidade (Teste de Lilliefors) e de homogeneidade das variâncias (Cochran e Bartlett) e posteriormente submetidos à análise de variância e o nível de significância analisado através do teste de F (p < 0,05). Quando as variáveis apresentavam-se significativas pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knot (p < 0,05). Também foram realizadas as correlações entre os parâmetros de crescimento radicular.

### 3.2.3. Avaliações

#### 3.2.3.1. Mensuração do crescimento radicular

Na montagem do experimento, aos cinco e 15 dias após o tratamento das raízes transformadas de manjeriço foi realizada a captura de imagens das placas de Petri com

resolução de 1280 x 960 pixels, 16,7 milhões de cores (24 Bits), no formato JPEG. Posteriormente as imagens foram processadas utilizando o software “Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo” 3.0 (SIARCS® 3.0) (JORGE & CRESTANA, 1996), para a avaliação do comprimento (Equação 1), área (Equação 2) e incremento do comprimento radicular (Equação 3), seguindo o protocolo de editoração de imagens proposta por Lima et. al., (2006).

#### Equação 1

$$\text{comprimento radicular relativo (\%)} = \left( \frac{\text{tamanho tratamento} - \text{tamanho controle}}{\text{tamanho controle}} \right) \times 100$$

#### Equação 2

$$\text{área radicular relativa (\%)} = \left( \frac{\text{área tratamento} - \text{área controle}}{\text{área controle}} \right) \times 100 - 100$$

#### Equação 3

$$\text{incremento radicular relativo (\%)} = \left( \frac{\text{tamanho final da EA} - \text{tamanho inicial da EA}}{\text{tamanho inicial da EA}} \right) \times 100 \text{ EA}$$

– Época Avaliada

#### 3.2.3.2. Frequência de sítios mitóticos

As raízes transformadas de manjeriço roxo foram coletadas, e analisadas segundo a metodologia de Canellas et al. (2002) (6 repetições por tratamento). As raízes foram lavadas com água e clareadas em solução de KOH 0,5 % durante 20 minutos em banho a 75 °C. Após esse clareamento, as raízes foram lavadas novamente e mantidas no escuro por 14 horas tingindo em solução de hematoxilina férrica. Então, as raízes foram enxaguadas com água e clareadas com ácido láctico 80% durante 30 a 90 segundos em banho a 75° C. As raízes foram transferidas individualmente para placas de Petri com água destilada e observadas sob a lupa estereoscópica, para avaliar o número de sítios mitóticos. Esses sítios aparecem como pontos vermelho-escuros contra um fundo da cor do tecido da raiz. Os sítios mitóticos foram expressos pela densidade de sítios mitóticos (número de sítios mitóticos por cm de raízes transformadas), de acordo com a Equação 4.

#### Equação 4

$$\text{densidade de sítios mitóticos relativa (\%)} = \left( \frac{\text{no de SM final} - \text{no de SM inicial}}{\text{no de SM inicial}} \right) \times 100$$

SM – Sítios Mitóticos

#### 3.2.3.3. pH Rizosférico

A avaliação do pH rizosférico foi feita aos cinco dias (5 dias) após a montagem do experimento. As imagens das raízes foram obtidas no momento do acondicionamento das raízes no meio com indicador misto de pH e cinco horas após este acondicionamento, onde foram mensuradas as áreas de acidificação e/ou alcalinização na interface das raízes em duas soluções distintas, uma solução controle e uma solução com inibidor vanadato (que inibe a atividade das bombas de prótons da membrana plasmática). A solução controle utilizada continha um indicador misto de pH (RÖMHELD et al., 1984), adquirindo uma tonalidade amarelada quando ácidos e arroxeada quando alcalinos.

Para a avaliação da área de mudança do pH rizosférico foi utilizada a metodologia de editoração de imagens proposta por Lima et al. (2006). Foram coletados segmentos de raízes, com aproximadamente 8 cm de comprimento (6 repetições por tratamento), com auxílio de uma pinça anatômica, evitando ao máximo provocar injúrias, e lavadas em água destilada corrente com pH ajustado para 6,0 sob peneira plástica com diâmetro de 1 mm. Em seguida, foram secadas em papel absorvente e acondicionadas nas placas Petri contendo os meios com indicador misto de pH e após o tempo necessário foram mensuradas as áreas referentes ao pH alcançado, de acordo com a Equação 5.

#### Equação 5

$$\text{área de acidificação (\%)} = \left( \frac{\text{área acidificada final} - \text{área inicial da raiz}}{\text{área inicial da raiz}} \right) \times 100$$

**3.3 Experimento 3:** Efeitos do ácido húmico e do NO associados a duas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sobre o crescimento de raiz, metabolismo do nitrogênio, atividade das bombas de prótons, catalase e histolocalização radicular de NO e ROS em raízes transformadas de manjeriço

##### 3.3.1. Material vegetal e condições de crescimento e tratamentos

Foram utilizadas raízes transgênicas (*hairy roots, raízes em cabeleira*) de manjeriço roxo (MR3) (*Ocimum basilicum* L.) (NICOMEDES JUNIOR, 2003).

As raízes foram multiplicadas *in vitro*, utilizando-se erlenmeyer contendo Meio Mínimo (MM) (BÉCARD & FORTIN, 1988), modificado para ½ Força Iônica, num período de 35 dias após a repicagem (DAR), utilizando dois segmentos de três centímetros de ápice radicular. Aos 35 DAR, a solução foi trocada e as raízes transformadas foram colocadas no Meio Mínimo modificado sem N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> durante 72 horas, visando o esgotamento de nitrogênio no interior da célula. Após as 72 horas sem N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, as raízes transformadas foram transferidas para erlenmeyer contendo Meio Mínimo modificado para ½ Força Iônica com os níveis de baixo e alto de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, com seus respectivos tratamentos, sob agitação constante a velocidade de 90 rpm, no escuro.

Neste estudo foram escolhidas as doses de 3mM de carbono L<sup>-1</sup> para o ácido húmico de Organossolo e 100 μM de SNP L<sup>-1</sup> a partir do prévio estudo (Experimento 2), devido ao fato destas doses (NO-SNP e ácido húmico-Organossolo Háplico) apresentarem maiores valores para os parâmetros de crescimento radicular estudados.

Foram avaliados os efeitos do suprimento de baixo (0,5mM) e alto (5,0mM) teor de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, frente a um controle (cada suprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); ao ácido húmico e NO nas doses supracitadas.

##### 3.3.2. Delineamento experimental e análise estatística

Foram feitas duas coletas, sendo a primeira aos cinco dias (5 dias) após a montagem do experimento e a segunda coleta aos 15 dias após a montagem do experimento.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por quatro erlenmeyers. O esquema de fatorial foi o 3 X 2 X 2 (Controle, ácido húmico-Organossolo Háplico (AH) e NO); (suprimento baixo e alto de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); e (dois dias de coleta).

Os dados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico, conforme descrito no Experimento 2.

### 3.3.3. Determinações realizadas

#### 3.3.3.1. Isolamento de vesículas de plasmalema e tonoplasto para a Atividade das Bombas de Prótons

Foi realizada segundo a metodologia de YAN et al. (2002) com modificações de SANTOS (2006).

O processo descrito para o isolamento das vesículas foi realizado de 0 a 4°C. Amostras de raízes (5 g de massa fresca) foram maceradas em almofariz e pistilo com 10 a 20 mL do meio de extração contendo: Tris-HCl 50 mmoles L<sup>-1</sup> (pH 8,0), sacarose 250 mmoles L<sup>-1</sup>, glicerol 100 mL L<sup>-1</sup>, KI 150 mmoles L<sup>-1</sup>, cloreto de colina 100 mmoles L<sup>-1</sup>, EGTA 2 mmoles L<sup>-1</sup>, EDTA 2 mmoles L<sup>-1</sup>, polivinilpirrolidona (PVP) 10 g L<sup>-1</sup>, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) 1 mmol L<sup>-1</sup>, ditioneitol (DTT) 5 mmoles L<sup>-1</sup>, 2-mercaptoetanol 5 mmoles L<sup>-1</sup> e 5 g L<sup>-1</sup> de albumina.

O homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e em seguida submetido a uma centrifugação de 3.600g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado a 8.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e agora centrifugado a 105.000g por 40 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado com 2 mL de um meio contendo: Tris-HCl 30 mmoles L<sup>-1</sup> (pH 7,5), glicerol 150 mL L<sup>-1</sup>, EGTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 2 mmoles L<sup>-1</sup>, DTT 2 mmoles L<sup>-1</sup> e PMSF 1 mmol L<sup>-1</sup>. Em seguida este material foi colocado sobre um gradiente de sacarose de 430 g L<sup>-1</sup>/300 g L<sup>-1</sup>/100 g L<sup>-1</sup> e centrifugado a 105.000g por 2h.

As vesículas de plasmalema e tonoplasto foram separadas por densidade de flutuação e formaram bandas que puderam ser coletadas e diluídas em meio de suspensão na proporção de 2:1 (meio:banda). As frações de plasmalema e tonoplasto agora separadas foram submetidas a uma centrifugação de 105.000g durante 40 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 1 mL de meio de suspensão. As proteínas foram congeladas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas a -25°C para posteriores análises.

#### 3.3.3.1.2. Quantificação de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

#### 3.3.3.1.3. Atividade das P- H<sup>+</sup> -ATPases, V- H<sup>+</sup> -ATPases e H<sup>+</sup> -PPases

A atividade das bombas de prótons, PM-H<sup>+</sup> -ATPases, V-H<sup>+</sup> -ATPases e H<sup>+</sup> -PPases foram determinadas pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise de ATP (P e V- H<sup>+</sup> -ATPase) e PPi (H<sup>+</sup> -PPase). O meio de reação para a P - H<sup>+</sup> -ATPase é composto de MOPS-BTP 30 mmoles L<sup>-1</sup> (pH 6,5), MgSO<sub>4</sub> 5 mmoles L<sup>-1</sup>, KCl 50 mmoles L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup>, 0,2 mL L<sup>-1</sup> de Triton X-100, KNO<sub>3</sub> 50 mmoles L<sup>-1</sup>, NaN<sub>3</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup> e ATP 5 mmoles L<sup>-1</sup>. O meio de reação para as V- H<sup>+</sup> -ATPases é composto de HEPES-BTP 30 mmoles L<sup>-1</sup> (pH 7,5), MgSO<sub>4</sub> 5 mmoles L<sup>-1</sup>, KCl 50 mmoles L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup>, 0,2 mL L<sup>-1</sup> de Triton X-100, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,2 mmoles L<sup>-1</sup>, NaN<sub>3</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup> e ATP 5 mmoles L<sup>-1</sup>. O meio de reação para as H<sup>+</sup> -PPase contém HEPES-BTP 30 mmoles L<sup>-1</sup> (pH 7,2), MgSO<sub>4</sub> 5 mmoles L<sup>-1</sup>, KCl 100 mmoles L<sup>-1</sup>, 0,2 mL L<sup>-1</sup> de Triton X-100, NaN<sub>3</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup> e PPi 1 mmol L<sup>-1</sup>.

A reação foi iniciada para todas as bombas de prótons, pela adição de 4 µg de proteína por mL de meio. Após 30 min a 30°C a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL do meio de reação contendo as proteínas e 1 mL do meio de parada contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mL L<sup>-1</sup>, SDS 50 g L<sup>-1</sup> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 7 g L<sup>-1</sup> previamente em tubos de ensaio submersos em gelo. Em seguida foram adicionados 50 µL de ácido ascórbico 100 g L<sup>-1</sup>. Após 10 minutos 1,45 mL de

um meio contendo 40 g L<sup>-1</sup> de citrato de sódio e 20 g L<sup>-1</sup> de ácido acético glacial foi adicionado a fim de prevenir a medição do fosfato (Pi) liberado pela atividade residual das H<sup>+</sup>-ATPases e hidrólise ácida do ATP. A cor foi totalmente desenvolvida após 30 min e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 820 nm.

### **3.3.3.2. Atividade da Nitrato redutase**

Para a análise da atividade da nitrato redutase (JAWORSKY, 1973) foram separadas amostras de 200 mg de tecido vegetal para inclusão em tubo de ensaio contendo um meio de incubação específico (5 mL). Esse meio foi preparado a partir de mistura de Tampão Fosfato pH 7,5 (909 mL), n-propanol (27,2 mL) e KNO<sub>3</sub> (1,84 g). Os tubos de ensaio contendo as amostras em meio de incubação foram cobertos com papel alumínio e colocados em banho-maria durante 30 minutos a temperatura de 30°C. Após essa etapa, o nitrito produzido foi submetido a reação colorimétrica.

Para a reação colorimétrica, duas alíquotas (0,4 mL) da solução formada pela amostra e pelo meio de incubação foram colocadas em meio reacional composto por sulfanilamida 1% em HCl 3 M (0,3 mL) e N-naftil-etileno di-amino 0,02% (0,3 mL).

Após 20 minutos em repouso, adicionou-se água destilada (4 mL) e as amostras tiveram sua absorvância a 540 nm determinada em espectrofotômetro. Para a determinação da concentração de nitrito produzido foi utilizado como parâmetro a curva padrão de nitrito de sódio. As amostras das soluções que constituem a curva padrão foram submetidas a reação colorimétrica e determinou-se sua absorvância.

### **3.3.3.3. Dosagem de N-amino livre**

Para a determinação de N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL das amostras de extrato alcoólico visando a reação colorimétrica em meio reacional específico. O meio reacional foi preparado a partir de tampão citrato (1 mL) e uma mistura de Metil Celossolve, KCN e Ninhidrina (Hidrato de triceto-hidrindeno) (1,2 mL). Para o preparo da mistura, foi inicialmente preparada uma solução de Ninhidrina em Metil Celossolve (5 % P/V). Em seguida, uma solução de KCN em Metil Celossolve foi preparada a partir de KCN 0,01 M (5 mL) dissolvido em Metil Celossolve até completar 250 mL. Finalmente, a solução contendo a Ninhidrina foi misturada à solução contendo o KCN na proporção 1:5 (v/v).

Para a reação colorimétrica, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo o meio reacional e submetidas a agitação. Posteriormente, os tubos de ensaio foram fechados com papel alumínio e submetidos a aquecimento em banho-maria a 100 °C por 15 minutos. Após o aquecimento, os tubos de ensaio contendo as amostras em meio reacional foram resfriados em água corrente por 5 minutos e adicionou-se etanol 60% (3 mL) ao seu conteúdo. Após nova agitação, a absorvância a 570 nanômetros foi determinada em espectrofotômetro.

Para a determinação da concentração de N-amino nas amostras foi utilizado como parâmetro a curva padrão de Leucina. As amostras das soluções que constituem a curva padrão foram submetidas a reação colorimétrica e determinou-se sua absorvância, conforme o descrito anteriormente.

### **3.3.3.4. Dosagem de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**

Para a dosagem de N-amônio (FELKER, 1977), alíquotas de 0,5 mL das amostras de extrato alcoólico foram submetidas a reação colorimétrica em meio reacional específico. Para o meio reacional, foi preparada previamente uma solução contendo Fenol (5 g) e Nitroprussiato de Sódio (25 mg) diluída até o volume de 500 mL em água destilada. Além disso, preparou-se uma solução contendo Dicloroisocianurato de Sódio (0,31 g) e Hidróxido

de Sódio (15 g) também elevados até 500 mL com água destilada. De cada solução preparada foram utilizados 2,5 mL para o meio reacional.

Para a reação colorimétrica, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo o meio reacional e agitadas. Após 30 minutos em temperatura ambiente, realizou-se uma nova agitação e foi determinada a absorvância a 630 nanômetros.

Para a determinação da concentração de N-amônio nas amostras foi utilizada como parâmetro a curva padrão de cloreto de amônio. As amostras das soluções que constituem a curva padrão foram submetidas à reação colorimétrica e determinou-se sua absorvância.

### **3.3.3.5. Dosagem de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**

Na determinação dos teores de N-nitrato (CATALDO et al., 1975) foram utilizadas alíquotas de 0,05mL do extrato alcoólico em meio reacional específico visando a determinação colorimétrica. Para o meio reacional utilizou-se Hidróxido de Sódio 2M (4,75 mL) e uma solução de ácido salicílico 5% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (0,2 mL).

Para a reação colorimétrica, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio e, posteriormente, foi adicionado vagorosamente o ácido salicílico 5% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Após a agitação, as amostras foram deixadas 20 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se o Hidróxido de Sódio 2 mol L<sup>-1</sup>. Após realizar uma nova agitação, a absorvância a 410 nanômetros foi determinada em espectrofotômetro.

Para a determinação da concentração de N-nitrato nas amostras foi utilizado como parâmetro a curva padrão de nitrato de potássio. As amostras das soluções que constituem a curva padrão foram avaliadas colorimetricamente e determinou-se sua absorvância.

### **3.3.3.6. Dosagem de açúcares solúveis**

Para a determinação de açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1954) foram utilizadas alíquotas de 0,2 mL das amostras de extrato alcoólico para a reação colorimétrica em meio reacional específico. O meio reacional foi preparado com Antrona (0,4 g) diluída em uma mistura de ácido sulfúrico e água destilada (5:2). Após o preparo, a mistura foi deixada em repouso por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, utilizada para o meio reacional.

Para a reação colorimétrica, a solução de Antrona em ácido sulfúrico e água (5 mL) foi depositada em tubos de ensaio de 50 mL em banho de gelo. Após 5 minutos, foi adicionada lentamente a amostra e, posteriormente, etanol 80% (0,8 mL). A mistura foi deixada em repouso por mais 5 minutos em banho de gelo e, em seguida, agitada. Para o desenvolvimento da cor verde, os tubos foram devidamente vedados com papel alumínio e levados ao banho-maria a temperatura de 100 °C por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram esfriados e de seu conteúdo foi determinada a absorvância a 620 nm que, posteriormente, foi comparada ao padrão de glicose.

### **3.3.3.7. Atividade da Glutamina Sintetase (GS)**

A determinação da atividade da Glutamina Sintetase foi realizada segundo FARDEN e ROBERTSON (1980), modificada por SOUZA et al. (2007), a partir de 1 g de tecido vegetal fresco, que foi macerado com N<sub>2</sub> líquido. Em seguida adicionou-se 4 ml de tampão de extração (TRIS ou Imidazol). O material foi filtrado em quatro camadas de gaze, sendo o filtrado centrifugado por 15 minutos a 4 °C e 15.000 g. O sobrenadante foi recolhido e usado para determinação da atividade da GS (0,30 mL de amostra foi incubada em 0,50 mL de tampão Imidazol -HCl (0,5 mol L<sup>-1</sup>) pH 7,5; 0,10 mL de ATP (0,1 mol L<sup>-1</sup>), 0,1 mL de glutamato (0,5 mol L<sup>-1</sup>) pH 7,5; 1,0 mL de água destilada. Após 30 minutos em banho-maria à 30°C, a reação foi paralisada com a adição de 1,5 mL de solução de cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,2 mol L<sup>-1</sup> em HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>). As amostras foram centrifugadas a 2000 g por

5 minutos a 30°C (para retirar proteínas precipitadas) e a leitura do sobrenadante foi feita em absorvância a 540 nm e comparadas com padrão de  $\gamma$ -glutamil mono-hidroxamato.

### **3.3.3.8. Atividade da Catalase**

A determinação da atividade da catalase foi obtida por meio da homogeneização de 500 mg de raízes transformadas, fragmentadas em almofariz, em N<sub>2</sub>. Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução de extração, constituída de EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, contendo 20 mg de PVPP (polivinil-poli-pirrolidona), procedendo-se uma nova homogeneização. O homogeneizado foi então centrifugado por 15 minutos, a 12.000 g e o sobrenadante utilizado nas avaliações enzimáticas e nas dosagens de proteína. Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4°C. A atividade da catalase foi determinada pela adição de 100  $\mu$ L do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de meio de reação, constituído de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30°C (HAVIR & MCHALE, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, no intervalo de 2 minutos após o início da reação (AZEVEDO et al., 1998), que posteriormente foi comparada ao padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **3.3.3.9. Histolocalização radicular de NO e ROS**

Para a visualização de NO e ROS *in vivo* foi realizado um experimento semelhante ao previamente mencionado (Experimento 3), no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF. Para a montagem do experimento foram seccionados quatro segmentos de ápices radiculares e colocados para crescer em placas de cultura de 12 poços (4 segmentos/poço), contendo os diferentes tratamentos em cada poço. Após cinco dias de incubação do experimento foi coletado material e preparado para a histolocalização de NO e ROS.

#### **3.3.3.9.1. Histolocalização radicular do NO**

Amostras de raízes transformadas de manjeriço foram tratadas com 10 $\mu$ M da sonda fluorescente 4,5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-FM-DA; Calbiochem), um marcador para NO permeável a membrana plasmática, e tampão HEPES-KOH, conforme descrito por Laxalt et al. (2007). As amostras permaneceram incubadas por 2 horas a 25°C, sob agitação no escuro. Os controles negativos foram feitos incubando-se as raízes transformadas a 25°C, sob agitação no escuro, com o sequestrador de NO, cPTIO (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido) (Sigma-Aldrich), e sem a sonda de marcação. Em seguida, as raízes foram lavadas três vezes com o respectivo meio de incubação, e foram montadas lâminas para a visualização no microscópio. As amostras de ápice radicular foram visualizadas utilizando-se o microscópio de fluorescência Axioplan – Zeiss (Carls Zeiss, Jena, Germany), adaptado com câmera digital AxioCam MRc5). Utilizou-se filtros com comprimento de onda de excitação a 495 nm e emissão a 515 nm para o indicador DAF-FM-DA. As imagens foram adquiridas através de um sistema computadorizado de captura e análise de imagens equipado com o software AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany) e processadas utilizando-se o mesmo software. A intensidade de fluorescência dos ápices radiculares individuais foi determinado usando o software AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany) em número de pixels por área.

#### **3.3.3.9.2. Histolocalização radicular das ROS**

Amostras de raízes transformadas de manjeriço foram tratadas com 15 $\mu$ M da sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA; Calbiochem), um marcador de ROS permeável a membrana plasmática (LAXALT et al., 2007), em DMSO. A concentração final de DMSO foi de 0,1% (v/v), de acordo com o protocolo de Shin &

Schachtman (2004). As amostras permaneceram incubadas nos respectivos tratamentos por 2 horas a 25°C, sob agitação no escuro. Os controles negativos foram feitos incubando-se as raízes transformadas a 25°C, sob agitação no escuro, com o sequestrador de NO, cPTIO (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido-3-óxido) (Sigma-Aldrich), e sem a sonda de marcação. Após o período de incubação, as raízes foram lavadas três vezes com o meio de cultura preparado para incubação, e em seguida, foram montadas lâminas para a visualização no microscópio. As amostras foram visualizadas utilizando-se o microscópio de fluorescência Axioplan – Zeiss (Carls Zeiss, Jena, Germany), adaptado com câmera digital AxioCam MRc5. Foi usado os filtros com comprimento de onda de excitação a 495 nm e emissão a 515 nm para o indicador H<sub>2</sub>DCFDA. As imagens foram adquiridas através de um sistema computadorizado de captura e análise de imagens equipado com o software AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany) e processadas utilizando-se o mesmo software. A intensidade de fluorescência dos ápices radiculares foi determinado usando o software AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany) em número de pixels por área.

#### **3.3.3.10. Mensuração do crescimento radicular**

As medidas do crescimento radicular das raízes transformadas foram feitas na montagem do experimento, aos cinco e 15 dias após o tratamento das raízes transformadas de manjeriço, pela captura de imagens das placas de Petri de acordo com o descrito em Experimento 2 e posteriormente as imagens foram processadas utilizando o software “Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo” 3.0 (SIARCS<sup>®</sup> 3.0) (JORGE & CRESTANA, 1996), para a avaliação do comprimento radicular, seguindo o protocolo de editoração de imagens proposta por Lima et. al. (2006).

**3.4 Experimento 4:** Efeitos do ácido húmico e do óxido nítrico associados a duas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sobre a atividade das enzimas nitrato redutase, bombas de prótons, catalase e a histolocalização radicular de NO e ROS em raízes transformadas de manjeriço em experimento de curta duração

#### **3.4.1. Material vegetal e condições de crescimento e tratamentos**

As condições experimentais deste experimento foram as mesmas realizadas para o Experimento 3.

As raízes foram multiplicadas *in vitro*, utilizando-se erlenmeyer contendo Meio Mínimo (MM) (BÉCARD & FORTIN, 1988), modificado para ½ Força Iônica, num período de 35 dias após a repicagem (DAR), utilizando dois segmentos de três centímetros de ápice radicular. Aos 35 DAR, a solução foi trocada e as raízes transformadas foram colocadas no Meio Mínimo modificado sem N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> durante 72 horas, visando a redução do teor de nitrogênio no interior das células. Após as 24 horas sem N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, as raízes crescidas foram transferidas para erlenmeyer contendo Meio Mínimo modificado para ½ Força Iônica com baixo e alto suprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, com seus respectivos tratamentos.

As coletas das raízes transformadas para a avaliação da atividade da nitrato redutase foram feitas nas 0; 3; 6; 9; 12 e 24 horas após a aplicação dos tratamentos, e com os dados obtidos para esta determinação, foram feitas as outras determinações (às 6 horas, devido ao fato de deste tempo apresentar maiores valores para a atividade da nitrato redutase) (Atividade das bombas de prótons; Atividade da Catalase e Histolocalização radicular de NO e ROS), conforme descrito no Experimento 3.

### **3.4.2. Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, com quatro repetições (sendo cada repetição composta por quatro erlenmeyers). O esquema fatorial foi o 3 X 2 (Controle, ácido húmico-Organossolo Háplico (AH) e NO); (suprimento baixo (0,5mM) e alto (5,0mM) de  $\text{N-NO}_3^-$ ). Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico, como descrito no Experimento 2.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento 1: Extração e caracterização da matéria orgânica humificada dos solos

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da análise de solo. Os valores de pH,  $\text{Al}^{+3}$  e nutrientes apresentam-se bastante diferenciadas, o que torna cada tipo de solo com características distintas. É possível observar maiores valores de carbono no Organossolo e menores no Latossolo. Estes resultados conferem as características edafoclimáticas que estes solos apresentam. O teor de carbono dos diferentes solos indicou a quantidade de material a ser utilizada para a extração e purificação do material, sendo possível utilizar menores valores de massa de solo para o Organossolo e Chernossolo. Já o Latossolo demandou mais tempo e maiores quantidades de massa de solo para a extração e purificação de ácido húmico.

**Tabela 1.** Análise química dos três solos estudados.

	pH	$\text{Al}^{+3}$	Ca	Mg	Na	K	$\text{H}^+\text{Al}$	P	C	N
0-20 cm	----- $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ -----							$\text{mg kg}^{-1}$	-- $\text{g kg}^{-1}$ --	
Chernossolo	6,05	0,0	2,75	1,75	0,04	0,24	2,30	7	44,7	1,72
Latossolo	5,55	0,1	2,00	1,60	0,18	0,29	3,50	2	13,0	1,40
Organossolo	4,85	1,7	2,30	2,10	0,03	0,39	8,45	3	104,6	1,88

O fracionamento químico da matéria orgânica das três amostras dos solos estudados pode ser visto na Tabela 2.

Cada amostra de solo estudado apresentou teores de carbono das frações da matéria orgânica do solo bem diferenciados, sendo possível observar que os solos com maiores teores de carbono na análise de solo de rotina obtiveram maiores valores das frações húmicas da matéria orgânica, sendo os resultados de ácido húmico de Organossolo bem maiores do que os demais solos estudados.

**Tabela 2.** Teores de carbono das frações da matéria orgânica (Ácido Fúlvico, Ácido Húmico e Humina) de amostras de solos estudados.

Solos	Ácido Fúlvico	Ácido Húmico	Humina
	$\text{g.kg}^{-1}$ de solo		
Chernossolo	5,62	16,96	22,12
Latossolo	1,21	2,32	9,48
Organossolo	11,45	42,2	50,95

Na Tabela 3 são apresentados: a composição elementar, as relações atômicas, relação  $E_4/E_6$  os valores de acidez total, carboxílica e fenólica dos ácidos fúlvicos e ácidos húmicos. Os valores encontrados para os resultados da Tabela 3 estão de acordo com os limites normais encontrados na literatura (CANELLAS & SANTOS, 2006).

A composição elementar é a propriedade mais estável e fundamental das substâncias húmicas (RICE & MACCARTHY, 1991), através da análise da composição elementar conseguiram discriminar ácidos fúlvicos, húmicos e huminas e suas diversas origens (solo,

água, turfa e ambiente marinho), revelando uma estreita relação entre o processo de formação das substâncias húmicas e a distribuição relativa dos átomos que as compõem.

Como observado na Tabela 3 a relação C:N dos ácidos húmicos foi menor em comparação com a dos ácidos fúlvicos, mostrando que o aumento do conteúdo de N com a redução da relação C:N se devem ao processo de evolução da humificação pelos ácidos húmicos, caracterizado por transformações químicas mais intensas (KUMADA, 1987). Segundo Flaig (1971), o acúmulo de N aumenta o processo de humificação, uma vez que, para formação dos precursores das substâncias húmicas (insolubilização do fenol e condensação de quinonas), são necessárias reações mediadas por compostos nitrogenados.

**Tabela 3.** Valores de composição elementar, as suas relações atômicas, acidez total, carboxílica, fenólica e da relação E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> dos ácidos fúlvicos e húmicos das amostras de terra provenientes dos solos estudados.

	Chernossolo	Latossolo	Organossolo
Ácido Fúlvico			
g kg <sup>-1</sup>			
C	115	109	120
H	25,2	26,9	23,5
N	3,6	3,4	3,2
O	855,9	860,5	852,9
C:N	37,4	37,5	43,9
H:C	2,62	2,95	2,34
O:C	5,57	5,91	5,31
E4/E6	5,45	5,10	6,12
mmol H <sup>+</sup> g <sup>-1</sup>			
Acidez total	891,5	837,2	945,7
Acidez Carboxílica	250,1	242,5	217,3
Acidez Fenólica	641,4	594,7	428,4
Ácido Húmico			
g kg <sup>-1</sup>			
C	479	503	551
H	51	51,2	35,0
N	43,0	42,0	44,9
O	427	404	389
C:N	13,0	14,0	12,5
H:C	1,27	1,22	0,76
O:C	0,67	0,60	0,53
E4/E6	3,12	4,81	2,16
mmol H <sup>+</sup> g <sup>-1</sup>			
Acidez total	613	553	812
Acidez Carboxílica	493	342	635
Acidez Fenólica	120	211	177

As relações atômicas H:C das substâncias húmicas é considerada como uma medida indireta das características estruturais das frações húmicas que, quanto menor o valor da relação, mais acentuado é o caráter aromático do carbono, sendo estes valores menores nos ácidos húmicos (RICE & MACCARTHY, 1991).

A relação O:C é um indicativo do grau de humificação das frações húmicas, onde valores menores que um (caso dos ácidos húmicos) indicam a fração mais humificada (RICE

& MACCARTHY). Estes resultados conferem ao ácido húmico uma maior estabilidade em relação ao ácido fúlvico dos diferentes solos.

A diminuição na relação  $E_4/E_6$  dos ácidos húmicos em relação aos ácidos fúlvicos sugere uma maior estabilidade desta fração humificada em relação à outra (Tabela 3). De modo geral, tanto os ácidos fúlvicos como os ácidos húmicos apresentaram valores elevados de acidez total, carboxílica e fenólica.

O ácido fúlvico é a fração humificada mais reativa, apresentando maior grau de oxidação dos seus compostos e maior acidez total, porém, com menor estabilidade, favorecendo a formação de complexos mais solúveis e de menor peso molecular, interferindo de forma mais intensiva no meio, podendo facilitar o fenômeno de lixiviação de cátions e iluviação de argila (CANELLAS, 1999).

A importância dos ácidos húmicos, principalmente nas camadas superficiais dos solos, onde sua concentração é maior, se deve ao fato de participar da maioria das reações que ocorrem no solo, tais como: agregação e estabilidade dos agregados pela formação de complexos organo-minerais; solubilização de fosfato e diminuição da energia de fixação dos óxidos; adsorção de metais pesados; tampão do solo e diminuição do PCZ (ponto de carga zero), além de servir como reserva de nutrientes às plantas e microorganismos (FONTANA, 2006).

Os resultados de acidez carboxílica indicam que a fração ácido húmico apresenta maiores valores de carboxilas em relação ao ácido fúlvico, onde esse grupamento funcional promove a maior parte da acidez nessas frações. Já para o ácido fúlvico, a acidez fenólica é a maior responsável pela acidez dessa fração (Tabela 3).

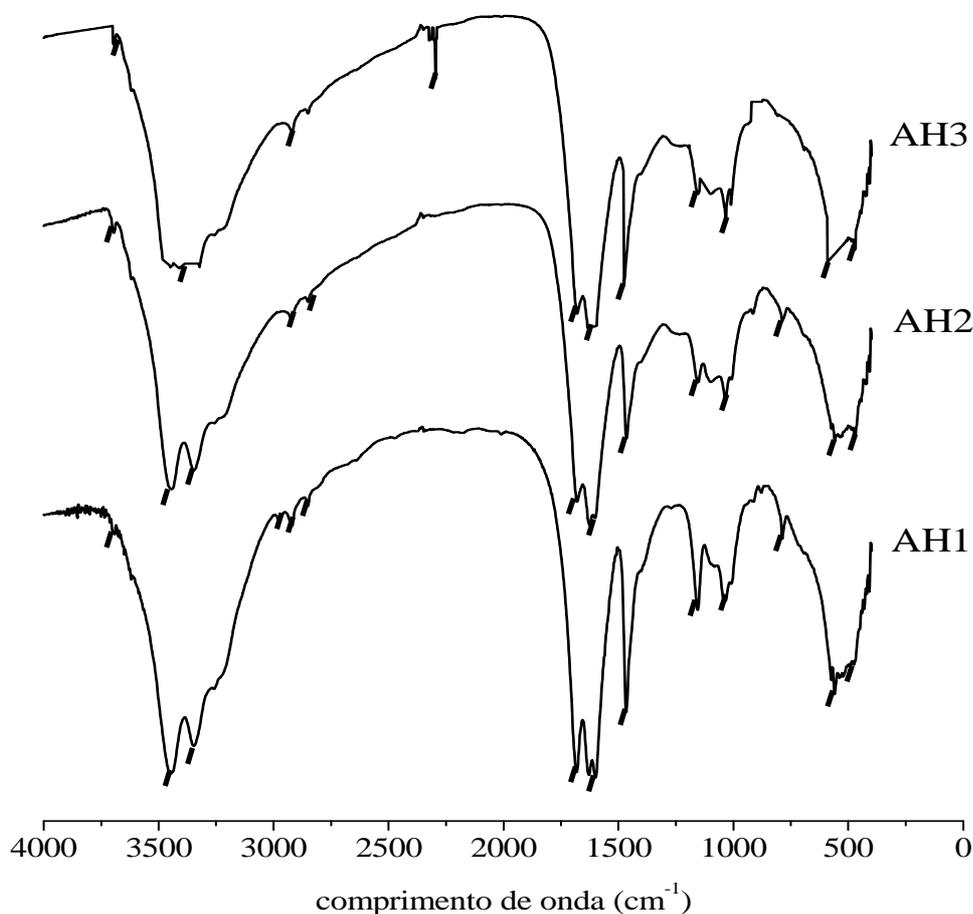
Os espectros de Infravermelho com Transformadas de Fourier dos ácidos húmicos estudados são apresentados na Figura 13. Estes espectros fornecem informações sobre a presença dos grupos funcionais presentes na matéria orgânica dos solos, bem como sobre a natureza de suas ligações químicas e sua reatividade (STEVENSON, 1994).

É possível observar uma grande semelhança entre as bandas presentes nos espectros de IV-TR dos ácidos húmicos isolados de diferentes solos. As bandas de absorção intensas na região de  $3460\text{ cm}^{-1}$  e em  $3400\text{ cm}^{-1}$  nos ácidos húmicos AH1 e AH2 ocorreram, e são características da presença de grupos OH e estiramentos N-H. Para os três ácidos húmicos estudados foram encontrados estiramentos simétricos e assimétricos de grupos C-H alifáticos em  $2980$  e  $2940\text{ cm}^{-1}$  (Figura 113).

A banda de absorção em  $1720\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a estiramento C=O em grupos carbonila com possíveis atribuições de C=O de ésteres. As bandas em  $1646\text{ cm}^{-1}$  e em  $1510\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a vibrações axiais de grupos C=C de alquenos e vibrações do anel aromático (C=C), mas também atribuídas ao estiramento carbonila de amidas secundárias, presentes em proteínas e polipeptídeos, a  $1650\text{ cm}^{-1}$  (Figura 13). As amidas secundárias também podem exibir outra banda característica em  $1510\text{ cm}^{-1}$  confirmado pelo modo de deformação N-H (ZANDONADI, 2006).

As bandas de grupos carboxílicos ionizados foram observadas entre  $1610\text{ cm}^{-1}$  e em  $1390\text{ cm}^{-1}$ , e correspondem a vibrações simétricas e assimétricas de estruturas COO. A banda observada em  $1224$  pode ser atribuídas a estiramentos C-O de ésteres saturados associados a polissacarídeos. A banda em  $1120\text{ cm}^{-1}$  pode estar associada a estiramentos de grupos C-O integrados à estrutura de alcoóis secundários e a banda em  $1030\text{ cm}^{-1}$  associada a estiramentos C-O em alcoóis primários (Figura 13).

A banda de absorção em  $814\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a deformações angulares de C-H em anéis aromáticos. As bandas de absorção observadas na faixa inferior a  $650\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a possíveis impurezas de carbonatos inorgânicos associados a metais (Figura 13).



**Figura 13. Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) dos ácidos húmicos estudados (AH1- Ácido Húmico de Chernossolo Háplico; AH2 - Ácido Húmico de Latossolo Vermelho-Amarelo; AH3 - Ácido Húmico de Organossolo Háplico).**

GARCÉS (1987); COULTHUP e colaboradores (1964) atribuíram a região do espectro de absorção entre 1492 e 900  $\text{cm}^{-1}$  como a região de impressão digital de uma substância, ou seja, compostos similares apresentam absorções idênticas nessa região e, por outro lado, compostos distintos apresentam absorções distintas. Alguns trabalhos afirmam que ácidos húmicos de diferentes tipos de solos promovem espectros de absorção no IV-TR diferentes (FONTANA; 2006; LIMA, 2006; ZANDONADI, 2006). Porém, não foi observado este padrão de comportamento no presente estudo. A semelhança dos espectros dos ácidos húmicos estudados pode ser atribuída ao tipo de cobertura vegetal e o manejo adotado nos diferentes solos. Nestes solos havia o cultivo da gramínea braquiária (*Brachiaria decumbens* L.), cultivadas a pelo menos três anos e o manejo de gado no sistema de piquetes. Esses resultados podem estar influenciando o perfil dos espectros de IV-TF.

A técnica de IV-TF é bastante utilizada para a análise qualitativa, mas nos últimos anos também tem sido aplicada à análise semi-quantitativa de grupamentos funcionais, principalmente os oxigenados. A partir da relação obtida pela integração da área de banda

correspondente aos grupamentos alifáticos (C-H) pelos grupamentos polares (C-O). Dessa forma é possível determinar o índice de hidrofobicidade (IH) e o índice de condensação (IC) de ácidos húmicos (FREIXO, 2000). Os solos estudados apresentaram os índices de hidrofobicidade de 1,3; 1,5 e 1,8 respectivamente para AH1, AH2 e AH3. Estes resultados denotam que os ácidos húmicos estudados apresentam ser um material bastante resistente à degradação oxidativa, isto porque os grupamentos alifáticos são mais hidrofóbicos e menos suscetíveis a oxidação, quando comparados com os polissacarídeos. Assim, quanto maior esta relação maior será a resistência do ácido húmico à degradação microbiana (LIMA, 2006).

A relação entre grupamentos aromáticos e alifáticos fornece outro importante índice para a avaliação dos ácidos húmicos: o índice de condensação (IC). Os grupamentos aromáticos caracterizam moléculas mais condensadas enquanto os alifáticos se referem às moléculas com cadeias saturadas. Quanto maior o valor obtido do IC, maior o grau de humificação e estabilidade dos compostos presentes nos ácidos húmicos obtidos dos solos estudados. Como observado na Figura 13 estes ácidos húmicos apresentaram as seguintes relações: 2,28 (AH1); 2,35 (AH2) e 2,32 (AH3), demonstrando os ácidos húmicos serem um material bem humificado, e representando boa estabilidade dos compostos presentes. Esses resultados reforçam a análise de composição elementar e de espectroscopia na região do UV-visível, confirmando a estabilidade dessa fração da matéria orgânica do solo.

#### **4.2 Experimento 2:** Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e de óxido nítrico no crescimento de raízes transformadas de manjeriçã

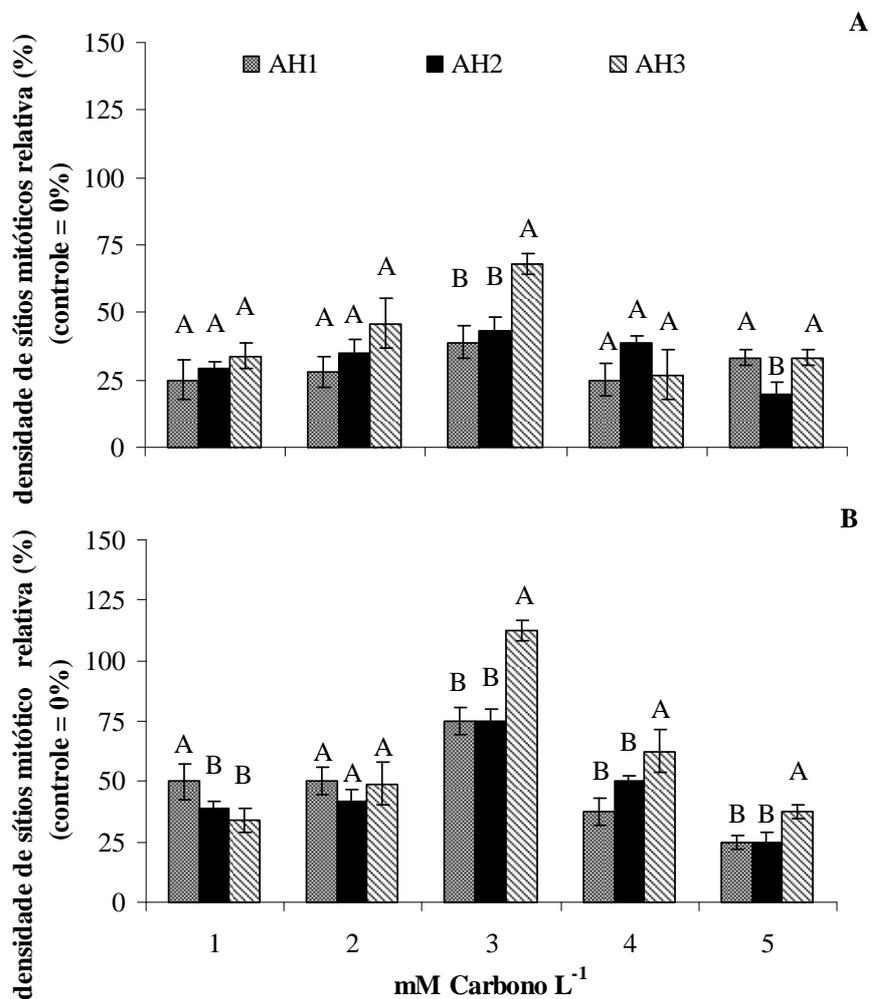
A Figura 14 apresenta a comparação dos valores de sítio mitótico das doses testadas entre os diferentes ácidos húmicos, aos 5 e 15 dias de tratamento. A Figura 14A apresenta apenas diferença significativa na dose de 3mM de Carbono L<sup>-1</sup>, sendo o tratamento AH3 superior aos demais. Na Figura 14B houve diferença nas doses de 1 e 3mM de Carbono L<sup>-1</sup>, sendo que na dose mais baixa de carbono, o tratamento AH1 foi superior aos demais e na dose de 3mM de Carbono L<sup>-1</sup> o tratamento AH3 apresentou maiores valores para este parâmetro.

Na Figura 15 observa-se a comparação dos valores de sítio mitótico e Correlação de Pearson, entre as doses testadas em cada tratamento (diferentes ácidos húmicos ou óxido nítrico), aos 5 e 15 dias.

As doses de todos os ácidos húmicos estudados aos 5 dias são superiores ao Controle, demonstrando o efeito promotor dos ácidos húmicos na produção de sítios mitóticos. Apesar de apresentarem diferenças entre o Controle, os ácidos húmicos não apresentaram diferenças entre as doses testadas, com exceção da dose de 3mM de Carbono L<sup>-1</sup> para o AH3 tendo maiores valores para este parâmetro. Para o NO, as doses crescentes de SNP foram superiores ao Controle, com exceção da dose mais alta, que promoveu a redução de sítios mitóticos.

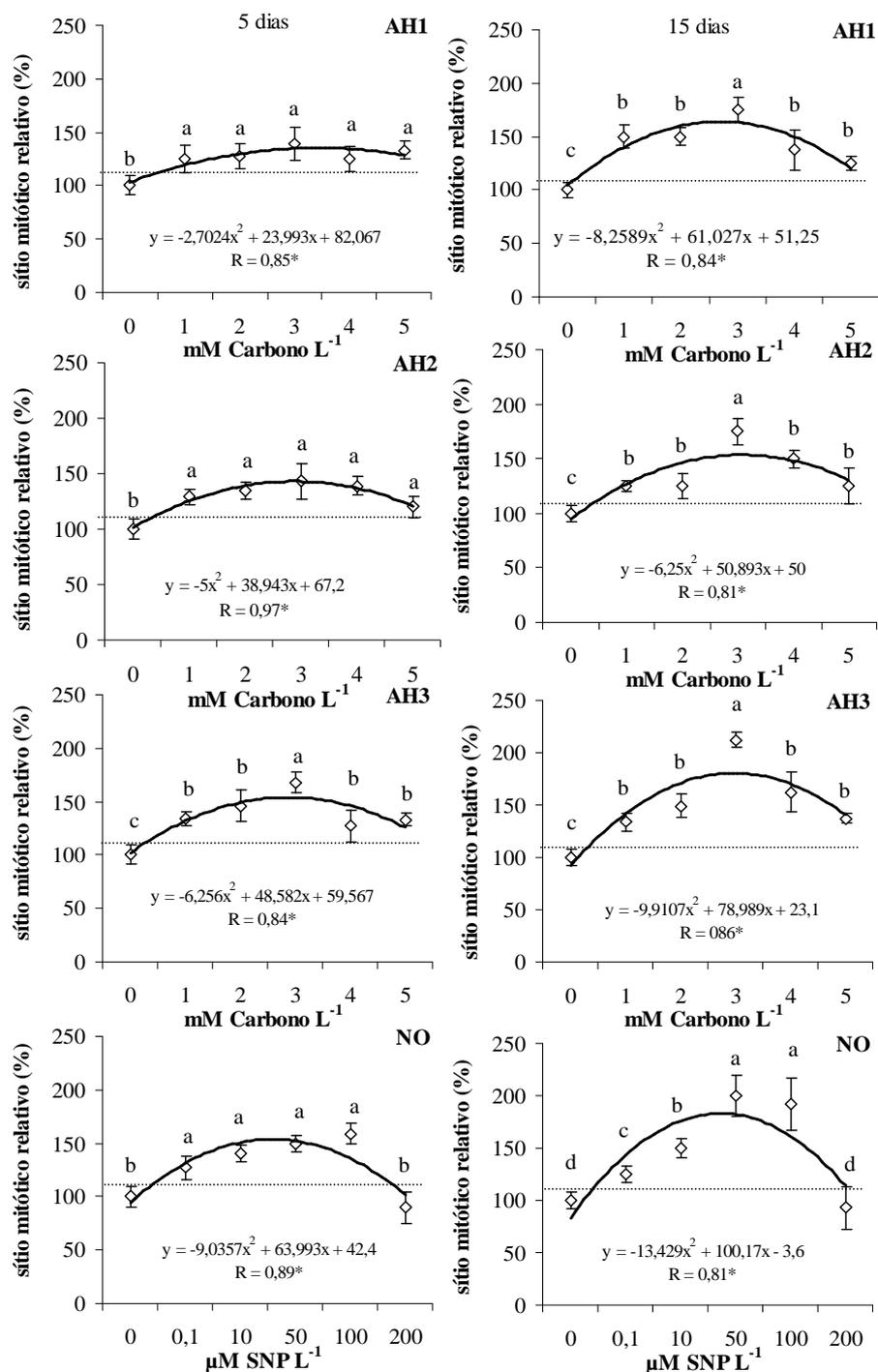
Comportamento semelhante aos 5 dias foram obtidos aos 15 dias após a adoção dos tratamentos, onde as doses de todos os ácidos húmicos estudados são superiores ao Controle, sendo a dose de 3mM de Carbono L<sup>-1</sup> superior as demais doses testadas. O NO também apresentou comportamento semelhante na coleta de 5 dias as doses crescentes de SNP foram superiores ao Controle, com exceção da dose mais alta, que promoveu a redução de sítios

mitóticos. Os valores de correlação quadrática são apresentados na Figura 15. Todos os tratamentos apresentaram alta correlação entre as doses testadas, para os sítios mitóticos.



**Figura 14. Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos sobre a densidade de sítios mitóticos de raízes transformadas de manjeriço.** Valores Relativos de Sítios Mitóticos de Raízes Transformadas de Manjeriço aos 5 dias (A) e aos 15 dias (B), nas doses 1; 2; 3; 4; 5 mM Carbono L<sup>-1</sup> de ácido húmico, submetidas aos tratamentos AH1-Ácido Húmico de Chernossolo Háplico; AH2-Ácido Húmico de Latossolo Vermelho-Amarelo; AH3-Ácido Húmico de Organossolo Háplico.

Letras iguais dentro de cada dose não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ). Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).



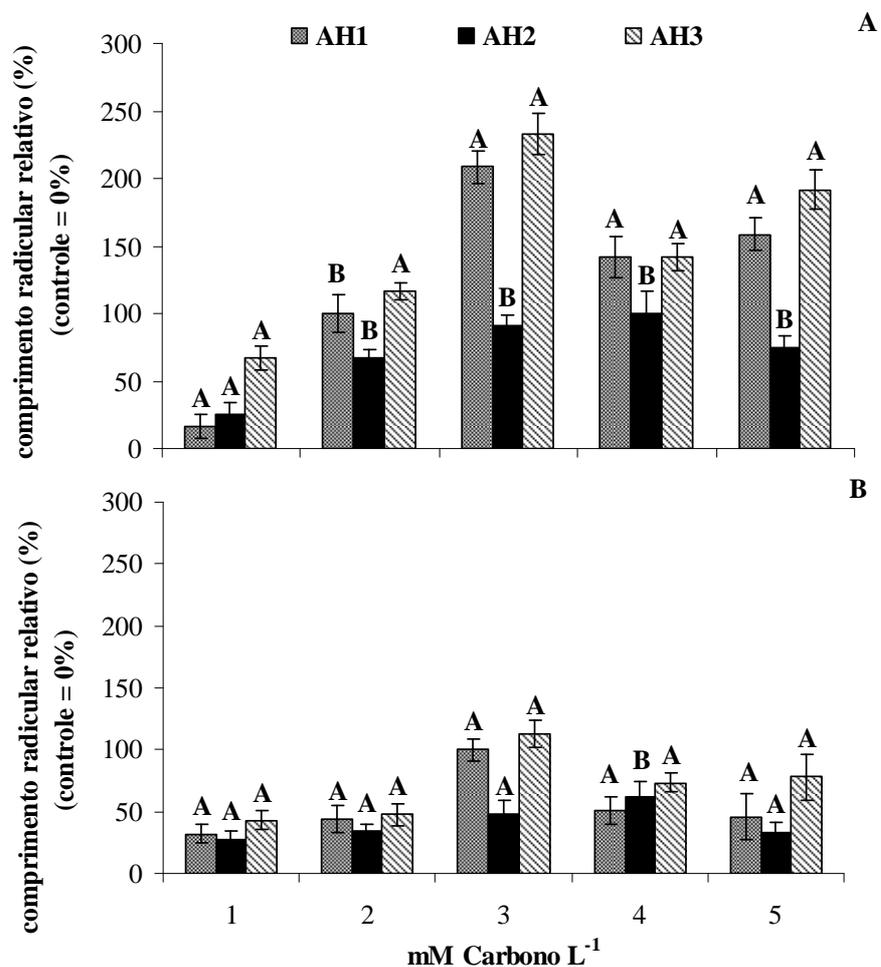
**Figura 15. Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e óxido nítrico sobre a densidade de sítios mitóticos de raízes transformadas de manjeriço.** Valores Relativos de Sítios Mitóticos de Raízes Transformadas de Manjeriço e Correlação de Pearson, aos 5 e 15 dias, nas doses de ácido húmico 0; 1; 2; 3; 4; 5 mM Carbono L<sup>-1</sup> ou nas doses de óxido nítrico 0; 0,1; 10; 50; 100; 200 µM SNP L<sup>-1</sup>, submetidas aos tratamentos Controle (sem ácido húmico ou óxido nítrico); Ácido Húmico de Chernossolo Háplico (AH1); Ácido Húmico de Latossolo Vermelho-Amarelo (AH2); Ácido Húmico de Organossolo Háplico (AH3); SNP-nitroprussiato de sódio como doador de óxido nítrico (NO).

Linha horizontal pontilhada limita o valor máximo do controle. Letras iguais entre as doses não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ). Barras verticais indicam erro padrão. ( $n = 4$ ). Valores significativos de Correlação de Pearson ( $p \leq 0,05$ ).

A Figura 16 apresenta a comparação dos valores de comprimento radicular nas doses testadas entre os diferentes ácidos húmicos, aos 5 e 15 dias de tratamento. A Figura 16A (5 dias) apresenta diferença significativa entre os ácidos húmicos testados em cada dose, sendo que o tratamento AH3 destacou-se dos demais. Na Figura 16B (15 dias) houve diferença nas doses de 3 e 5mM de Carbono L<sup>-1</sup>, sendo encontrado menor crescimento no tratamento AH2 para a dose de 3mM de Carbono L<sup>-1</sup> e maior crescimento de raiz no ácido húmico AH3 na dose de 5mM de Carbono L<sup>-1</sup>.

Na Figura 17 verificam-se os valores de comprimento radicular de acordo com as doses crescentes de ácido húmico e óxido nítrico. A aplicação de ácido húmico de diferentes classes de solos proporcionou aumentos significativos no comprimento radicular de raízes transformadas de manjeriço, em relação ao controle. A dose de 3mM de Carbono para todos os ácidos húmicos apresentou maiores valores de crescimento radicular, nas duas épocas coletadas. Foram observadas correlações quadráticas para as doses crescentes testadas. Este fenômeno pode ter acontecido devido ao fato de que em ácidos húmicos são encontradas moléculas com atividade auxínica. Com aumentos crescentes de ácido húmico são aumentados os níveis das moléculas com atividade auxínica. É conhecido que este fitormônio, dependendo da dose, pode estimular o crescimento de raízes. Porém com o aumento dos níveis deste hormônio, este pode atuar como herbicida, causando sérios danos às plantas. Por isso, doses mais elevadas de ácido húmico podem causar uma redução no crescimento das raízes transformadas de manjeriço, demonstrando que a bioatividade desta substância pode ser devido a moléculas existentes de auxina no interior hidrofóbico dos ácidos húmicos.

Com a aplicação de óxido nítrico (Figura 17), observa-se comportamento semelhante aos encontrados para os ácidos húmicos testados, ou seja, níveis crescentes de NO aumentaram o crescimento radicular, sendo as doses que promoveram maiores aumentos foram as doses de 50 e 100µM de SNP. Com a dose maior (200µM de SNP) houve um comportamento típico de toxicidez, evidenciando um comportamento tipicamente hormonal.

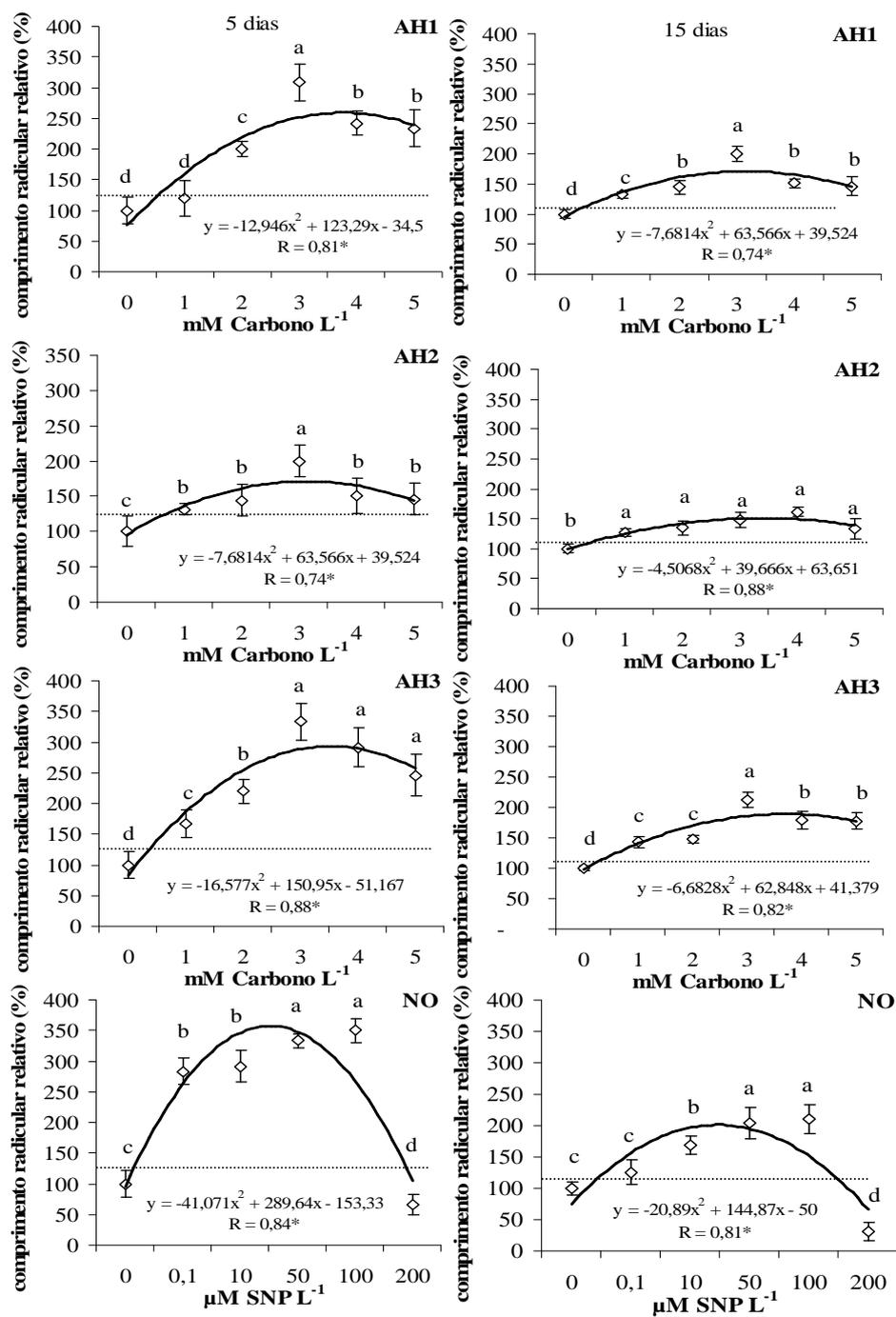


**Figura 16. Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos sobre o comprimento radicular de raízes transformadas de manjeriço.** Valores Relativos de comprimento radicular de Raízes Transformadas de Manjeriço aos 5 dias (A) e aos 15 dias (B), nas doses 1; 2; 3; 4; 5 mM Carbono L<sup>-1</sup> de ácido húmico, submetidas aos tratamentos AH1-Ácido Húmico de Chernossolo Háplico; AH2-Ácido Húmico de Latossolo Vermelho-Amarelo; AH3-Ácido Húmico de Organossolo Háplico.

Linha horizontal pontilhada limita o valor máximo do controle.

Letras iguais dentro de cada dose não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

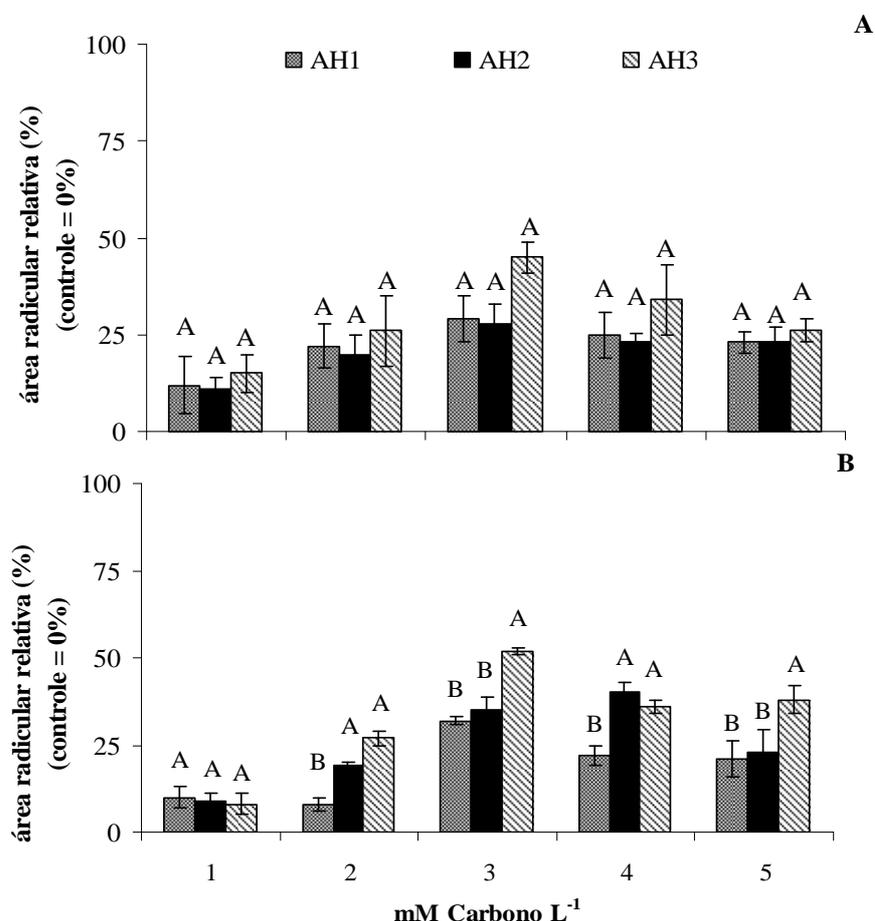
Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).



**Figura 17. Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e óxido nítrico sobre o comprimento radicular de raízes transformadas de manjericão.** Valores Relativos de comprimento radicular de Raízes Transformadas de Manjericão aos 5 e 15 dias, nas doses de ácido húmico 0; 1; 2; 3; 4; 5 mM Carbono L<sup>-1</sup> ou nas doses de óxido nítrico 0; 0,1; 10; 50; 100; 200  $\mu\text{M SNP L}^{-1}$ , submetidas aos tratamentos Controle (sem ácido húmico ou óxido nítrico); Ácido Húmico de Chernossolo Háplico (AH1); Ácido Húmico de Latossolo Vermelho-Amarelo (AH2); Ácido Húmico de Organossolo Háplico (AH3); SNP-nitroprussiato de sódio como doador de óxido nítrico (NO).

Linha vertical pontilhada limita o valor máximo do controle. Letras iguais entre as doses não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ). Barras verticais indicam erro padrão. ( $n = 4$ ). \* Valores significativos de Correlação de Pearson ( $p \leq 0,05$ ).

Observando o crescimento da área radicular aos 5 dias após o tratamento com os ácidos húmicos (Figura 18), verifica-se o crescente aumento de área radicular de acordo com as doses de ácido húmico, mas sem demonstrar diferença significativa para esse parâmetro nessa coleta. Diferenças foram observadas na coleta realizada aos 15 dias de experimento, nas doses de 3 e 5mM de Carbono L<sup>-1</sup>, para o tratamento AH3, evidenciando maior promoção de crescimento de área radicular para o ácido húmico proveniente de Organossolo Háplico.



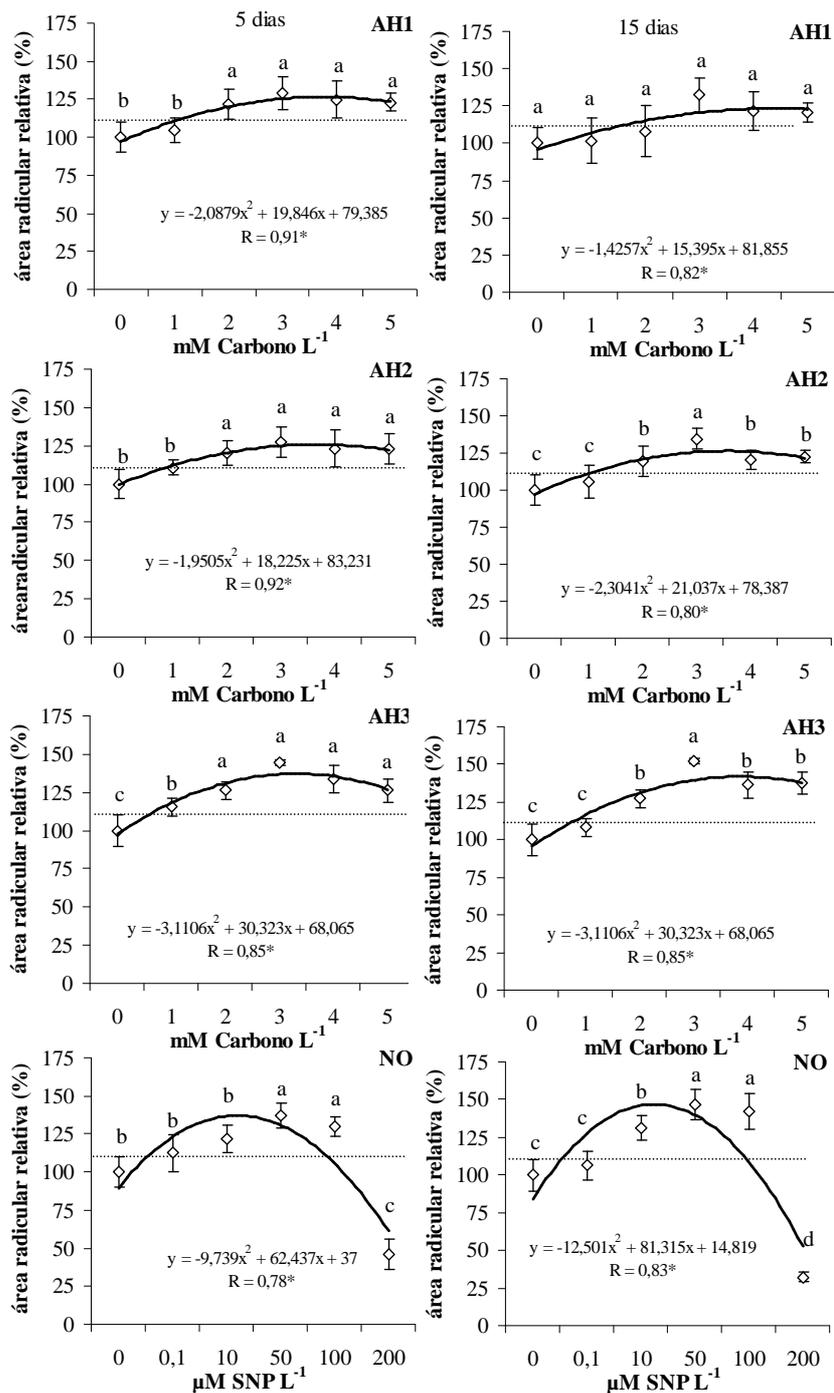
**Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos sobre a área radicular de raízes transformadas de manjeriço.** Valores Relativos de comprimento radicular de Raízes Transformadas de Manjeriço aos 5 dias (A) e aos 15 dias (B), nas doses 1; 2; 3; 4; 5 mM Carbono L<sup>-1</sup> de ácido húmico, submetidas aos tratamentos AH1-Ácido Húmico de Chernossolo Háplico; AH2-Ácido Húmico de Latossolo Vermelho-Amarelo; AH3-Ácido Húmico de Organossolo Háplico.

Linha horizontal pontilhada limita o valor máximo do controle.

Letras iguais dentro de cada dose não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).

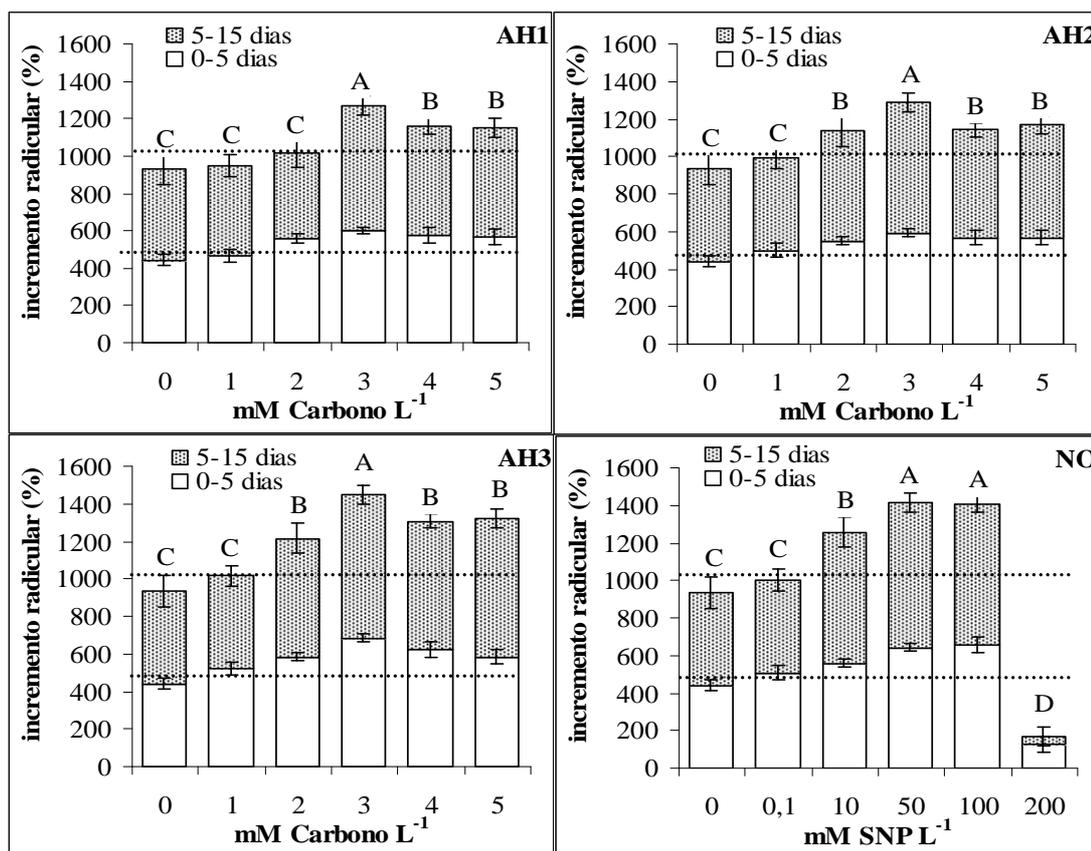
Na Figura 19 é possível observar os resultados de correlação de área radicular de raízes transformadas de manjeriço entre doses testadas de ácido húmico e óxido nítrico, aos 5 e 15 dias de experimento. Verifica-se que para os tratamentos com ácido húmico, a dose de 3mM de Carbono L<sup>-1</sup> apresentarem maiores valores de área radicular, nas duas coletas realizadas, superando o controle em torno de 50%. Já os tratamentos com óxido nítrico as doses de 50 e 100µM de SNP L<sup>-1</sup> apresentaram maior área radicular e a dose de 200µM de SNP L<sup>-1</sup> o menor valor deste parâmetro, evidenciando que esta dose é tóxica para as raízes transformadas.



**Figura 19. Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e óxido nítrico sobre a área radicular de raízes transformadas de manjeriço.** Valores Relativos de área radicular de Raízes Transformadas de Manjeriço aos 5 e 15 dias, nas doses de ácido húmico 0; 1; 2; 3; 4; 5 mM Carbono L<sup>-1</sup> ou nas doses de óxido nítrico 0; 0,1; 10; 50; 100; 200 µM SNP L<sup>-1</sup>, submetidas aos tratamentos Controle (sem ácido húmico ou óxido nítrico); Ácido Húmico de Chernossolo Háplico (AH1); Ácido Húmico de Latossolo Vermelho-Amarelo (AH2); Ácido Húmico de Organossolo Háplico (AH3); SNP-nitroprussiato de sódio como doador de óxido nítrico (NO).

Linha horizontal pontilhada limita o valor máximo do controle. Letras iguais entre as doses não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ). Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4). \* Valores significativos de Correlação de Pearson ( $p \leq 0,05$ ).

A Figura 20 apresenta o incremento radicular dos ácidos húmicos isolados de diferentes classes de solos e do óxido nítrico, dos 0-5 dias e 5-15 dias. Verifica-se que para os tratamentos com ácido húmico a dose de 3mM de Carbono L<sup>-1</sup> foi a dose que demonstrou maiores valores de incremento radicular, com crescimento em torno de 400% em relação ao tratamento controle. Para o tratamento com NO, as doses de 50 e 100µM de SNP L<sup>-1</sup> apresentaram maiores valores de incremento radicular, atingindo taxas de crescimento de 400% em relação ao Controle.



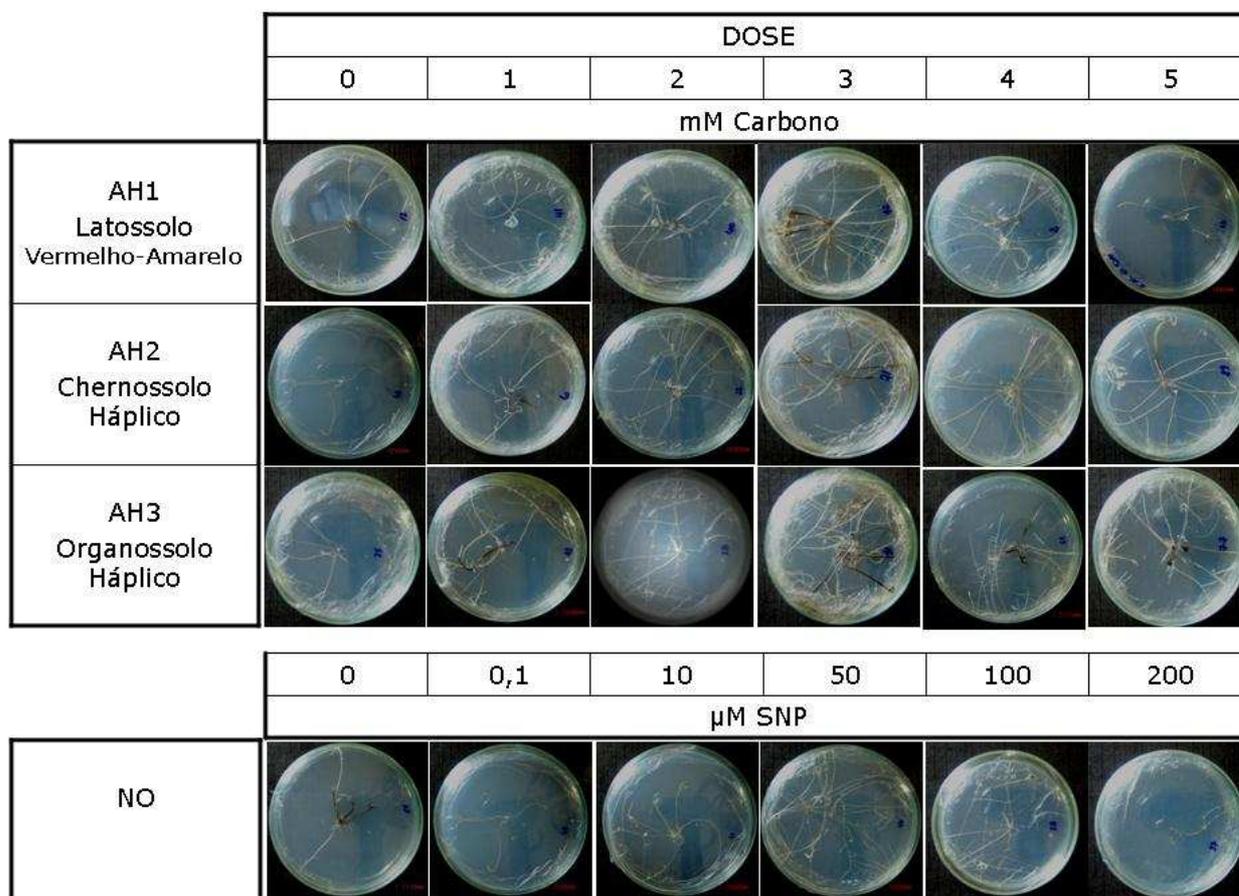
**Figura 20. Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e óxido nítrico sobre o incremento radicular de raízes transformadas de manjeriço.** Valores Relativos de incremento radicular de Raízes Transformadas de Manjeriço, aos 0-5 dias e 5-15 dias de experimento, nas doses de ácido húmico 0; 1; 2; 3; 4; 5 mM Carbono L<sup>-1</sup> ou nas doses de óxido nítrico 0; 0,1; 10; 50; 100; 200 µM SNP L<sup>-1</sup>, submetidas aos tratamentos Controle (sem ácido húmico ou óxido nítrico); Ácido Húmico de Chernossolo Háplico (AH1); Ácido Húmico de Latossolo Vermelho-Amarelo (AH2); Ácido Húmico de Organossolo Háplico (AH3); SNP-nitroprussiato de sódio como doador de óxido nítrico (NO).

Linha horizontal pontilhada limita o valor máximo do controle.

Letras iguais entre as doses não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão. ( $n = 4$ ).

A Figura 21 apresenta as fotos representativas das placas de petri aonde foram avaliados os parâmetros de crescimento das raízes transformadas de manjeriço, distribuídos de acordo com as doses crescentes de ácidos húmicos e óxido nítrico.

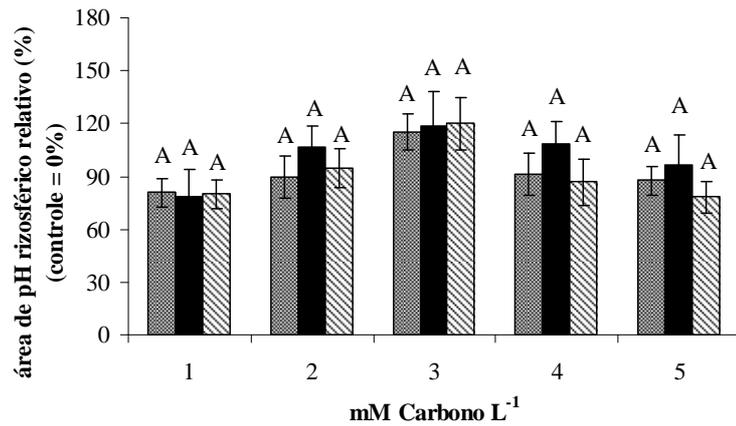


**Figura 21: Efeito de diferentes doses de ácido húmico e de óxido nítrico no crescimento de raízes transformadas de manjericão, aos 15 dias após o tratamento.**

A Figura 22 apresenta a área de acidificação dos ácidos húmicos em função da dose testada. Verifica-se que não houve diferença entre os ácidos húmicos, para cada dose testada, evidenciando o efeito promotor dos ácidos húmicos testados.

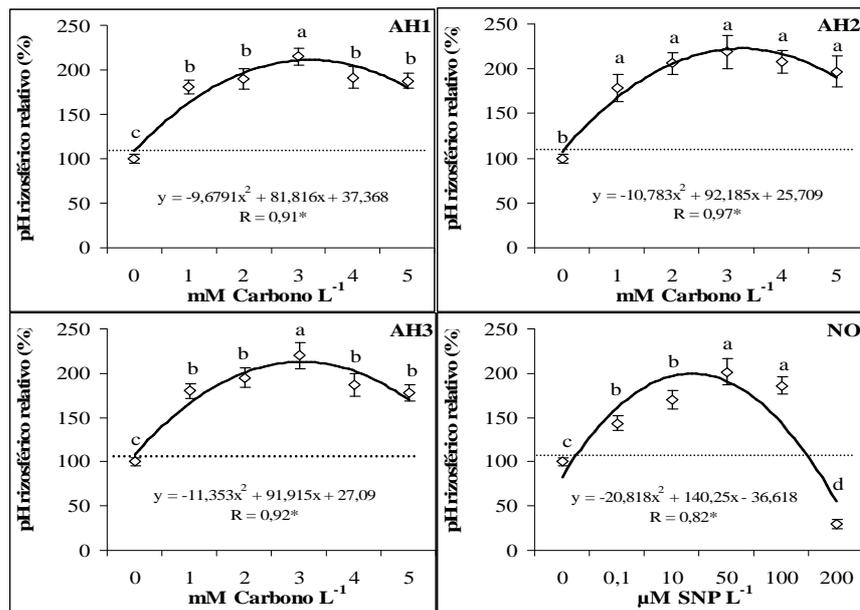
Na Figura 23, para cada ácido húmico testado e óxido nítrico, é possível observar a curva de calibração das áreas de acidificação rizosférica em função da dose das substâncias utilizadas. Todas as substâncias testadas apresentaram maiores valores de área de acidificação rizosférica em relação ao Controle experimental. A dose de 3mM de Carbono  $\text{L}^{-1}$  de ácido húmico promoveu maiores áreas de acidificação em torno da raiz, onde esses valores promoveram praticamente o dobro de acidificação da área de rizosfera, frente ao Controle. Já para o óxido nítrico, a dose de 200 $\mu\text{M}$  de SNP  $\text{L}^{-1}$  provocou uma redução de 70% de acidificação da área de rizosfera, demonstrando que esta dose pode ser tóxica às raízes.

Na Figura 24 encontram-se os valores de correlação significativos dos parâmetros de crescimento radicular de raízes transformadas de manjericão. É possível observar a correlação positiva em torno de 90% entre o número de sítios mitóticos e o comprimento radicular, proporcionados pela aplicação crescente de ácidos húmicos e óxido nítrico, assim como para as correlações do número de sítios mitóticos e área radicular (em torno de 90%) e comprimento radicular e área radicular (em torno de 93%). Esses dados sugerem que os aumentos da dose das substâncias testadas influenciam positivamente o crescimento radicular, agindo no tamanho das raízes, a área ocupada e a formação de raízes (dada pelo número de sítios mitóticos de raízes).



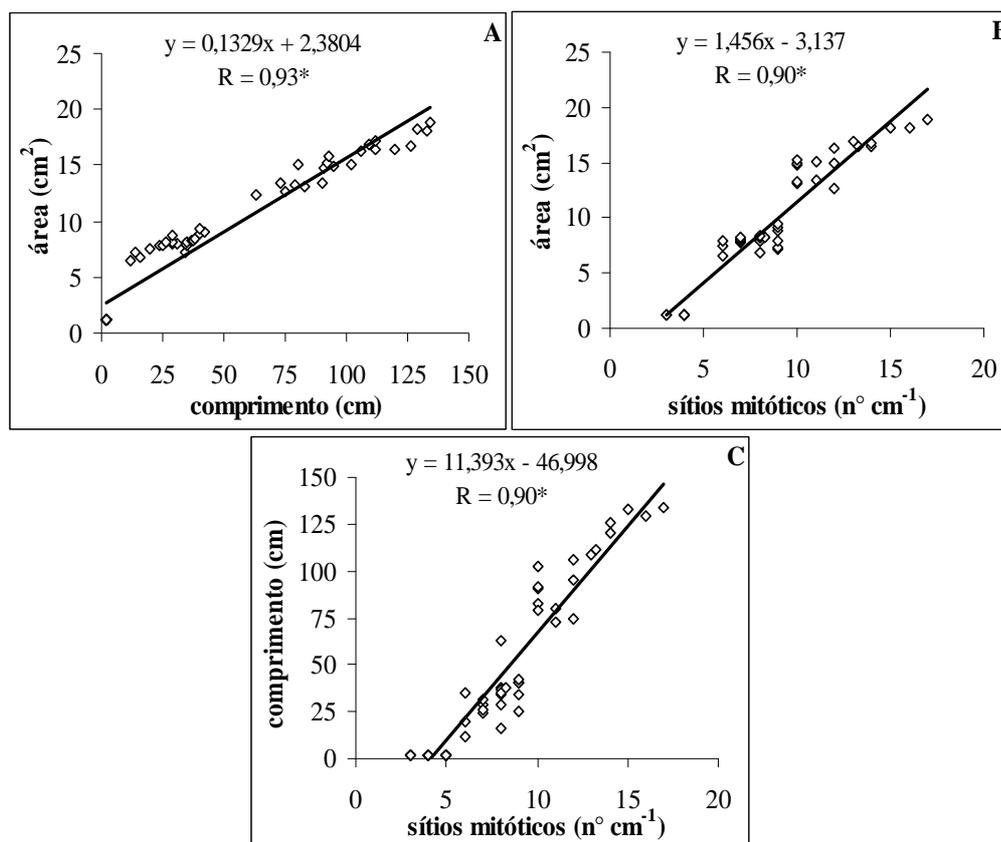
**Figura 22. Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos sobre a área de acidificação radicular de raízes transformadas de manjeriço.** Valores Relativos da área de acidificação radicular de Raízes Transformadas de Manjeriço aos 5 dias, nas doses 1; 2; 3; 4; 5 mM Carbono L<sup>-1</sup> de ácido húmico, submetidas aos tratamentos AH1-Ácido Húmico de Chernossolo Háplico; AH2-Ácido Húmico de Latossolo Vermelho-Amarelo; AH3-Ácido Húmico de Organossolo Háplico.

Linha horizontal pontilhada limita o valor máximo do controle. Letras iguais dentro de cada dose não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ). Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).



**Figura 23. Efeito de diferentes concentrações de ácidos húmicos e óxido nítrico sobre a área de acidificação radicular de raízes transformadas de manjeriço.** Valores Relativos da área de acidificação radicular de Raízes Transformadas de Manjeriço aos 5 dias, nas doses de ácido húmico 0; 1; 2; 3; 4; 5 mM Carbono L<sup>-1</sup> ou nas doses de óxido nítrico 0; 0,1; 10; 50; 100; 200 μM SNP L<sup>-1</sup>, submetidas aos tratamentos Controle (sem ácido húmico ou óxido nítrico); Ácido Húmico de Chernossolo Háplico (AH1); Ácido Húmico de Latossolo Vermelho-Amarelo (AH2); Ácido Húmico de Organossolo Háplico (AH3); SNP-nitroprussiato de sódio como doador de óxido nítrico (NO).

Linha horizontal pontilhada limita o valor máximo do controle. Letras iguais entre as doses não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ). Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4). \* Valores significativos de Correlação de Pearson ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 24. Correlação de Pearson dos parâmetros de crescimento de Raízes Transformadas de Manjeriçao.** Correlação entre: área radicular X comprimento radicular (A); área radicular X número de sítios mitóticos (B); comprimento radicular X número de sítios mitóticos (C).

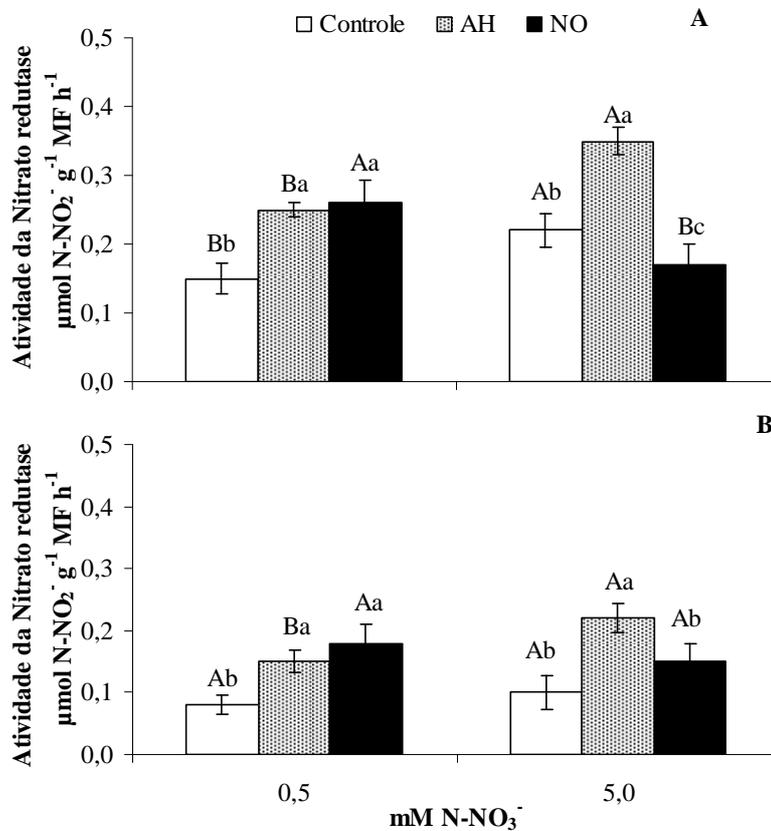
\* Valores significativos de Correlação de Pearson ( $p \leq 0,05$ ).

### 4.3 Experimento 3: Efeitos do ácido húmico e do NO associados a duas doses de $N-NO_3^-$ sobre o crescimento de raiz, metabolismo do nitrogênio, atividade das bombas de prótons, catalase e histolocalização radicular de NO e ROS em raízes transformadas de manjeriçao

Como pode ser observado na Figura 25 a atividade da nitrato redutase (NR) apresentou comportamento semelhante aos 5 e 15 dias após a montagem do experimento. Verifica-se que o tratamento com ácido húmico e NO influenciaram positivamente a atividade NR.

A dose de 5,0mM de  $N-NO_3^-$  proporcionou maior atividade da NR para os tratamentos controle e no tratamento com ácido húmico. Comportamento oposto foi observado para o tratamento com NO, ou seja, a dose mais alta de nitrato reduziu a atividade da NR. Este efeito pode ser devido à inibição da NR com alto teor de  $N-NO_3^-$ , quando se utiliza a molécula bioativa NO. Uma das vias de produção de NO em plantas é dependente da NR, ou seja, com a aplicação de alto teor de  $N-NO_3^-$ , sugere-se que houve a produção de NO. A aplicação exógena de NO concomitante a produção endógena pode promover um acúmulo deste composto, e como consequência causar a inibição da NR, para diminuir as concentrações

internas de NO. Para as duas coletas foi observado este efeito. Na dose mais baixa de  $N\text{-NO}_3^-$  não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com ácido húmico e NO.

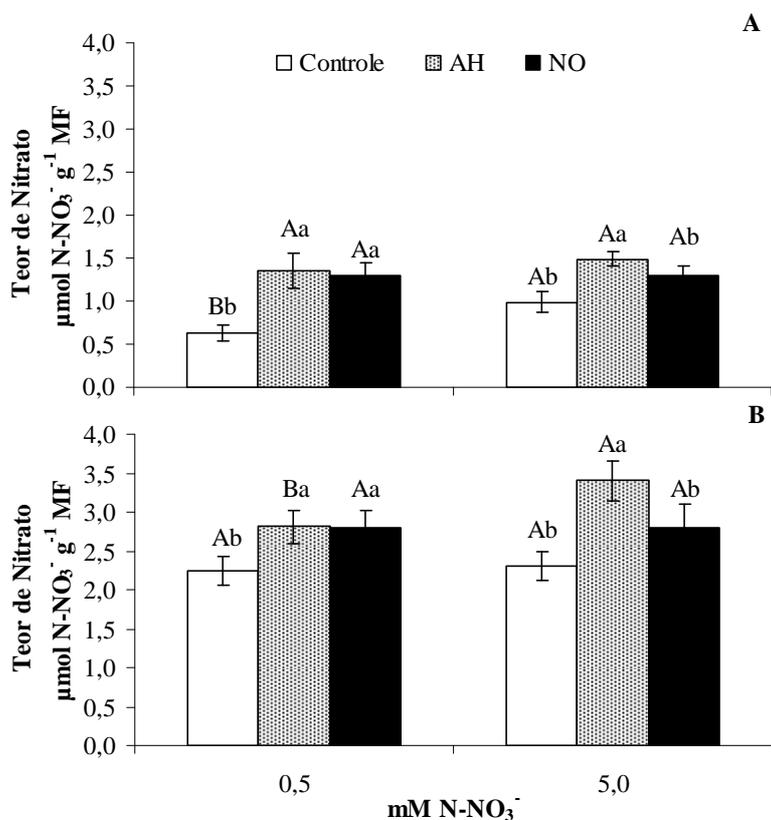


**Figura 25. Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da nitrato redutase em raízes transformadas de manjeriço.** Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono  $L^{-1}$ ), SNP como doador de NO (100  $\mu\text{M}$  SNP  $L^{-1}$  de solução). **A** - média dos tratamentos submetidos à dose baixa de  $N\text{-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $N\text{-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 5 dias após os tratamentos; **B** - média dos tratamentos submetidos a dose baixa de  $N\text{-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $N\text{-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 15 dias após os tratamentos

Letras maiúsculas iguais entre de as dose de  $N\text{-NO}_3^-$  e letras minúsculas iguais dentro da dose de  $N\text{-NO}_3^-$  não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão. ( $n = 4$ ).

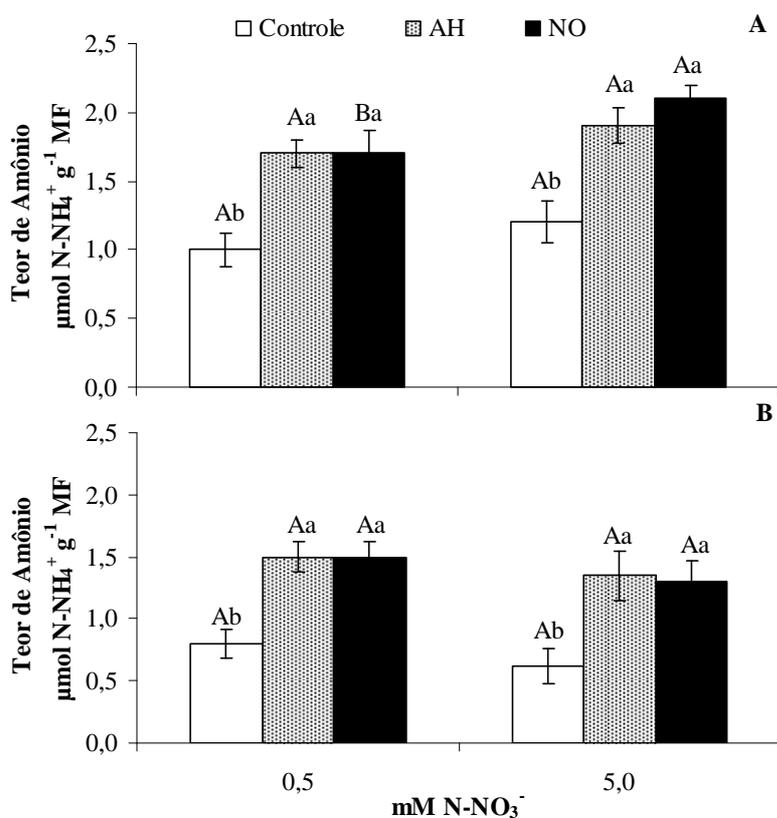
Os teores de  $\text{NO}_3^-$  encontrados nas raízes de manjeriço podem ser vistos na Figura 26. Verifica-se maior teor de nitrato para os tratamentos com ácido húmico e NO, em relação ao controle. É possível observar menores valores de  $\text{N-NO}_3^-$  na coleta feitas aos 5 dias após a montagem do experimento (Figura 31 A), fato este que denota a maior absorção deste ânion nos primeiros dias após o suprimento de nitrogênio. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com as substâncias aplicadas para o teor de  $\text{N-NO}_3^-$ , porém foi observada diferença com o controle. Aos 15 dias (Figura 31 B) foram encontrados maiores teores de  $\text{N-NO}_3^-$  em relação à coleta realizada aos 5 dias após a aplicação dos tratamentos, indicando que as raízes transformadas de manjeriço apresentam a estratégia de acumular parte do  $\text{N-NO}_3^-$  nos vacúolos. Também não houve diferença entre o ácido húmico e NO, em ambas as doses de nitrato fornecidas.



**Figura 26. Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico no teor de nitrato em raízes transformadas de manjeriço.** Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono  $\text{L}^{-1}$ ), SNP como doador de NO (100  $\mu\text{M}$  SNP  $\text{L}^{-1}$  de solução). **A** - média dos tratamentos submetidos à dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 5 dias após os tratamentos; **B** - média dos tratamentos submetidos a dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 15 dias após os tratamentos

Letras maiúsculas iguais entre de as dose de  $\text{N-NO}_3^-$  e letras minúsculas iguais dentro da dose de  $\text{N-NO}_3^-$  não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ). Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).

Na Figura 27 pode ser observado que os tratamentos com ácido húmico e NO apresentam maior teor de amônio, em relação ao controle. O conteúdo de  $\text{N-NH}_4^+$  nas diferentes coletas nas raízes transformadas, submetidas a duas doses de  $\text{N-NO}_3^-$ . Os resultados demonstram maior teor de  $\text{N-NH}_4^+$  na primeira coleta (Figura 20 B). Comparando os resultados dos teores de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 26) e atividade na NR (Figura 25) e os teores de  $\text{N-NH}_4^+$ , é possível sugerir que, na primeira coleta, os teores de  $\text{N-NO}_3^-$  por serem menores, indicam que grande parte do  $\text{N-NO}_3^-$  absorvido está sendo reduzido para  $\text{N-NH}_4^+$ . Os conteúdos de  $\text{N-NH}_4^+$  são significativamente maiores nos tratamentos com ácido húmico e óxido nítrico, em relação ao controle, para as duas épocas coletadas. Verifica-se que não foram significativas as diferenças entre as doses de  $\text{N-NO}_3^-$  e os tratamentos adotados.

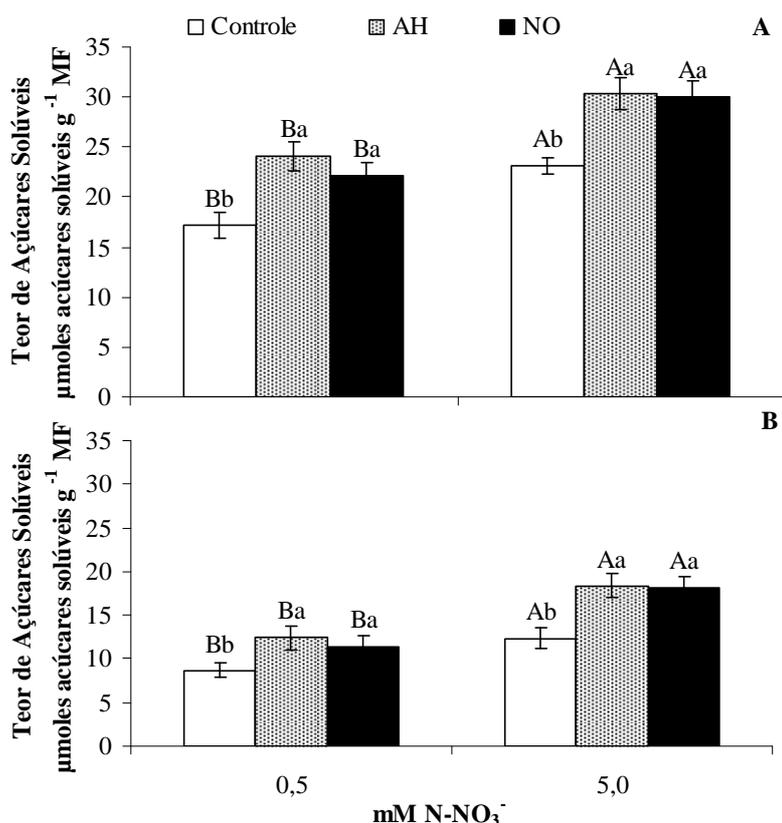


**Figura 27. Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico no teor de amônio em raízes transformadas de manjeriço.** Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono L<sup>-1</sup>), SNP como doador de NO (100μM SNP L<sup>-1</sup> de solução). **A** - média dos tratamentos submetidos à dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 5 dias após os tratamentos; **B** - média dos tratamentos submetidos a dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 15 dias após os tratamentos

Letras maiúsculas iguais entre de as dose de  $\text{N-NO}_3^-$  e letras minúsculas iguais dentro da dose de  $\text{N-NO}_3^-$  não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).

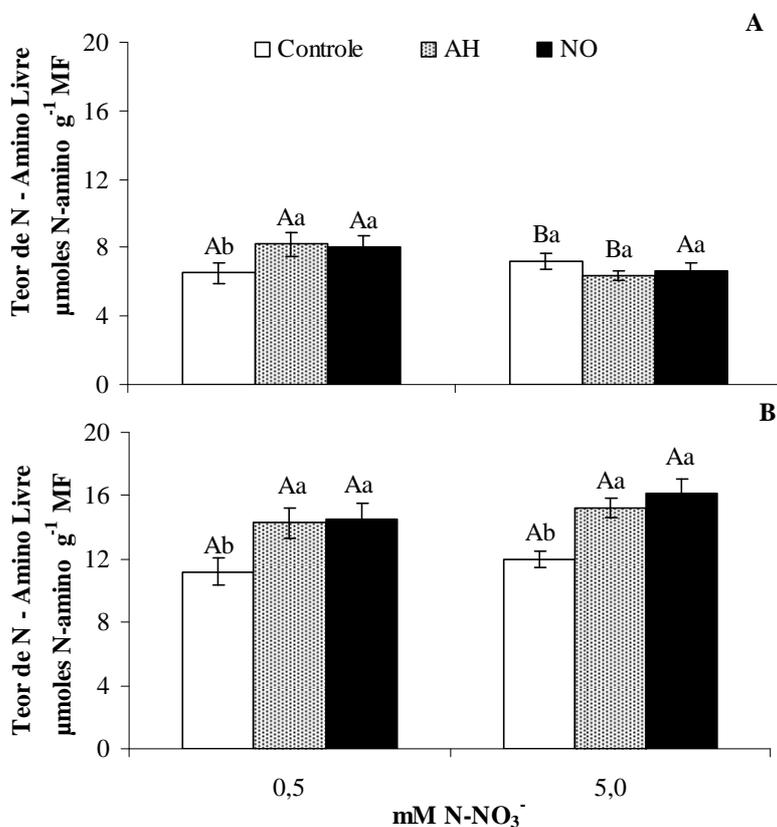
Os níveis de açúcares solúveis indicam a intensidade da atividade metabólica das raízes. A Figura 28 apresenta o conteúdo de açúcares solúveis nas raízes transformadas de manjeriço. Observa-se que aos 5 dias após a montagem do experimento o teor de açúcares solúveis foi maior em relação aos 15 dias e que na dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  o conteúdo de açúcares solúveis foi menor quando comparado ao maior suprimento de  $\text{N-NO}_3^-$ . O teor de açúcares solúveis nos tecidos vegetais são indicadores de energia prontamente disponível para o metabolismo celular (SOUZA, 1995). Os tratamentos com ácido húmico e NO apresentaram maior teor de açúcares do que o controle, demonstrando que estas substâncias podem possibilitar as raízes transformadas de manjeriço energia para o crescimento e absorção de nutrientes.



**Figura 28. Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico no teor de açúcares solúveis em raízes transformadas de manjeriço.** Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono L<sup>-1</sup>), SNP como doador de NO (100µM SNP L<sup>-1</sup> de solução). **A** - média dos tratamentos submetidos à dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 5 dias após os tratamentos; **B** - média dos tratamentos submetidos a dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 15 dias após os tratamentos

Letras maiúsculas iguais entre de as dose de  $\text{N-NO}_3^-$  e letras minúsculas iguais dentro da dose de  $\text{N-NO}_3^-$  não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ). Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).

Os teores de N-amino livre nas raízes transformadas de manjeriço podem ser vistos na Figura 29. O tratamento com as substâncias bioativas (ácido húmico e NO) apresentaram maior teor de N-amino livre, em relação aos controles experimentais (doses de  $\text{N-NO}_3^-$ ). As concentrações adotadas de  $\text{N-NO}_3^-$  aumentaram o conteúdo desse nutriente no interior da planta, que, através da ação das enzimas de assimilação de N elevou os teores de N-amino livre. Observa-se que mesmo com a utilização do baixo teor de  $\text{N-NO}_3^-$ , os níveis de N-amino não sofreram reduções significativas, indicando que as plantas devem estar remobilizando o  $\text{NO}_3^-$  acumulado nos vacúolos a fim de manter uma homeostase metabólica. Verificou-se que aos 15 dias o conteúdo de N-amino foi maior, em relação à coleta realizada aos 5 dias de experimento. Os aminoácidos atuam como reguladores indiretos da atividade da NR e isso pode estar relacionado a sua capacidade de modificar a distribuição de nitrato nos reservatórios celulares, conseqüentemente, interferindo no processo de ativação enzimática. O aumento nos teores de aminoácidos do meio pode provocar a inibição da atividade da NR. Assim, a redução da atividade da enzima pode estar ligada aos maiores teores de aminoácidos presentes, aos 15 dias de experimento.

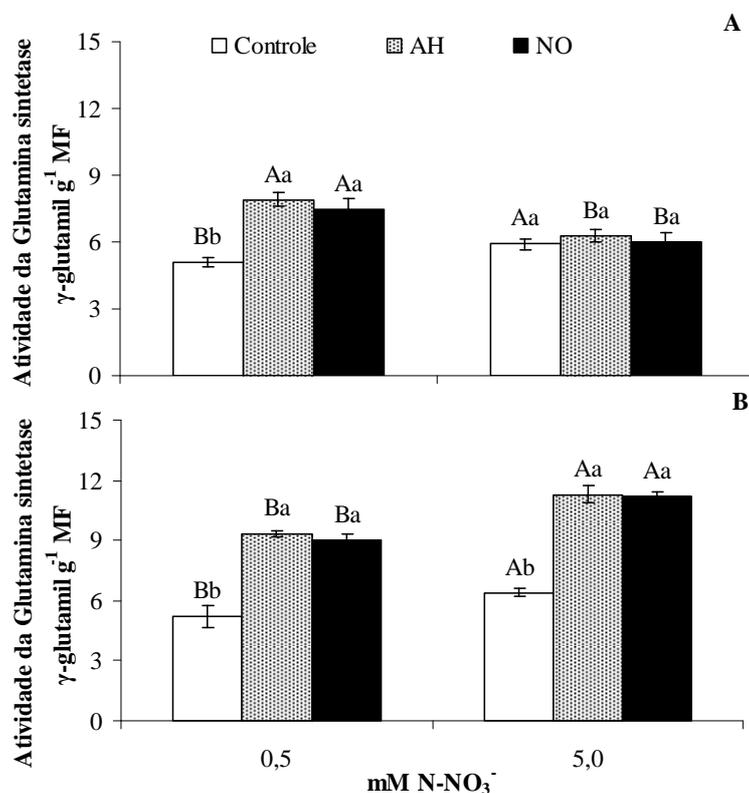


**Figura 29** Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico no teor de N-amino livre em raízes transformadas de manjeriço. Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono  $\text{L}^{-1}$ ), SNP como doador de NO (100 $\mu\text{M}$  SNP  $\text{L}^{-1}$  de solução). **A** - média dos tratamentos submetidos à dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 5 dias após os tratamentos; **B** - média dos tratamentos submetidos a dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 15 dias após os tratamentos

Letras maiúsculas iguais entre de as dose de  $\text{N-NO}_3^-$  e letras minúsculas iguais dentro da dose de  $\text{N-NO}_3^-$  não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).

A atividade da Glutamina Sintetase (GS) em raízes transformadas de manjeriço submetidas aos diferentes tratamentos adotados pode ser vista na Figura 30. É possível observar que tanto o ácido húmico como o NO promoveram maior atividade da GS, aumentando a atividade desta enzima em torno de 40% do controle. Observa-se que aos 5 dias de experimento a dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  apresentou a atividade da GS superior a dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$ . Comportamento oposto foi visto aos 15 dias, onde as raízes transformadas tiveram maior atividade desta enzima no tratamento com a dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$ . A Glutamina Sintetase catalisa a etapa chave da assimilação do nitrogênio inorgânico que é a incorporação do amônio ao aminoácido glutamato, produzindo a glutamina. Dessa maneira pode-se especular que as raízes transformadas submetidas à dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$ , nos primeiros dias de contato com este nutriente, rapidamente o absorvem, devido a sua limitação no meio de cultura, de forma a garantir o suprimento de  $\text{N-NO}_3^-$ . Essa estratégia já não é observada nos tratamentos submetidos à dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$ , pois por não apresentarem limitação no meio de cultura de nitrato, podem absorver mais lentamente essa fonte nitrogenada. Dessa forma, o aumento da atividade da GS pode ser vista tardiamente (15 dias).

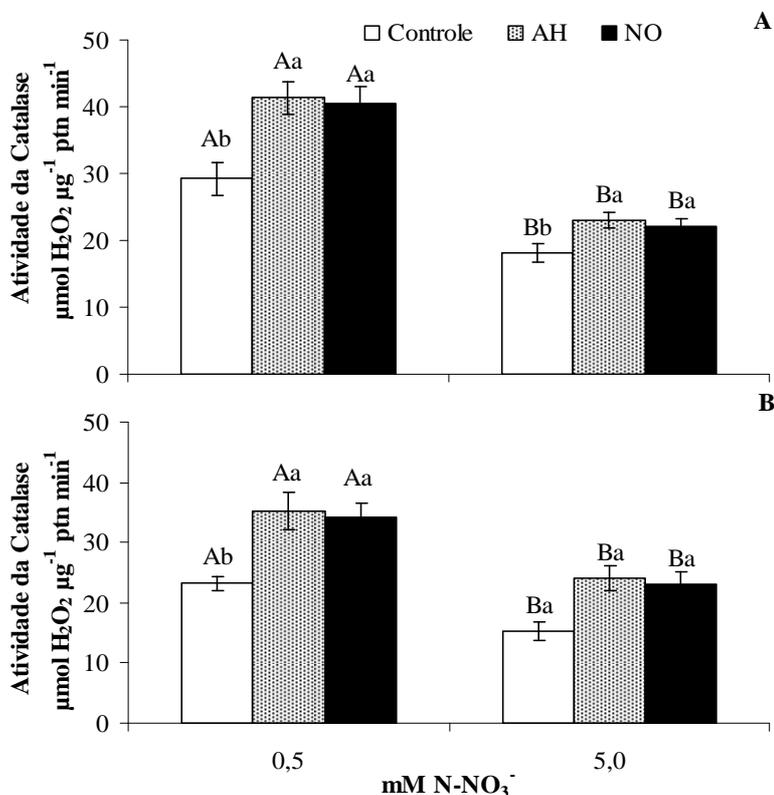


**Figura 30. Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da glutamina sintetase em raízes transformadas de manjeriço.** Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono  $\text{L}^{-1}$ ), SNP como doador de NO (100 $\mu\text{M}$  SNP  $\text{L}^{-1}$  de solução). **A** - média dos tratamentos submetidos à dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 5 dias após os tratamentos; **B** - média dos tratamentos submetidos a dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0mM) aos 15 dias após os tratamentos

Letras maiúsculas iguais entre de as dose de  $\text{N-NO}_3^-$  e letras minúsculas iguais dentro da dose de  $\text{N-NO}_3^-$  não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).

Na Figura 31, observa-se a atividade da catalase nas raízes transformadas de manjeriço, com a aplicação de substâncias bioativas e duas doses de  $\text{N-NO}_3^-$ . É possível observar o aumento da atividade da catalase em torno de 40% nos tratamentos com as substâncias bioativas. A atividade da catalase apresentou comportamento semelhante nas duas coletas realizadas. Os tratamentos supridos com a menor dose de  $\text{N-NO}_3^-$  apresentaram aumentados na atividade desta enzima. Nesse sentido, duas hipóteses podem fundamentar esse comportamento e está relacionada com a quantidade limitada de nitrogênio no meio de cultura ( $0,5\text{mM N-NO}_3^-$ ). A primeira se deve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ocasionada pelos baixos níveis de  $\text{N-NO}_3^-$  no meio de cultura, tal como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), como sinal de estresse. A segunda hipótese é mais plausível é que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado tem importante função fisiológica, especialmente no metabolismo oxidante da parede celular, pois estas espécies reativas sinalizam a atividade das enzimas que promovem o afrouxamento da parede celular, como as celulases, hemicelulases, glucanases e pectinases, atuando no crescimento das células vegetais. Dessa forma, a atividade da catalase é um indicativo dos processos de diferenciação e crescimento das células de raiz.



**Figura 31. Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da catalase em raízes transformadas de manjeriço.** Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico ( $3\text{mM}$  de Carbono  $\text{L}^{-1}$ ), SNP como doador de NO ( $100\mu\text{M}$  SNP  $\text{L}^{-1}$  de solução). **A** – média dos tratamentos submetidos à dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5\text{mM}$ ) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $5,0\text{mM}$ ) aos 5 dias após os tratamentos; **B** – média dos tratamentos submetidos a dose baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5\text{mM}$ ) e dose alta de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $5,0\text{mM}$ ) aos 15 dias após os tratamentos

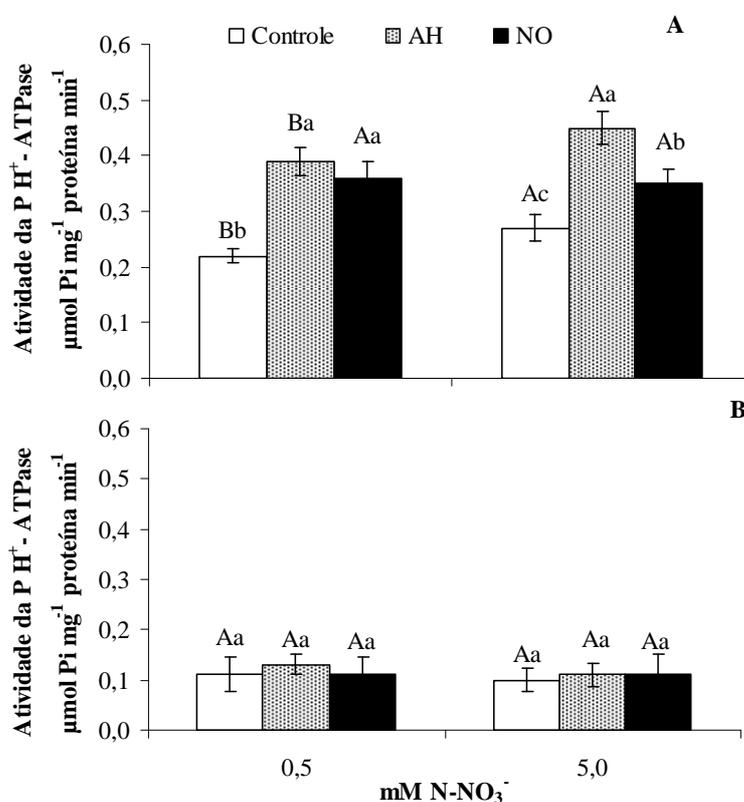
Letras maiúsculas iguais entre de as dose de  $\text{N-NO}_3^-$  e letras minúsculas iguais dentro da dose de  $\text{N-NO}_3^-$  não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão ( $n = 4$ ).

A atividade das P H<sup>+</sup>-ATPases de membrana plasmática de raízes transformadas de manjeriço podem ser observadas na Figura 32. O tratamento com ácido húmico apresentou maior atividade das P H<sup>+</sup>-ATPases, seguida do tratamento com NO, sendo estes tratamentos superiores ao controle experimental.

Verificou-se que a atividade das P H<sup>+</sup>-ATPases afetaram positivamente os tratamentos com as substâncias bioativas, nas duas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, na primeira coleta. Já aos 15 dias não houve diferença entre os tratamentos adotados.

A absorção de nitrato é um processo ativo, que ocorre contra um gradiente de potencial eletroquímico, e precisa da geração de um gradiente de próton através da membrana plasmática, sendo, portanto dependente da atividade das bombas de próton (P-H<sup>+</sup>-ATPase) dessas membranas (GLASS et al., 1992). O transporte de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> da rizosfera para o interior celular é termodinamicamente desfavorável em termos de gradiente de potencial elétrico e potencial químico, assim, a absorção de nitrato requer energia, presumidamente como uma força próton-motriz, que é proporcionada por bombas eletrogênicas (H<sup>+</sup>-ATPases). Assim é possível concluir que as substâncias bioativas utilizadas possibilitaram aumento das bombas de prótons de membrana plasmática.

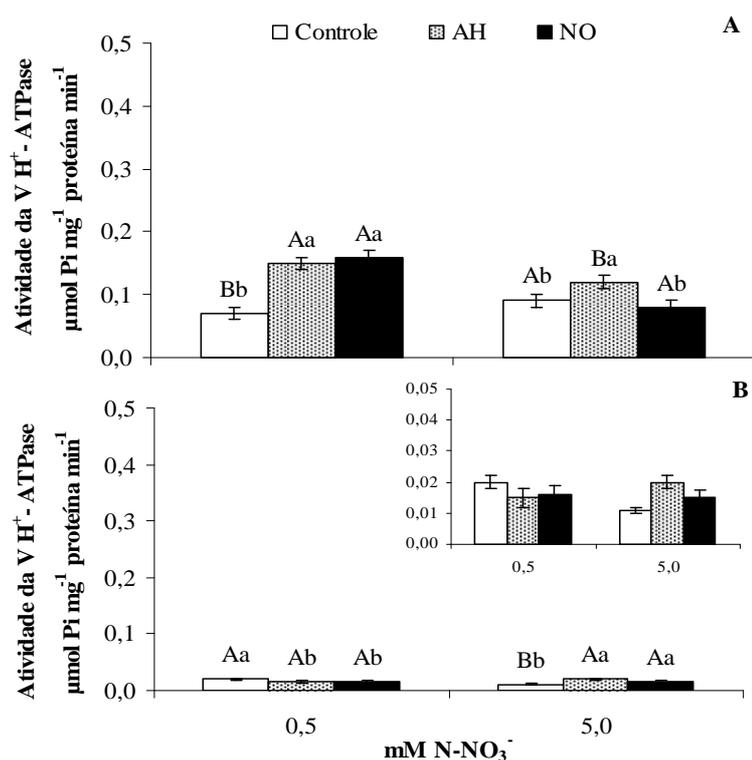


**Figura 32. Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da P H<sup>+</sup>-ATPases em raízes transformadas de manjeriço.** Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono L<sup>-1</sup>), SNP como doador de NO (100µM SNP L<sup>-1</sup> de solução). **A** - média dos tratamentos submetidos à dose baixa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5mM) e dose alta de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0mM) aos 5 dias após os tratamentos; **B** - média dos tratamentos submetidos a dose baixa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5mM) e dose alta de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0mM) aos 15 dias após os tratamentos

Letras maiúsculas iguais entre de as dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e letras minúsculas iguais dentro da dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não diferem entre si pelo teste de Scott Knot (p<0,05).

Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).

A atividade das  $V H^+$ -ATPases em raízes transformadas de manjeriço submetidas aos tratamentos com duas doses de  $N-NO_3^-$  e substâncias bioativas podem ser observadas na Figura 33. A  $V$ -ATPase acidifica compartimentos intracelulares e é essencial para muitos processos, incluindo co-transportes, desenvolvimento, e tolerância a estresses ambientais. A atividade desta enzima foi aumentada nos tratamentos com ácido húmico e NO, quando comparadas ao controle. Quando se verifica a atividade enzimática desta bomba de prótons nos tratamentos com as substâncias bioativas, nas duas doses de  $N-NO_3^-$  observa-se que na dose mais baixa de nitrato utilizada, a atividade das  $V H^+$ -ATPases foram aumentadas nos tratamentos com ácido húmico e NO, em relação a dose mais alta de nitrato aos 5 dias de experimento. Este aumento na atividade com a utilização das substâncias bioativas pode estar associado ao armazenamento de  $N-NO_3^-$  nos compartimentos celulares, como o vacúolo, para serem utilizados posteriormente, devido à baixa concentração deste nutriente no meio de cultura. Aos 15 dias de experimento não houve diferença entre os tratamentos adotados. A  $V$ -ATPase é a bomba de prótons predominante nas endomembranas da maioria das células vegetais, tanto em termos de quantidade de proteína como também freqüentemente em atividade. Sob condições de estresse como salinidade, déficit hídrico, frio, estresse ácido, anoxia e excesso de metais pesados nos solos, a sobrevivência da célula depende fortemente da manutenção ou ajuste da atividade das  $V$ -ATPases (DIETZ et al., 2001).

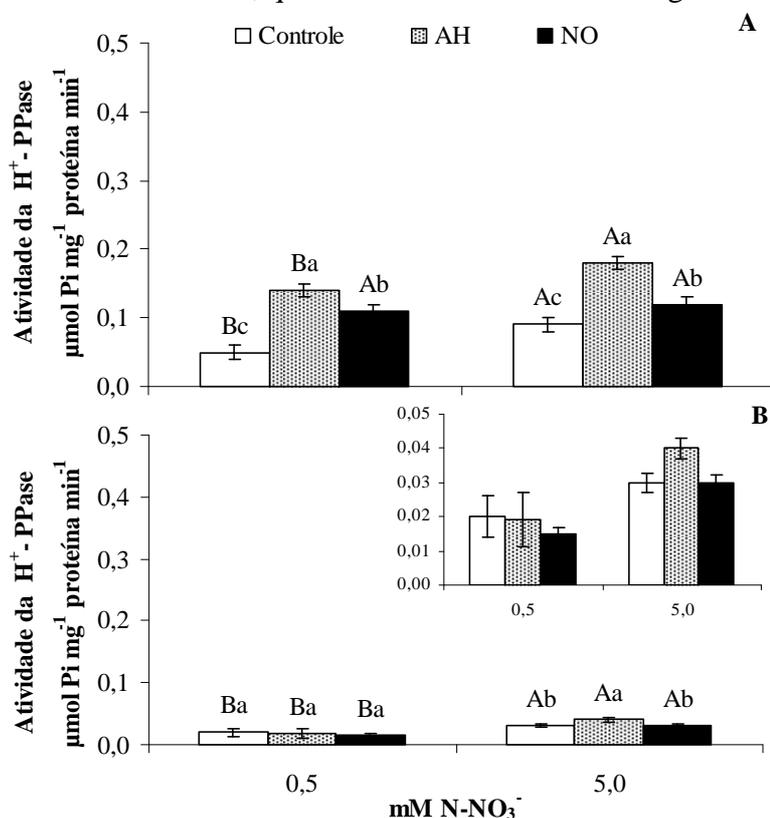


**Figura 33. Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da  $V H^+$ -ATPase em raízes transformadas de manjeriço.** Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono  $L^{-1}$ ), SNP como doador de NO (100 $\mu\text{M}$  SNP  $L^{-1}$  de solução). **A** - média dos tratamentos submetidos à dose baixa de  $N-NO_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $N-NO_3^-$  (5,0mM) aos 5 dias após os tratamentos; **B** - média dos tratamentos submetidos a dose baixa de  $N-NO_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $N-NO_3^-$  (5,0mM) aos 15 dias após os tratamentos

Letras maiúsculas iguais entre de as dose de  $N-NO_3^-$  e letras minúsculas iguais dentro da dose de  $N-NO_3^-$  não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ). Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).

Na Figura 34 são apresentados os gráficos da atividade das  $H^+$ -PPases em raízes transformadas de manjeriçã, tratadas com ácido húmico e NO, em dois níveis de  $N-NO_3^-$ . Neste parâmetro, foi observado comportamento semelhante nas duas coletas realizadas, onde os tratamentos com as substâncias bioativas aumentaram a atividade enzimática, nas duas doses de nitrato testadas.

As prótons pirofosfatases ( $H^+$ -PPases) são bombas eletrogênicas de prótons que acidificam vacúolos em células vegetais. O substrato para as  $H^+$ -PPases, PPi (composto simples de alta energia), é um subproduto de vários processos metabólicos, como a polimerização de DNA e RNA, síntese de aminoacil-tRNA, formação de ADP-glicose e UDP-glicose, entre outras (MAESHIMA, 2000). Foi observada a redução na atividade das  $H^+$ -PPases, da primeira para segunda coleta. Este comportamento sugere que esta enzima é mais ativa nos primeiros dias de experimento, quando o crescimento é mais ativo (tecidos novos), onde o PPi é continuamente gerado, por ser uma fonte de energia de baixo custo, e dessa forma, podendo ser aproveitado na acidificação de vacúolos, atuando no controle da homeostase desta endomembrana. Além disso, a atividade das  $H^+$ -PPases nas células em crescimento ajuda a conservar o ATP, que é a moeda corrente de energia nas células.

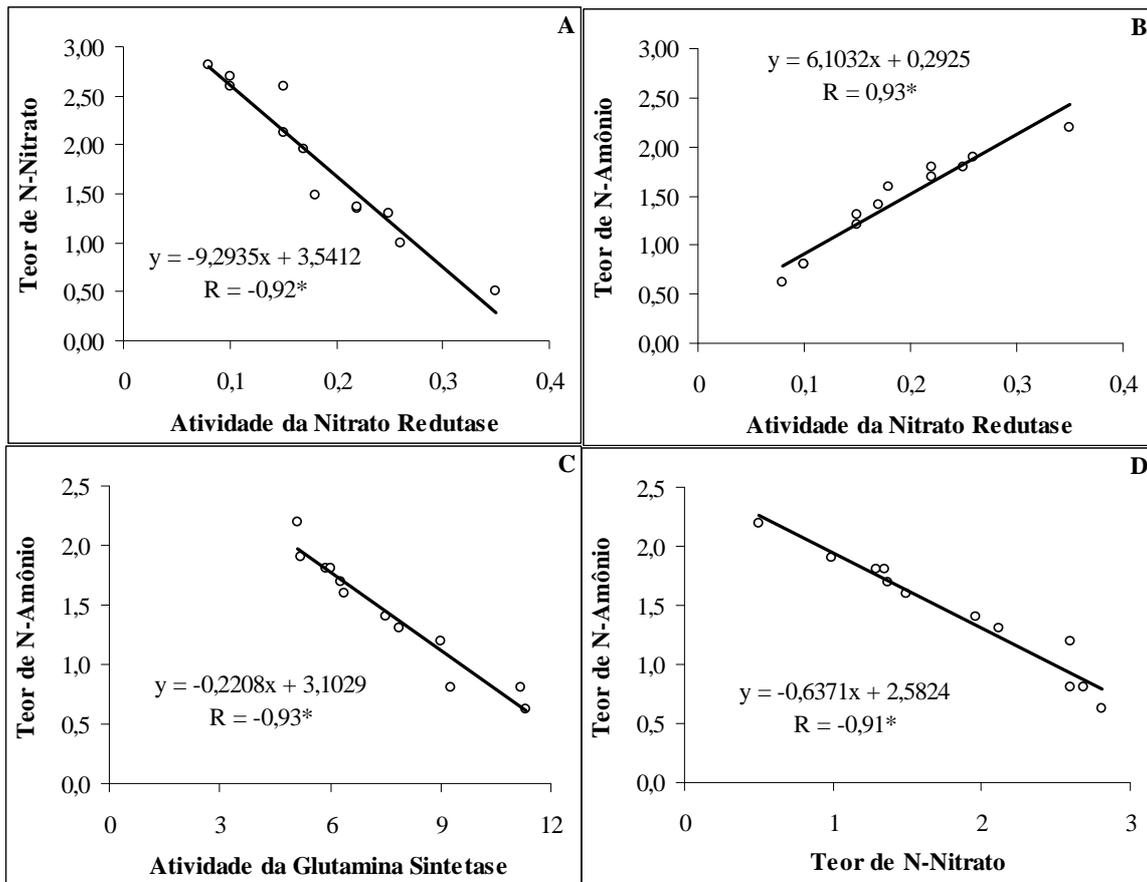


**Figura 34. Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico na atividade da  $H^+$ -PPase em raízes transformadas de manjeriçã.** Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono  $L^{-1}$ ), SNP como doador de NO (100 $\mu\text{M}$  SNP  $L^{-1}$  de solução). **A** - média dos tratamentos submetidos à dose baixa de  $N-NO_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $N-NO_3^-$  (5,0mM) aos 5 dias após os tratamentos; **B** - média dos tratamentos submetidos a dose baixa de  $N-NO_3^-$  (0,5mM) e dose alta de  $N-NO_3^-$  (5,0mM) aos 15 dias após os tratamentos

Letras maiúsculas iguais entre as dose de  $N-NO_3^-$  e letras minúsculas iguais dentro da dose de  $N-NO_3^-$  não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p < 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão. ( $n = 4$ ).

Na Figura 35 é possível observar os valores de correlação de Pearson dos dados do metabolismo de N. Os valores de correlação foram altamente significativos. Comparando os resultados de correlação podemos atribuir que: quando a atividade da nitrato redutase aumenta, o teor de N-nitrato no tecido vegetal é diminuído (Figura 35A), os níveis de N-amônio aumentam (Figura 35B), promovida pela atividade da NR, que reduz o N-nitrato a N-amônio. Na Figura 35C, observa-se que a atividade da glutamina sintetase é aumentada quando os teores de N-amônio são diminuídos nas raízes transformadas de manjeriçã, devido a incorporação desta forma nitrogenada ao aminoácido glutamato, produzindo glutamina. Já na Figura 35D observa-se uma correlação negativa entre o teor de N-nitrato e N-amônio, que pode ser atribuído a atividade da NR.

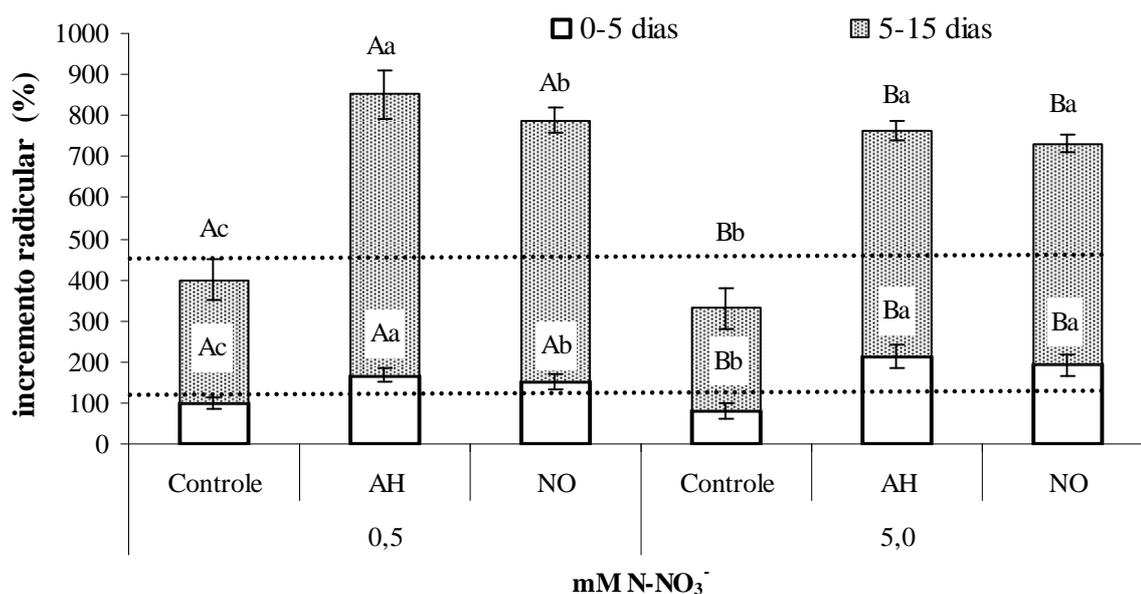


**Figura 35. Correlação de Pearson dos parâmetros do metabolismo de N das Raízes Transformadas de Manjeriçã.** Correlação entre: Teor de N-Nitrato X Atividade da Nitrato Redutase (A); Teor de N-Amônio X Atividade da Nitrato Redutase (B); Teor de N-Amônio X Atividade da Glutamina sintetase (C); Teor de N-Amônio X Teor de N-Nitrato (D).

Valores significativos de Correlação de Pearson ( $p \leq 0,05$ ).

Na Figura 36 observa-se o incremento radicular relativo referente ao comprimento radicular das raízes transformadas de manjeriçã, aos 0-5 dias e 5-15 dias de experimento, tratadas com ácido húmico e NO, nas doses baixa e alta de  $N-NO_3^-$ . O incremento radicular entre 5 e 15 dias é notável, apresentando taxas de crescimento em torno de 300% para os controles experimentais. Para o tratamento com ácido húmico as taxas de crescimento das

raízes transformadas de manjeriço foram de 600 a 700%, nas doses de 0,5 e 5,0mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente. Já para o NO foi observado um incremento radicular na ordem de 500 a 600% nas doses de 0,5 e 5,0mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente. A dose mais baixa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> tratada com ácido húmico propiciou o aumento do tamanho radicular, quando comparado aos demais tratamentos, sugerindo que essa associação possa ativar uma cascata de eventos bioquímicos relacionados ao crescimento celular, que culminam na promoção do crescimento radicular. Comportamento semelhante foi notado para tratamento tratado com NO.



**Figura 36. Efeito do ácido húmico e do óxido nítrico no incremento radicular relativo (comprimento radicular) de raízes transformadas de manjeriço.** Coleta realizada aos 0-5 dias e 5-15 dias de experimento, submetidas aos tratamentos Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono L<sup>-1</sup>), SNP como doador de NO (100µM SNP L<sup>-1</sup> de solução) e a dose baixa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5mM) e dose alta de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0mM).

Linha horizontal pontilhada limita o valor máximo do controle.

Letras maiúsculas iguais entre as dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e letras minúsculas iguais dentro da dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não diferem entre si pelo teste de Scott Knot (p≤0,05)

Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).

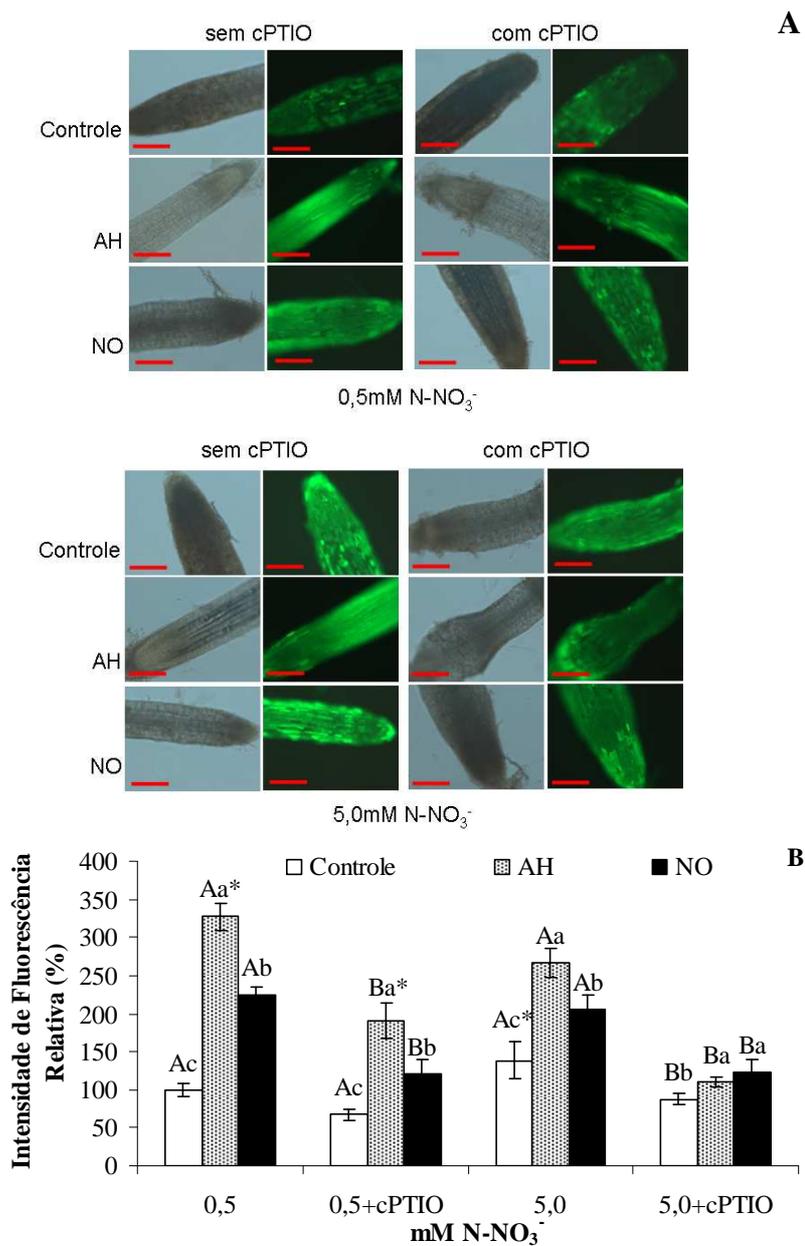
Na Figura 37 observa-se o efeito dos tratamentos adotados, na histolocalização *in vivo* de NO, nas raízes transformadas de manjeriço. A fluorescência de NO endógeno foi observada nas duas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> testadas. A aplicação de ácido húmico e de NO aumentaram a emissão de fluorescência, sendo que na dose mais baixa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, as raízes testadas com ácido húmico apresentaram aumentos em torno de 250% de fluorescência e no tratamento com NO houve aumentos de 150%, ambos em relação ao controle. Comportamento semelhante foi observado nos tratamentos com a dose mais alta de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sendo estes aumentos na ordem de 200 e 100% para o ácido húmico e NO, respectivamente. A aplicação do “sequestrador” (cPTIO) promoveu uma redução na emissão de fluorescência de 230% para ácido húmico e 140% para NO (uma redução de 180 e 120% em relação aos

tratamentos ácido húmico e NO, sem o sequestrador de NO), tanto nas doses de  $\text{N-NO}_3^-$ , quanto para a aplicação das substâncias bioativas, quando comparados aos tratamentos sem sequestrador. O cPTIO é um potente sequestrador de NO, por atuar tanto no sequestro de NO quanto na enzima óxido nítrico sintase (NOS). Verificou-se que a dose aplicada de cPTIO bloqueou parcialmente o conteúdo de NO nos tratamentos quando o este composto foi adicionado. Na dose de  $\text{N-NO}_3^-$  mais alta, o cPTIO sequestrou mais eficientemente o NO, em relação as substâncias bioativas testadas, promovendo aumento de emissão de fluorescência de 10% em relação ao controle + cPTIO. Porém na dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$ , a dose de cPTIO aplicada não sequestrou totalmente o NO produzido pelas raízes transformadas, sendo estes aumentos de emissão de fluorescência para tratamento ácido húmico + cPTIO de 170% e para o tratamento com SNP + cPTIO 100%, em relação ao controle experimental. Esta produção endógena pode estar sendo mantida por outros mecanismos presentes na célula que contribuem para a síntese basal de NO, como por exemplo, a produção endógena de auxina, a qual é maior do que em raízes não transformadas. Um aumento transiente na concentração de NO pode ser induzido por auxinas, numa cascata de eventos bioquímicos que culminam no crescimento radicular (OTVOS et al., 2005), e, portanto sendo observado na microscopia de fluorescência.

Verificando as imagens de microscopia no campo claro, é possível observar diferenças no padrão de ponta de raiz. As raízes dos controles (baixa e alta dose de  $\text{N-NO}_3^-$ ) apresentam-se de coloração mais escuras, enquanto as raízes tratadas com ácido húmico apresentaram-se com aspecto mais claro e as raízes com NO um pouco mais claras que os controles (Figura 37). Especula-se que as raízes provenientes dos tratamentos controle e com NO apresentam-se mais lignificadas do que as raízes tratadas com ácido húmico. Os tratamentos com o sequestrador cPTIO demonstraram padrão diferenciado das pontas de raiz, parecendo que se formavam um aglomerado de células que eram impedidas de crescer, além de apresentarem uma coloração mais escurecida (Figura 37A). Diante dessas evidências, sugere-se que o NO esteja envolvido no crescimento radicular, atuando na ativação de enzimas, como as bombas de prótons e promoção na absorção de  $\text{N-NO}_3^-$  induzidos pelo ácido húmico.

O efeito dos tratamentos ácido húmico e NO submetidos à dose baixa e alta de  $\text{N-NO}_3^-$  na histolocalização *in vivo* de espécies reativas de oxigênio (ROS), em raízes transformadas de manjerição pode ser observada na Figura 38.

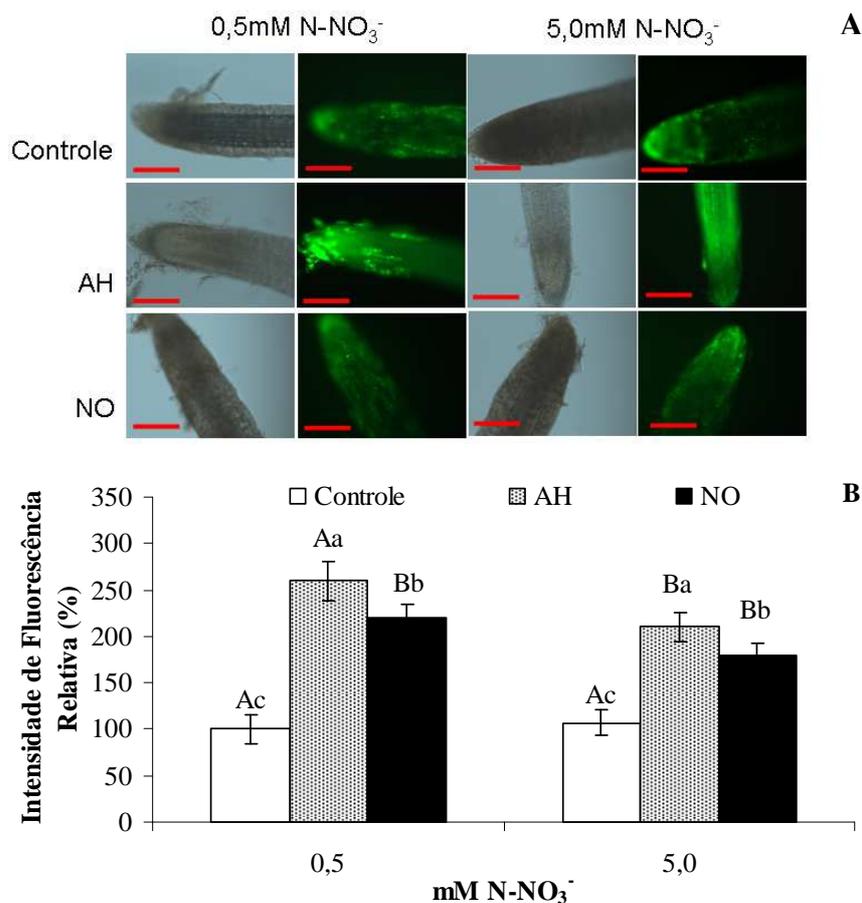
Observa-se que os tratamentos suplementados com as substâncias bioativas promoveram aumentos significativos na emissão de fluorescência, sugerindo um aumento nos níveis de ROS, quando comparados ao controle experimental, para as duas doses de  $\text{N-NO}_3^-$  testadas. Na dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  é possível observar que a aplicação de ácido húmico promoveu aumentos de emissão de fluorescência de ROS, em torno de 120%, em relação ao controle e o tratamento com NO aumentos de 60% de fluorescência de ROS e na dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$  o padrão de fluorescência foi semelhante, porém os valores de emissão de fluorescência foram invertidos para o ácido húmico e NO (60 e 120%, respectivamente). As ROS são geradas nos processos de diferenciação e crescimento celular, como também na regulação do crescimento e sinalização celular em plantas. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é uma espécie reativa de oxigênio que pode reagir no apoplasto, para formar o radical hidroxil, que é responsável pela clivagem de polissacarídeos, resultando no relaxamento da parede celular e conseqüente crescimento da célula.



**Figura 37. Efeito da incubação com AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono L<sup>-1</sup>) e SNP como doador de NO (100µM SNP L<sup>-1</sup> de solução) nos níveis endógenos de NO em ápice radicular de raízes transformadas de manjericão.** Raízes crescidas em baixa (0,5mM) ou alta dose (5,0mM) de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 5 dias, em tratamentos com ou sem o seqüestrador cPTIO. **(A)** - Imagens em campo claro e campo escuro obtidas em microscópio de fluorescência, com a escala de barras = 200µm (linha vermelha em cada figura), utilizando a sonda fluorescente DAF-FM-DA, específica para NO. **(B)** - Intensidade de Fluorescência Relativa em ápice radicular, expressas como número de pixels relativo.

Em (B) letras maiúsculas iguais entre a presença e ausência de cPTIO na dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, letras minúsculas iguais dentro da dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e o símbolo \* entre as doses (com ou sem cPTIO) não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão. (n = 6).



**Figura 38.** Efeito da incubação com AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono L<sup>-1</sup>) e NO- Nitroprussiato de Sódio (SNP) como doador de óxido nítrico NO (100µM SNP L<sup>-1</sup> de solução) nos níveis endógenos de ROS (espécies reativas de oxigênio) em ápice radicular de raízes transformadas de manjeriçõ. Raízes crescidas em baixa (0,5mM) ou alta dose (5,0mM) de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 5 dias, em tratamentos com ou sem o inibidor cPTIO (inibidor da NOS - óxido nítrico sintasesesquestrador de NO). (A) - Imagens em campo claro e escuro obtidas em microscópio, com a escala de barras = 200µm, utilizando a sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA específica para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (B) - Intensidade de Fluorescência Relativa em ápice radicular, expressas como número de pixels relativo.

Em (B) letras maiúsculas iguais entre as dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e letras minúsculas iguais dentro da dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não diferem entre si pelo teste de Scott Knot (p≤0,05)  
Barras verticais indicam erro padrão. (n = 6).

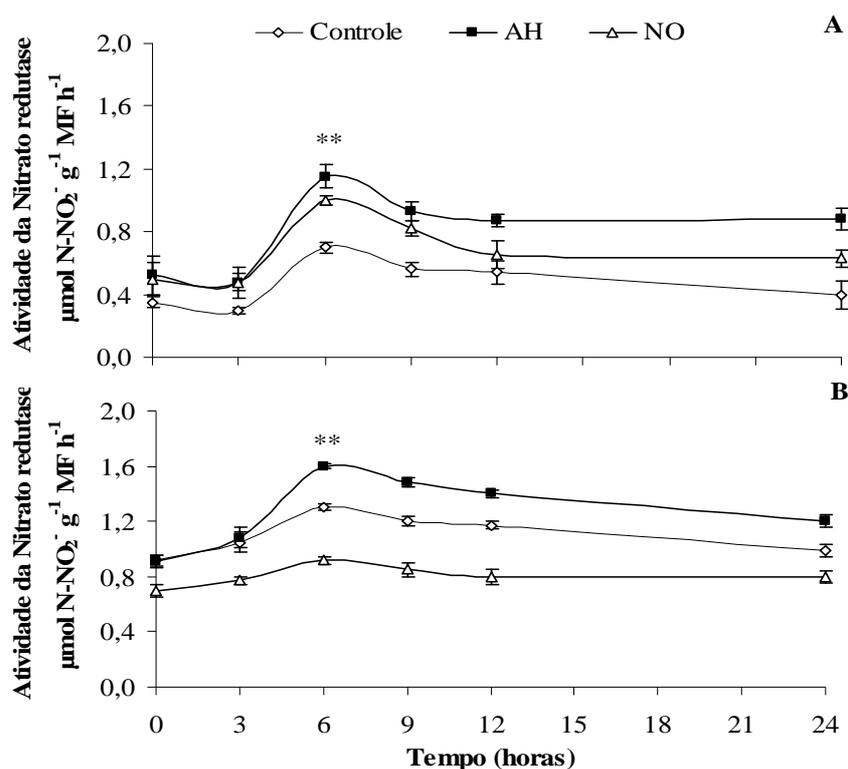
**4.4 Experimento 4:** Efeitos do ácido húmico e do óxido nítrico associados a duas doses de  $\text{N-NO}_3^-$  sobre a atividade das enzimas nitrato redutase, bombas de prótons, catalase e a histolocalização radicular de NO e ROS em raízes transformadas de manjerição em experimento de curta duração

Foram feitas seis coletas durante o período de 24 horas (Figura 39), para avaliar a atividade da nitrato redutase (NR), após a adição das substâncias bioativas e doses de  $\text{N-NO}_3^-$  testadas. Inicialmente houve uma pequena diminuição da atividade enzimática (após a aplicação dos tratamentos até as 3 horas), na dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$ . Progressivo aumento da atividade da NR foi observado, tendo sua máxima atividade nas 6 horas de experimento, tanto para a dose mais baixa quanto para dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 39). Em seguida houve uma ligeira redução da atividade, atingindo valores estáveis a partir da coleta realizada às 9 horas, até o final de experimento.

A aplicação de ácido húmico promoveu aumento da atividade da NR, comportamento este verificado em ambas as doses testadas de  $\text{N-NO}_3^-$ . Já o tratamento com óxido nítrico promoveu o aumento da atividade da enzima apenas na dose de  $\text{N-NO}_3^-$  mais baixa. A aplicação de NO nas raízes transformadas de manjerição submetidas à dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$  parece ter inibido a atividade da NR. Este fato pode ser devido ao aumento endógeno de NO, nas raízes submetidas à dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$ .

A aplicação exógena de NO elevou os níveis desta molécula no interior das células das raízes transformadas, assim este acúmulo promoveu a redução da atividade da NR. Para ambas as dose de  $\text{N-NO}_3^-$  utilizadas, a coleta realizada 6 horas após o tratamento com as substâncias bioativas e seus respectivos controles promoveram a máxima atividade desta enzima, nas raízes transformadas de manjerição. Vale ressaltar que as raízes transformadas ficaram 72 horas com privação de  $\text{N-NO}_3^-$  no meio de cultura. Isto demonstra que a adição de  $\text{N-NO}_3^-$  no meio de cultura aumentou a atividade da NR em poucas horas.

A aplicação de ácido húmico e de NO nas raízes transformadas aumentaram a atividade desta enzima, em torno de 60 e 50%, respectivamente, sendo estes efeitos mais pronunciados na dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$ . Estes efeitos podem estar associados ao aumento da expressão de genes promovidos por essas substâncias, que dessa forma, aumentam a quantidade desta enzima, logo a atividade.



**Figura 39. Efeito do ácido húmico na atividade da nitrato redutase de raízes transformadas de manjeriço durante 24 horas.** Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono L<sup>-1</sup>), SNP) como doador de NO (100μM SNP L<sup>-1</sup> de solução), em dose baixa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5mM) (A) e dose alta de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0mM) (B), coletadas após o tratamento com as substâncias bioativas (tempo 0), às 3; 6; 9; 12 e 24 horas.

Na Figura 40A é possível observar a atividade da NR nas raízes transformadas de manjeriço, tratadas com ácido húmico e NO, em duas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Verificou-se que os tratamentos com ácido húmico possibilitaram maior atividade da NR (aproximadamente 120 e 50% nas doses baixa e alta de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente), em relação aos controles experimentais. Na dose mais baixa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> observa-se que a aplicação de óxido nítrico aumentou a atividade desta enzima, em torno de 100%. Já na dose mais alta de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> houve uma ligeira redução na atividade da NR (aproximadamente 20% do controle). Este comportamento demonstra que a aplicação de NO concomitante a altas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduz a atividade desta enzima, provavelmente pelo acúmulo de NO nos tecidos das raízes transformadas de manjeriço. Este gás (NO) funciona de duas maneiras distintas nos tecidos vegetais, sendo que em pequenas concentrações funciona como estimulante em diversos processos no metabolismo vegetal. Em concentrações mais altas, o NO pode funcionar de maneira antagônica, como por exemplo, atuar como oxidante, promovendo a peroxidação lipídica ou reprimindo a expressão de genes. O provável acúmulo de NO ocasionado neste tratamento pode ser função da maior disponibilidade de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no meio de cultura, e conseqüente redução desta forma nitrogenada para N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, catalisada pela nitrato redutase. A NR é uma das enzimas que podem sintetizar NO endógeno em plantas. Dessa forma, a produção aumentada deste gás no interior das células é devido à maior disponibilidade do precursor (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), e a concomitante aplicação exógena de NO, promoveu o acúmulo deste gás nos tecidos dessas raízes. Esse acúmulo provavelmente promove um controle negativo, ou seja, ocasiona a diminuição da atividade da NR, pelo fato desta enzima perceber a sinalização

promovida por NO. Outra possibilidade é que este acúmulo promova a repressão de genes da NR, reduzindo a sua quantidade no citossol.

A atividade da catalase pode ser vista na Figura 40B. É possível observar que na dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  a atividade desta enzima foi superior a dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$ . Nesta avaliação, verificou-se que a aplicação, tanto de ácido húmico, quanto de óxido nítrico promoveram maior atividade da catalase. Esta enzima catalisa a dismutação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem importante função fisiológica, especialmente no metabolismo oxidante da parede celular. O aumento da atividade desta enzima nos tratamentos com ácido húmico e NO são indicativos de que estas substâncias estão envolvidas nos processos de diferenciação e crescimento celular. Tem sido demonstrado que o NO pode funcionar como molécula sinalizadora na indução de auxina, sinalizando uma cascata de eventos bioquímicos para promoção do crescimento de raízes adventícias (LANTERI et al. 2006), também sendo reportada a atuação de NO na formação de raízes laterais (HUANG et al., 2007). Existem fortes indícios de que os efeitos promovidos pelo ácido húmico sejam dependentes do NO.

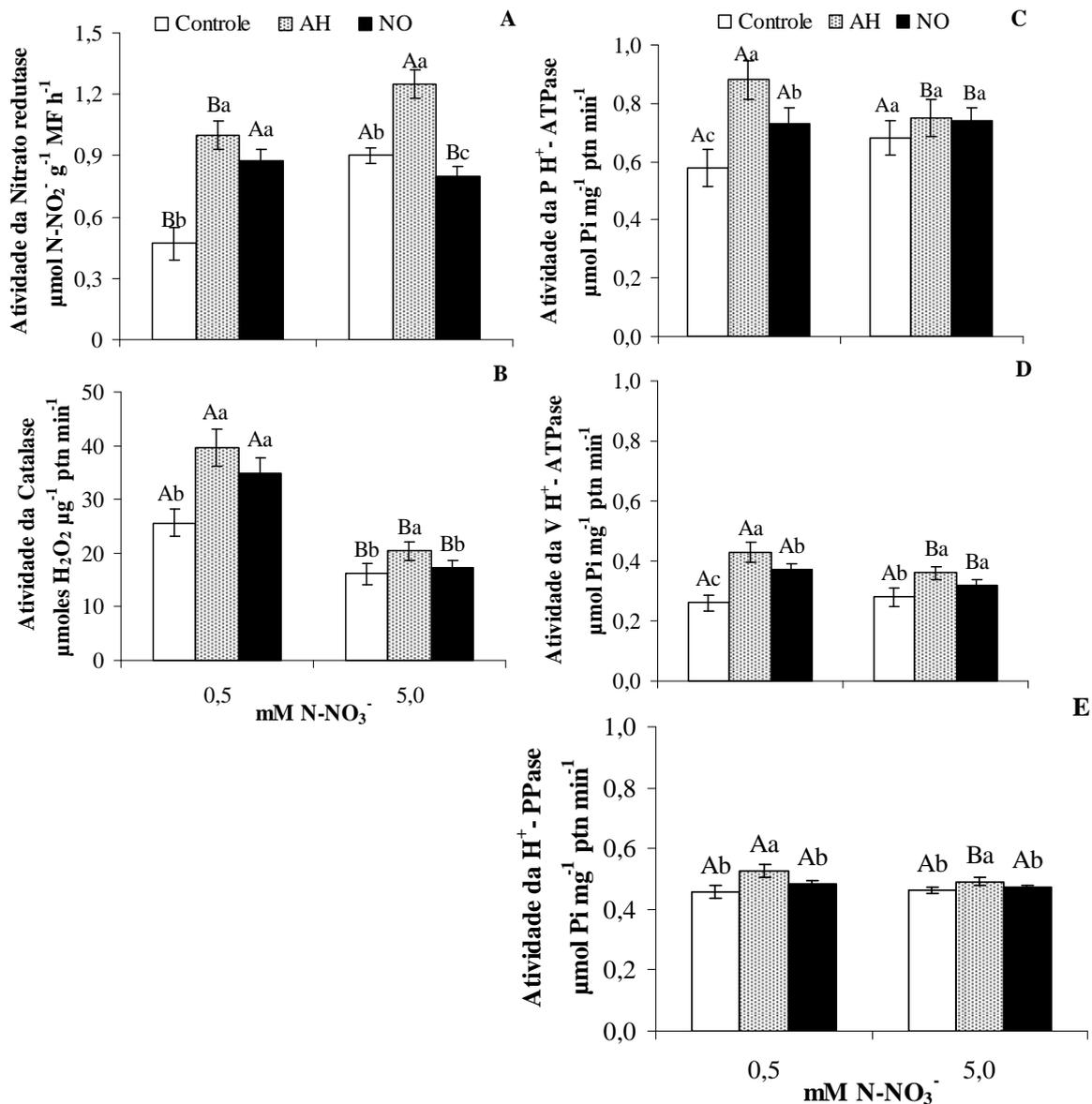
Na Figura 40C verifica-se a atividade das  $\text{P H}^+$ -ATPases de membrana plasmática de raízes transformadas de manjeriço. A aplicação de ácido húmico e NO no meio de cultura promoveram maior atividade das  $\text{P H}^+$ -ATPases, quando comparados ao controle, na dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  (40 e 20%, respectivamente). Na dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$  não houve diferença significativa entre os tratamentos. O influxo de  $\text{N-NO}_3^-$  é um processo ativo, dependente de um gradiente de  $\text{H}^+$  gerado por  $\text{P H}^+$ -ATPases e membrana plasmática (SANTI et al., 1995) e catalisado por uma combinação de sistemas de transporte de alta e baixa afinidade (HATS e LATS) (FORDE, 2000). A  $\text{P H}^+$ -ATPase é uma enzima chave no estabelecimento do gradiente eletroquímico responsável pela energização da membrana, utilizado para os processos de transporte iônico e de solutos, sendo importante para absorção de nutrientes e carregamento do xilema e floema (DUBY & BOUTRY, 2009).

A atividade das  $\text{V H}^+$ -ATPases nas raízes transformadas de manjeriço podem ser observadas na Figura 40D. A  $\text{V-ATPase}$  é a bomba de prótons predominante nas endomembranas da maioria das células vegetais, tanto em termos de quantidade de proteína como também freqüentemente em atividade. A  $\text{V-ATPase}$  acidifica compartimentos intracelulares e é essencial para muitos processos, incluindo co-transportes, desenvolvimento, e tolerância a estresses ambientais. A atividade desta enzima foi aumentada nos tratamentos com ácido húmico e óxido nítrico, quando comparadas ao controle. Quando se verifica a atividade enzimática desta bomba de prótons nos tratamentos com as substâncias bioativas, nas duas doses de  $\text{N-NO}_3^-$  observa-se que na dose mais baixa de nitrato utilizada, a atividade das  $\text{V H}^+$ -ATPases foram aumentadas nos tratamentos com ácido húmico e NO, em relação a dose mais alta de nitrato. Este aumento na atividade com a utilização das substâncias bioativas pode estar associado ao armazenamento de  $\text{N-NO}_3^-$  nos compartimentos celulares, como o vacúolo, para serem utilizados posteriormente, devido à baixa concentração deste nutriente no meio de cultura.

A atividade das  $\text{H}^+$ -PPases em raízes transformadas de manjeriço, tratadas com ácido húmico e NO, em dois níveis de  $\text{N-NO}_3^-$  são vistas na Figura 40E. Foi observado comportamento semelhante nas duas doses testadas de  $\text{N-NO}_3^-$ , onde a aplicação de ácido húmico aumentou a atividade enzimática. A aplicação de NO não afetou positivamente a atividade desta enzima, quando comparadas aos controles. As prótons pirofosfatases ( $\text{H}^+$ -PPases) são bombas eletrogênicas de prótons que acidificam vacúolos em células vegetais. O substrato para as  $\text{H}^+$ -PPases,  $\text{PPi}$  (composto simples de alta energia), é um subproduto de vários processos metabólicos, como a acetilação da coenzima A, na síntese de ácidos graxos, na aminoacilação do tRNA, na síntese de polipeptídios, formação de ligações fosfodiéster na síntese de polinucleotídios, ativação de açúcares na síntese de polissacarídeos, síntese de nucleotídeos e lipídeos, entre outros (TEODORO, 2004). A atividade das  $\text{H}^+$ -PPases nas

células em crescimento ajuda a conservar o ATP, que é a moeda corrente de energia nas células. O pirofosfato é uma fonte de energia de baixo custo, e dessa forma, pode ser aproveitado na acidificação de vacúolos, atuando no controle da homeostase desta endomembrana.

De acordo com os resultados de atividade das bombas de prótons, a ativação destas pode estar relacionada com a produção de NO mediada por ácido húmico.



**Figura 40. Atividade da Nitrato Redutase (A), Atividade da Catalase (B), Atividade das Bombas de Prótons [P H<sup>+</sup>-ATPase (C); V H<sup>+</sup>-ATPase (D); H<sup>+</sup>-PPase (E)] de raízes transformadas de manjericão coletadas 6 horas após a adoção dos tratamentos. Controle (sem ácido húmico ou SNP); AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono L<sup>-1</sup>), SNP) como doador de NO (100μM SNP L<sup>-1</sup> de solução), tratadas com uma dose baixa de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5mM) e dose alta de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0mM).**

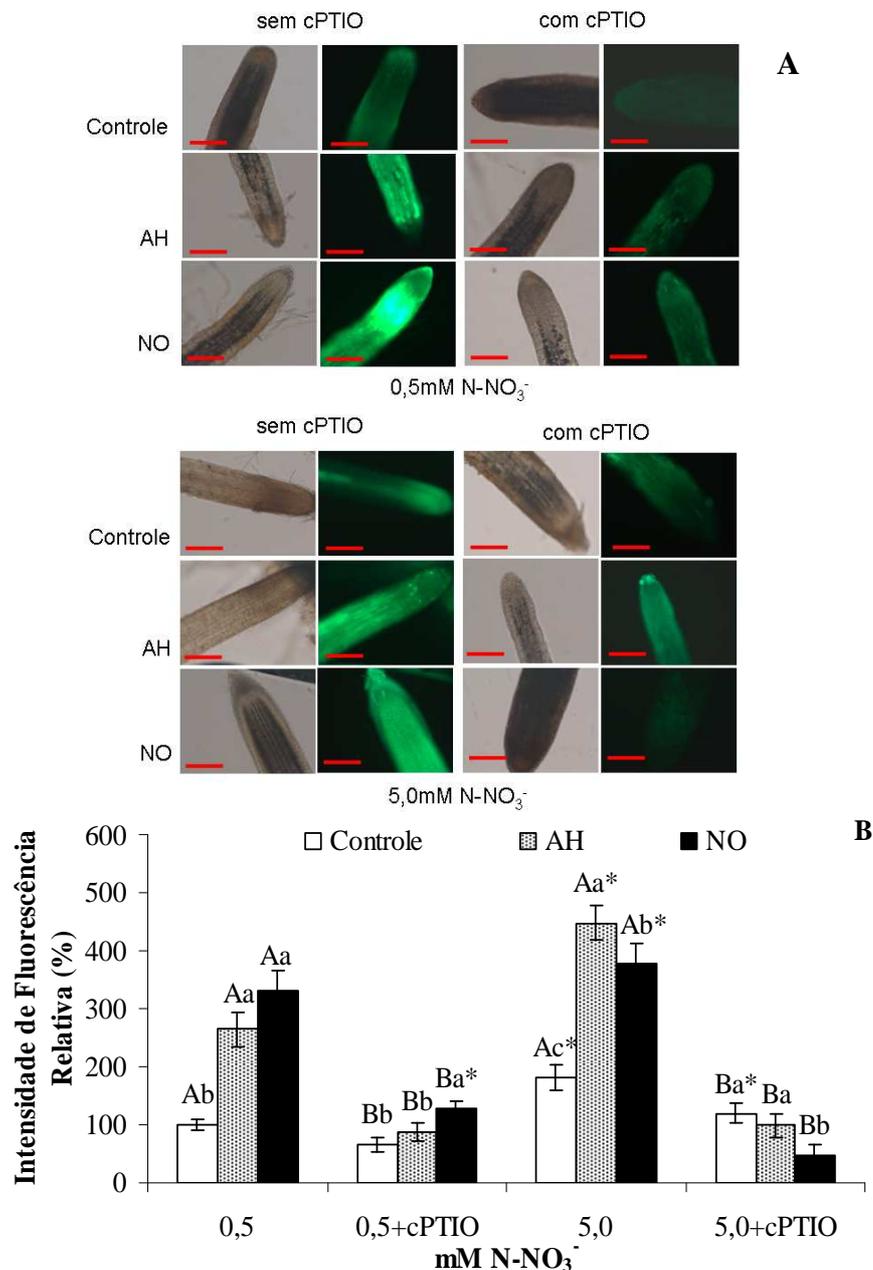
Letras maiúsculas iguais entre de as dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e letras minúsculas iguais dentro da dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão. (n = 4).

A histolocalização *in vivo* de NO nas raízes transformadas de manjeriço incubadas por 6 horas podem ser observadas na Figura 41. A emissão de fluorescência de NO endógeno foi observada nas duas doses de  $\text{N-NO}_3^-$  testadas. A aplicação de ácido húmico e de NO aumentaram a emissão de fluorescência, sendo que na dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$ , as raízes testadas com ácido húmico apresentaram aumentos em torno de 180% de fluorescência e no tratamento com NO houve aumentos de 250%, ambos em relação ao controle.

Comportamento semelhante foi observado nos tratamentos com a dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$ , sendo estes aumentos na ordem de 380 e 300% para o ácido húmico e NO, respectivamente. A aplicação do sequestrador cPTIO promoveu uma redução na emissão de fluorescência, na ordem de 40%, nas doses de  $\text{N-NO}_3^-$  testadas. , quando comparados aos tratamentos sem sequestrador. Para os tratamentos com as substâncias bioativas, o sequestrador de NO reduziu a emissão de fluorescência em 200 e 220% nos tratamentos com ácido húmico e NO, respectivamente, na dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$ , e na dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$ , o cPTIO promoveu uma redução de emissão de fluorescência de 350% para o ácido húmico e 250% para o NO. Verificou-se que a adição de cPTIO não sequestrou totalmente os níveis de NO, apesar de uma redução significativa comparada aos respectivos tratamentos sem este composto. Esta manutenção nos níveis de NO pode ser devido a produção endógena de auxina, que é maior do que em raízes não transformadas. Um aumento transiente na concentração de NO pode ser induzido por auxinas (OTVÓS et al., 2005), numa cascata de eventos bioquímicos que culminam no crescimento radicular, e, portanto sendo observado na microscopia de fluorescência.

A indução de sítios mitóticos promovida por ácido húmico e NO parecem estar relacionados com uma ativação da  $\text{H}^+$ -ATPase nos primórdios radiculares (ZANDONADI et al. 2007; CANELLAS et al. 2002). A ativação das bombas de prótons pode estar relacionada com a produção de NO mediada por ácido húmico, onde os sítios mitóticos precursor de raízes laterais são ricos em  $\text{P H}^+$ -ATPases de membrana plasmática (MORIAU et al., 1999), e o aumento da atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase promove um aumento da atividade da  $\text{P H}^+$ -ATPases de membrana plasmática e também do transporte de auxina, ambos relacionados ao aumento do número de primórdio radiculares (LI et al., 2005). Diante dessas evidências, sugere-se que o NO esteja envolvido no crescimento e indução de raízes, atuando na ativação de enzimas, como as bombas de prótons e promoção na absorção de  $\text{N-NO}_3^-$  induzidos pelo ácido húmico.



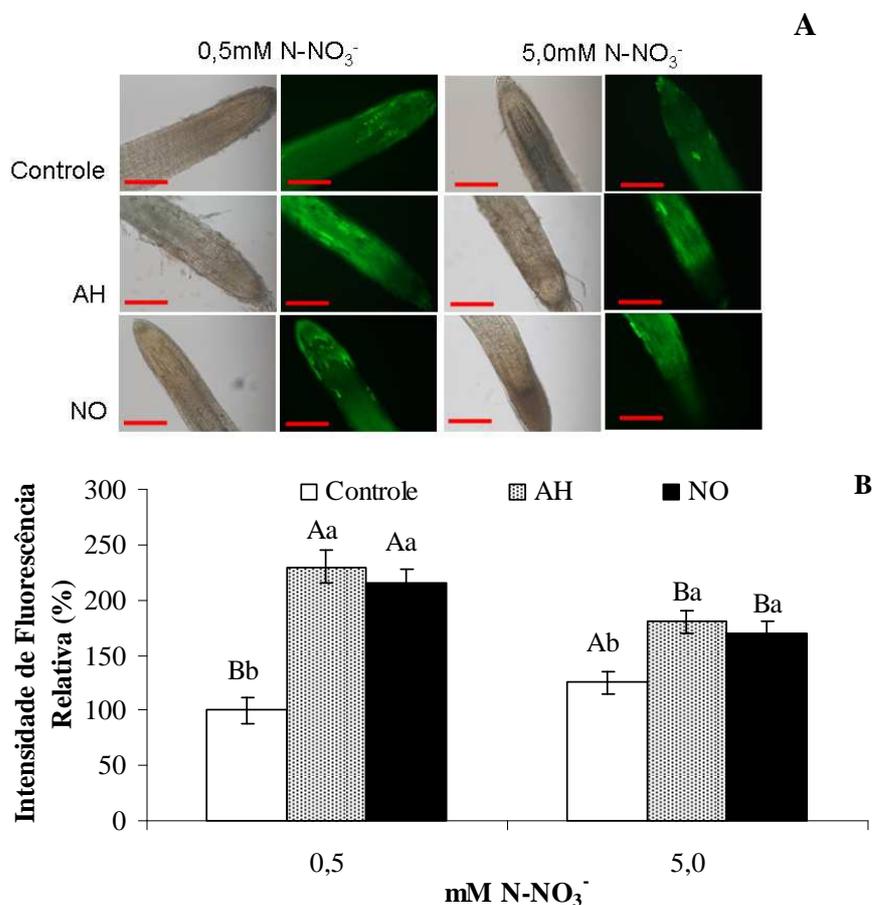
**Figura 41. Efeito da incubação com AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono L<sup>-1</sup>) e SNP) como doador de NO (100µM SNP L<sup>-1</sup> de solução) nos níveis endógenos de NO em ápice radicular de raízes transformadas de manjericão. Raízes crescidas em baixa (0,5mM) ou alta dose (5,0mM) de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 6 horas, em tratamentos com ou sem o sequestrador cPTIO. (A) - Imagens em campo claro e escuro obtidas em microscópio, com a escala de barras = 200µm, utilizando a sonda fluorescente DAF-FM-DA, específica para NO. (B) - Intensidade de Fluorescência Relativa em ápice radicular, expressas como número de pixels relativo.**

Em (B) letras maiúsculas iguais entre a presença e ausência de cPTIO na dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, letras minúsculas iguais dentro da dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e o símbolo \* entre as doses (com ou sem cPTIO) não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ).

Barras verticais indicam erro padrão. (n = 6).

O efeito dos tratamentos ácido húmico e NO submetidos à dose baixa e alta de  $\text{N-NO}_3^-$  na histolocalização *in vivo* de espécies reativas de oxigênio (ROS), em raízes transformadas de manjeriço pode ser observada na Figura 42.

Observa-se que nos tratamentos tratados com as substâncias bioativas promoveram aumentos na emissão de fluorescência de ROS, para as duas doses de  $\text{N-NO}_3^-$  testadas, na ordem de 150%, em relação ao controles na dose mais baixa de  $\text{N-NO}_3^-$  e aproximadamente 80% na dose mais alta de  $\text{N-NO}_3^-$ . As ROS funcionam como mensageiros secundários para a sinalização hormonal (CHO et al., 2009) e são geradas nos processos de diferenciação e crescimento celular, como também na regulação do crescimento. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é uma espécie reativa de oxigênio que pode reagir no apoplasma, para formar o radical hidroxil, que é responsável pela clivagem de polissacarídeos, resultando no relaxamento da parede celular e conseqüente crescimento da célula.



**Figura 42. Efeito da incubação com AH-Ácido Húmico extraído de Organossolo Háplico (3mM de Carbono  $\text{L}^{-1}$ ) e SNP) como doador de NO (100 $\mu\text{M}$  SNP  $\text{L}^{-1}$  de solução) nos níveis endógenos de ROS (espécies reativas de oxigênio) em ápice radicular de raízes transformadas de manjeriço. Raízes crescidas em baixa (0,5mM) ou alta dose (5,0mM) de  $\text{N-NO}_3^-$  por 6 horas, em tratamentos com ou sem o sequestrador cPTIO. (A) - Imagens em campo claro e escuro obtidas em microscópio, com a escala de barras = 200 $\mu\text{m}$ , utilizando a sonda fluorescente  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  específica para  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (B) - Intensidade de Fluorescência Relativa em ápice radicular, expressas como número de pixels por área.**

Em (B) letras maiúsculas iguais entre as dose de  $\text{N-NO}_3^-$  e letras minúsculas iguais dentro da dose de  $\text{N-NO}_3^-$  não diferem entre si pelo teste de Scott Knot ( $p \leq 0,05$ ) Barras verticais indicam erro padrão. (n = 6).

## 5. DISCUSSÃO GERAL

Muitos fatores podem afetar o crescimento e desenvolvimento das raízes das plantas. A disponibilidade de água, luz e nutrientes são exemplos de fatores externos que influenciam este crescimento (LEYSER e FITTER 1998). A adaptação e sobrevivência das plantas a condições adversas podem estar diretamente relacionadas à habilidade do sistema radicular de responder a esses fatores. As raízes podem se adaptar a condições adversas, devido à plasticidade destes órgãos da planta, que são capazes de induzir a iniciação de primórdios radiculares, emitindo raízes laterais e adventícias, que desta forma podem explorar os recursos do ambiente (LYNCH, 1995). Esta resposta fisiológica é mediada por mudanças no balanço hormonal das plantas. Dentre os hormônios vegetais, as auxinas merecem destaque, visto que este fitormônio tem papel fundamental e promove respostas para uma grande variedade de sinais externos (NOCTOR & FORDE, 1998).

Segundo Zandonadi e colaboradores (2010), a matéria orgânica do solo contém auxinas, especialmente o ácido indol-3-acético (AIA), que é a forma química mais abundante na natureza. Essas moléculas de AIA já foram identificadas na estrutura de algumas frações da matéria orgânica, como os ácidos húmicos, por diferentes grupos de pesquisa, utilizando-se de métodos de detecção variados (MUSCOLO et al., 1999; CANELLAS et al., 2002).

A atuação da auxina no desenvolvimento radicular é bastante estudada (CASIMIRO et al. 2003). As raízes laterais se originam de células maduras do periciclo da raiz. A sinalização desencadeada pela auxina leva a divisão das células do periciclo, formando-se sítios mitóticos, precursores de raízes laterais (DE SMET et al., 2006; ZANDONADI et al., 2007). O controle da arquitetura e morfologia das raízes não é influenciado somente pela auxina produzida pelas plantas. A indução de raízes laterais por auxinas exógenas é um fenômeno natural, uma vez que este hormônio está presente no ambiente em diferentes formas, inclusive associado às substâncias húmicas (NARDI et al., 2000; CANELLAS et al., 2002). O reconhecimento de auxinas exógenas associadas aos ácidos húmicos em receptores específicos nas células de raízes promove uma cascata de eventos bioquímicos de ativação/repressão gênica que culminam com a promoção do crescimento de raízes (CANELLAS et al., 2010).

Dessa forma, já é consenso no meio científico que os ácidos húmicos apresentam moléculas bioativas, análogas a auxinas, que podem estar fracamente unidas à supra-estrutura das substâncias húmicas e serem liberadas para a solução do solo e para a absorção das plantas por uma simples variação de pH na interface das raízes decorrentes da exsudação de ácidos orgânicos (DOBBSS et al., 2008). Assim, os ácidos húmicos e seus domínios hidrofóbicos podem atuar como um reservatório de compostos químicos capazes de promover a liberação de determinados componentes de acordo com sinais químicos emitidos entre a planta e seu ambiente de crescimento. O produto desta interação causa alterações físico-químicas no ambiente radicular externo, que, por conseguinte promovem alterações estruturais nas partículas supra-estruturais dos ácidos húmicos. Tais alterações, podem supostamente gerar subunidades/fragmentos de baixo peso molecular, potencialmente capazes de induzirem alterações no metabolismo celular de plantas (CANELLAS et al., 2008).

Embora os detalhes moleculares que respondem pelas alterações fisiológicas na planta sejam pouco explorados, tais subprodutos de baixo peso molecular podem ser reconhecidos por receptores presentes na plasmalema ou mesmo de modo não conhecido serem internalizados (via apoplasto/simplasto) e elicitarem respostas em nível celular, eventos de transcrição e transdução específicos, resultando em alterações estruturais e fisiológicas na planta (DOBBSS et al., 2007). Estes efeitos são refletidos na aceleração das taxas de crescimento radicular, incremento de biomassa vegetal e alterações na arquitetura do sistema

radicular, o que resulta em aumento da área superficial e, ou, no comprimento do sistema radicular (MARQUES JUNIOR et al., 2008).

No Experimento 2 foram observados aumentos crescentes no número de sítios mitóticos, área e comprimento de raízes transformadas de manjeriço, assim como a área de pH rizosférico, sendo estes efeitos promotores de crescimento radicular dependentes da dose de ácido húmico adotada no meio de cultura. A dose de 3mM de Carbono L<sup>-1</sup> de meio de cultura foi a dose-resposta que promoveu maiores incrementos de crescimento estudados, servindo de parâmetro para os estudos realizados nos Experimentos 3 e 4.

Embora as bases celulares e moleculares da ação de ácidos húmicos não estejam totalmente esclarecidas, estudos apontam para uma estimulação da atividade e promoção da síntese das enzimas H<sup>+</sup>-ATPases da membrana plasmática, num efeito tipicamente auxínico (PINTON et al., 1999; CANELLAS et al., 2002; QUAGGIOTTI et al., 2004).

É conhecido que o gás NO desempenha um papel central na determinação da morfologia e no padrão de desenvolvimento de raízes (LOMBARDO et al., 2006). As primeiras evidências acerca da participação do NO no desenvolvimento de raízes induzido por auxina foram providas por Gouvêa e colaboradores (1997). O acúmulo de NO em resposta ao tratamento com auxina foi mostrado por Pagnussat e colaboradores (2002) em enxertos de pepino durante a formação de raízes adventícias.

A aplicação de auxina em raízes resultou na produção localizada de NO durante a formação de raízes laterais, assim como o acúmulo assimétrico de NO no ápice da raiz durante a resposta gravitrópica (CORREA-ARAGUNDE et al., 2004; LOMBARDO et al., 2006). A formação de raízes laterais e adventícias, bem como a resposta gravitrópica da raiz foi prevenida pela aplicação do seqüestrador de NO, o cPTIO, sugerindo uma importante função do NO endógeno mediando estes processos (PAGNUSSAT et al., 2002).

Dessa forma, foi proposto o uso de concentrações crescentes de SNP, um doador de NO, no Experimento 2, a fim de avaliar a melhor dose-resposta desta molécula, no que tange os parâmetros de crescimento de raízes transformadas de manjeriço. A dose de 100µM de SNP L<sup>-1</sup> no meio de cultura proporcionou aumentos significativos de área e comprimento radicular, assim como número de sítios mitóticos e área de pH rizosférico, (Figuras 18 e 28) sendo portanto a dose proposta em experimentos posteriores (Experimentos 3 e 4)

Verificou-se que os parâmetros de crescimento radicular foram modificados pelo ácido húmico e NO, de maneira semelhante. O doador de NO, SNP, foi utilizado como controle positivo, visto que já é conhecido que o mesmo atua no crescimento radicular (CASIMIRO et al., 2004) Foi observado o aumento no número sítios mitóticos, área e comprimento radicular e área de pH rizosférico, nos tratamentos com as substâncias bioativas, o que sugere a relação com a ativação das P H<sup>+</sup>-ATPases de membrana plasmática (Figuras 18 a 28).

Posteriormente foram realizados mais dois experimentos, com a finalidade de estudar os efeitos da aplicação do ácido húmico e do NO nas raízes transformadas de manjeriço tratadas com baixo (0,5mM) e alto (5,0mM) suprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Avaliou-se o metabolismo do nitrogênio, o incremento de comprimento radicular, a atividade da bomba de prótons e metabolismo oxidante (através da atividade da catalase), assim como a histolocalização *in vivo* de NO e ROS.

No Experimento 3 foi possível observar que os tratamentos com ácido húmico afetou positivamente todos os parâmetros avaliados, nas duas doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> estudadas. Nos tratamentos com NO os resultados foram semelhantes aos tratamentos com ácido húmico, ou seja, afetaram positivamente os parâmetros avaliados, apenas diferindo na avaliação da atividade da NR com a dose mais alta de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que foi reduzida neste tratamento. Este resultado indica o papel regulatório do NO na atividade da NR, que é dependente do nível de

$\text{N-NO}_3^-$  aplicado no meio de cultura, sendo estes resultados corroborados por Jin e colaboradores (2009), que verificaram comportamento semelhante em raízes de tomateiro.

Os tratamentos com ácido húmico e NO influenciaram positivamente o metabolismo do nitrogênio, avaliadas pelas frações solúveis (teores de  $\text{N-NO}_3^-$ ,  $\text{N-NH}_4^+$ , N-amino livre, açúcares solúveis) e nas atividades das enzimas NR, da Glutamina Sintetase (GS) e bombas de prótons ( $\text{P-H}^+$ -ATPases,  $\text{V-H}^+$ -ATPases e  $\text{H}^+$ -PPases) nas raízes transformadas de manjeriço (Figuras 29 a 38). Os teores das frações solúveis e atividades da NR e GS foram mais expressivos na avaliação aos 5 dias após a montagem do experimento, o que pode ser em decorrência a um maior estímulo proporcionado inicialmente pelas substâncias bioativas testadas.

A NR é uma enzima de grande importância no metabolismo de nitrogênio em plantas, pois constitui uma etapa-chave na via de assimilação do nitrogênio (SODEK, 2004). O processamento dessa via metabólica implica, em pelo menos, no consumo energético de 8 elétrons e na geração de  $\text{N-NH}_4^+$ , o que representa considerável dreno de energia metabólica. Todos os processos que se destinam à assimilação de N implicam em grande demanda metabólica de energia (ATKINA et al., 2000).

O influxo de  $\text{N-NO}_3^-$  é um processo ativo, dependente de um gradiente de prótons gerado por  $\text{H}^+$ -ATPases (SANTI et al., 1995) e catalisado por uma combinação de sistemas de transporte de alta e baixa afinidade (HATS e LATS) (FORDE, 2000; GALVÁN & FERNANDES, 2001). As células podem investir cerca de 50% das reservas energéticas para a manutenção de gradientes iônicos através de membranas (NELSON, 1994). Com isso, a redução dos níveis de  $\text{N-NO}_3^-$  pode resultar em diminuição do consumo de energia sob a forma de açúcares solúveis, o que resulta no seu acúmulo, sendo este o comportamento observado na coleta realizada aos 5 dias (Figuras 26B e 28B)

Os sistemas de absorção de nitrato de alta afinidade atuam sob concentrações de nitrato abaixo de 0,5mM no meio externo e sofrem controle negativo pelos produtos da assimilação do nitrato, dessa forma uma alta redução deste composto nessas condições pode resultar em uma baixa eficiência na absorção deste íon quando sob baixa concentração.

Os resultados encontrados neste experimento demonstram que parte do  $\text{N-NO}_3^-$  absorvido foi reduzido a  $\text{N-NH}_4^+$  e o excesso foi armazenado nos vacúolos. A atividade da NR reflete a circulação do nitrato no citossol das células, que não são influenciadas pelo  $\text{N-NO}_3^-$  acumulados no vacúolo (COOKSON et al., 2005). Dessa forma, independentemente da concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  do meio externo, a concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  no citossol foi semelhante para as duas doses de  $\text{N-NO}_3^-$  testadas, e o excesso de  $\text{N-NO}_3^-$  absorvido pôde ser armazenados nos vacúolos (Figura 25).

A GS é uma enzima limitante do crescimento e do uso do N nas plantas (LAM et al., 1995). Na atividade da GS, que é uma das vias responsáveis pela assimilação do  $\text{N-NH}_4^+$ , foi determinada elevada atividade desta enzima nas duas avaliações realizadas, principalmente nos tratamentos com a aplicação de ácido húmico e NO, nas duas doses de  $\text{N-NO}_3^-$  testadas (Figura 26).

O nitrato age sinalizando alterações no metabolismo da célula (SITT et al., 2000), podendo desta forma induzir ou reprimir genes de diferentes rotas metabólicas. Dentre as vias metabólicas que sofrem estímulo pelo nitrato estão algumas enzimas do metabolismo de carbono e de ácidos orgânicos. Dessa forma, a relação entre a atividade da glutamina sintetase e os teores de açúcares solúveis provavelmente está ocorrendo pelo aumento no metabolismo de ácidos orgânicos e produção de 2-oxoglutarato, que é o ácido orgânico usado na síntese de glutamina pela GS (SITT et al., 2000).

O  $\text{N-NH}_4^+$  é utilizado na síntese de dos aminoácidos glutamina e glutamato, que servem de doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas. A assimilação do  $\text{N-NH}_4^+$  pode ocorrer através de duas vias, sendo que a principal delas envolve duas enzimas: a GS e a

glutamato sintase (GOGAT), a segunda via envolve a enzima glutamato desidrogenase (GDH). A primeira via, GS-GOGAT, é a principal responsável pela assimilação de  $\text{N-NH}_4^+$  em condições limitantes deste composto e a segunda via, GDH, tem maior funcionalidade quando a concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  é alta, pois a GDH possui uma afinidade relativamente baixa com este composto (MERRICK & EDWARDS, 1995). Foi observado inicialmente (aos 5 dias – Figura 26) maior teor de  $\text{N-NH}_4^+$  nos tecidos das raízes transformadas de manjeriço, assim como a atividade da GS, demonstrando que nos primeiros dias de experimento ocorre uma elevada demanda de  $\text{N-NH}_4^+$ , para serem incorporados em aminoácidos e assim a construção de proteínas necessárias nas reações de biossíntese.

Elevados teores de N-amino livre podem ter contribuído para o acúmulo de  $\text{N-NO}_3^-$  nos tecidos de raiz, uma vez que estudos têm demonstrado que o  $\text{N-NO}_3^-$  e os produtos da sua redução influenciam sua aquisição e redução Souza et al. (1999). Este comportamento foi verificado principalmente aos 15 dias de experimento, demonstrando que inicialmente (aos 5 dias) as raízes transformadas utilizavam mais prontamente o  $\text{N-NO}_3^-$  absorvido nas reações de assimilação e que posteriormente poderiam acumular uma quantidade no vacúolo para no futuro utilizar esta reserva.

Uma vez que a disponibilidade de açúcares está correlacionada com a demanda energética elevada, as raízes transformadas possivelmente podem utilizar essa energia para os demais processos metabólicos. Além disso, a redução dos níveis de açúcares solúveis implica em fosforilação da NR, resultando na inativação dessa enzima (KAISER & HUBER, 2001). O pool de açúcares, que podem ou não estarem fosforilados na célula são os sinais internos que regulam as proteínas quinase e fosfatase, determinantes do estado de ativação da NR, baseando-se na observação de que a desfosforilação artificial da NR resultou em maior atividade dessa enzima no escuro (HUBER & KAISER, 1996). O que também pode estar ocorrendo é o desvio de esqueletos de carbono para as reações de síntese de aminoácidos e proteínas estruturais, principalmente na coleta realizada aos 15 dias.

A estreita correlação entre o metabolismo de nitrogênio e do carbono nas plantas é relatada há algum tempo em muitos trabalhos. Portanto, uma maior eficiência energética, se traduz quase que obrigatoriamente numa maior eficiência no uso do N, pois os processos de absorção, translocação, redução e remobilização deste nutriente são dependentes de energia metabólica. Há gasto de poder redutor e ATP para as enzimas envolvidas nesses processos.

O crescimento e desenvolvimento de raízes são altamente responsivos a disponibilidade de nutrientes (ZHANG & FORDE, 2000). A acessibilidade e entrada de N são consideradas como fatores que mais afetam o crescimento de plantas (LEA & AZEVEDO, 2006).

Espécies como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  e NO tem sido apontadas atuantes no crescimento e proliferação de raízes (BLOOM et al., 2003). Os experimentos realizados neste trabalho constatarem esse comportamento.

Tem sido sugerido que a assimilação de nitrato leva a um aumento do influxo de auxina que então estimula o crescimento de raízes laterais no local de assimilação (SATTELMACHER et al., 1993).

ZHANG e FORDE (1998) encontraram taxas similares de alongamento radicular entre mutantes de *Arabidopsis* sem a NR e plantas normais, indicando que a resposta não é dependente da habilidade da planta em assimilar o  $\text{N-NO}_3^-$ .

Em milho, o aumento nas taxas e frequência de iniciação do alongamento das raízes laterais associado com um suprimento localizado de  $\text{N-NO}_3^-$  foi correlacionado com um aumento no conteúdo endógeno de AIA nas raízes da zona de suprimento do  $\text{N-NO}_3^-$  (SATTELMACHER et al., 1993).

Além de estimular o crescimento radicular quando sob suprimento localizado, o  $\text{N-NO}_3^-$  também exerce um efeito inibitório sobre o alongamento de raízes laterais (ZHANG et

al., 1999; ZHANG & FORDE, 2000). Esta inibição que não afeta as raízes primárias foi primeiro notada quando altas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $>10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foram aplicadas ao sistema radicular de *Arabidopsis*. Estes mesmos autores afirmam que existem evidências sugerindo que o acúmulo de nitrato dentro da planta tem um importante papel na inibição do desenvolvimento de raízes laterais.

Segundo Zhang & Forde (2000), existem fortes evidências fornecidas por diversos estudos de que as raízes podem perceber a presença do nitrato no ambiente e usar isto como sinal para modular a expressão de genes. Os genes para NR em plantas são rapidamente induzidos pelo nitrato, sendo esta indução muito rápida (dentro de minutos) e não dependente da síntese de novas proteínas (GOWRI et al., 1992). Uma forma de NR ligada à membrana plasmática (PM-NR) que é bastante distinta da forma citossólica e está localizada na superfície da face externa da membrana plasmática tem sido indicada como um possível sensor de  $\text{N-NO}_3^-$  (FORDE, 2002). Uma enzima ligada à membrana que catalisa a redução do  $\text{NO}_2^-$  a NO foi descoberta há poucos anos em raízes de tabaco (STÖHR et al., 2001). Este mesmo autor sugere que esta enzima, nitrito:NO-redutase, pode atuar em conjunto com a PM-NR para converter o  $\text{N-NO}_3^-$  externo em NO, que poderia prontamente passar através da membrana plasmática e atuar como um intermediário na sinalização pelo  $\text{N-NO}_3^-$ .

O envolvimento do NO na promoção do crescimento de raiz foi observado por GOUVEIA e colaboradores, (1997). Eles mostraram que o NO induziu o alongamento celular pelas mesmas rotas metabólicas que as auxinas. PAGNUSSAT e colaboradores (2002) verificaram um aumento transiente na concentração de NO, mostrando ser esse efeito envolvido no desenvolvimento de raízes induzido por AIA e que atua posteriormente a sinalização da auxina, pelo acúmulo de cGMP.

O mecanismo de ação dos ácidos húmicos opera em parte pela via de sinalização de auxina, sendo recentemente proposto que outras moléculas podem também estar atuando, como as dependentes da percepção de etileno (QUAGGIOTTI et al., 2004; DOBBS et al., 2007; TREVISAN et al., 2009).

Neste trabalho as raízes tratadas de ácido húmico apresentaram comportamento semelhante ao tratamento com NO, visto os resultados das análises realizadas, sugerindo que o mecanismo de ação dos ácidos húmicos são dependentes das vias de sinalização auxínica. A indução de crescimento e promoção de sítios mitóticos parecem estar relacionadas a ativação das bombas de prótons, pela geração de NO endógeno, mediada pelo ácido húmico (Figuras 32, 33, 34, 35 e 37). LI e colaboradores (2005) verificaram que a superexpressão de  $\text{H}^+$ -PPase promove um aumento da atividade da  $\text{H}^+$ -ATPases de membrana plasmática e do transporte de auxina, ambos relacionados ao aumento no número de primórdios radiculares. Os genes que expressam as  $\text{H}^+$ -ATPase são responsáveis pela sinalização do alongamento celular respondem a mudanças na concentração de auxina no interior da célula.

A acidificação do apoplasto devido ao aumento da atividade e expressão da  $\text{H}^+$ -ATPase, sinalizada por auxina é um dos mais importantes processos celulares promotores do crescimento vegetal (HAGER et al., 1991; FRÍAS et al., 1996), onde o ácido húmico apresenta respostas similares ao mecanismo auxínico.

Tradicionalmente, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido considerada parte da explosão oxidativa em situações danosas às plantas (FORDE & NOCTOR, 2005). Entretanto, evidências adquiridas recentemente demonstram papéis específicos das ROS na regulação do crescimento e sinalização celular nas plantas (FOREMAN et al., 2003; CÓRDOBA-PEDREGOSA et al., 2007).

Milles & Fry (2001) propõem que o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma ROS, pode reagir para formar o radical hidroxil no apoplasto e ser responsável pela clivagem de polissacarídeos, resultando no relaxamento da parede celular. Foreman e colaboradores (2003) sugerem que a acumulação de ROS são requeridas para o crescimento de raiz, as quais funcionam como

mensageiros secundários para a sinalização hormonal (CHO & COSGROVE, 2002). Estudos recentes revelam que as ROS, particularmente o  $H_2O_2$ , são sensíveis à suplementação de N, sendo esta ROS envolvida no crescimento de raiz dependentes dos níveis de  $N-NO_3^-$  (SCHACHTMAN & SHIN, 2007).

O  $H_2O_2$  produzido na célula tem importante função fisiológica, especialmente no metabolismo oxidante da parede celular, pois estas espécies reativas sinalizam a atividade das enzimas que promovem o afrouxamento da parede celular, como as celulases, hemicelulases, glucanases e pectinases, atuando no crescimento das células vegetais (RODRIGUES-SERRANO et al., 2006; COSGROVE, 1997). Dessa forma, a atividade da catalase é um indicativo dos processos de diferenciação e crescimento das células de raiz. Elevada atividade da catalase foi observada nos experimentos (Figura 31), sendo este desempenho mais significativo nos tratamentos com a dose mais baixa de  $N-NO_3^-$ . A atividade da catalase pode ser correlacionada com os níveis de  $H_2O_2$  no interior da célula, já que esta enzima catalisa a dismutação do  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$ . Zhao e colaboradores (2007), avaliando a influência da suplementação de nitrato no crescimento de raízes de milho constataram a diminuição dos níveis de  $H_2O_2$  com o aumento da dose de nitrato e que com a redução de  $H_2O_2$ , o crescimento das raízes de milho foi significativamente reduzido, indicando que ROS são necessárias para a promoção do crescimento de raízes e que a dose de nitrato influencia este processo. Os tratamentos com ácido húmico e NO aumentaram a emissão de fluorescência de ROS (Figura 38). Este aumento de ROS pode ter estimulado a expressão de genes da enzima catalase, o que culminou no aumento da atividade desta enzima, para minimizar os efeitos oxidantes das ROS geradas no crescimento radicular. A alta correlação significativa ( $r = + 0,91$ ) entre a atividade da catalase e a emissão de fluorescência de ROS observada no experimento suporta a idéia de que a catalase esteja atuando para minimizar os efeitos oxidantes das ROS, no evento de crescimento radicular.

O crescimento radicular, aliado a geração de ROS observada nos tratamentos com as substâncias bioativas (Figura 36) é indicativo do papel fundamental destas espécies na promoção do crescimento, já que as ROS são responsáveis pela clivagem de polissacarídeos, que resultam no relaxamento da parede celular e conseqüente aumento de tamanho. A parede celular é uma estrutura anatômica dinâmica, que apresenta uma importante função no controle do crescimento celular (POTTERS et al, 2007). O metabolismo de ROS representa um papel decisivo na diferenciação e desenvolvimento celular. Assim, é possível supor que o  $H_2O_2$  produzido devido ao desbalanço oxidativo, possa atuar como mensageiro secundário para a expressão de alguns genes responsáveis pela indução dos processos morfogênicos.

Analisando os resultados do Experimento 4, no qual se avaliaram a atividade da NR, atividade da bomba de prótons, atividade da catalase e a histolocalização *in vivo* de NO e ROS, constatamos que os efeitos proporcionados pelo ácido húmico e NO são rapidamente aumentados, principalmente nos tratamentos com as substâncias bioativas, observando-se já nas 6 primeiras horas a máxima atividade da NR nas raízes transformadas de manjeriço, indicando que os processos de absorção de  $N-NO_3^-$  são rapidamente estabelecidos com a suplementação deste nutriente, lembrando que as raízes transformadas ficaram 72 horas sem a suplementação de N. Comparando os resultados deste experimento com o anterior, verifica-se que o comportamento foi semelhante, porém, os valores das atividades enzimáticas são maiores nas 6 primeiras horas (Figura 39 e 40). Assim especula-se que os efeitos benéficos das substâncias bioativas utilizadas promovam apenas inicialmente seus efeitos, e que ao longo do tempo, os tratamentos com estas substâncias, se igualem aos seus respectivos controles (sem a aplicação de ácido húmico ou NO).

## 6 CONCLUSÕES

- Os tratamentos com ácido húmico e óxido nítrico proporcionaram aumentos no crescimento radicular, área e comprimento nas avaliações realizadas. A concentração de 3mM Carbono L<sup>-1</sup>, presente no ácido húmico, foi a dose resposta que melhor respondeu aos parâmetros de crescimento. Dentre os ácidos húmicos, o proveniente do Organossolo Háptico foi o que apresentou melhores parâmetros de crescimento de raízes.
- Para a curva de calibração do óxido nítrico, as concentrações que melhor influenciaram o crescimento e incremento radicular estão na faixa de 50 a 100µM SNP L<sup>-1</sup>.
- Tanto o ácido húmico quanto o óxido nítrico aumentam a acidificação do pH rizosférico, indicando maior atividade na bomba de prótons, principalmente na dose de 3mM Carbono L<sup>-1</sup> e 50 a 100µM SNP L<sup>-1</sup> respectivamente.
- Os teores das frações solúveis e atividades da NR e GS foram mais expressivos na avaliação aos 5 dias após a montagem do experimento, o que pode ser em decorrência a um maior estímulo proporcionado inicialmente pelo ácido húmico e óxido nítrico, exceto na avaliação do N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, conseqüentemente, estes maiores teores podem ser em decorrência de uma maior absorção inicial resultando em um maior acúmulo de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nos vacúolos.
- Um decréscimo na atividade da Nitrato Redutase foi vista quando no meio de cultura suplementado com a maior dose de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, na presença de NO, o que indica uma inibição da NR, quando suplementada com essa molécula em elevadas doses.
- A indução de crescimento e promoção de sítios mitóticos parecem estar relacionadas a ativação das bombas de prótons, pela geração de NO endógeno, mediada pelo ácido húmico.
- A histolocalização de NO e ROS revelaram que os tratamentos com ácido húmico e óxido nítrico aumentam os níveis endógenos de NO e ROS, propiciando o aumento do crescimento de raízes transformadas de manjeriço e evidenciando a importância destas espécies moleculares nos processos de diferenciação e crescimento celular.
- As raízes transformadas de manjeriço podem ser utilizadas como uma ferramenta biotecnológica no estudo dos efeitos mediados por ácido húmico e NO.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARD, P., CHENG, H., DE GRAUWE, L., DECAT, J., SCHOUTTETEN, H., MORITZ, T., VAN DER STRAETEN, D., PENG, J., AND HARBERD, N.P. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311, 91–94 (2006).
- AHN, S. J.; SIVAGURU, M.; OSAWA, H.; CHUNG, G. C.; MATSUMOTO, H. Aluminum inhibits the H<sup>+</sup>-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiology*, v. 126, p. 1381-1390, 2001.
- ALVAREZ, S.; VALDEZ, L. B.; ZAORNY, T.; BOVERIS, A. (2003) Oxygen dependence of mitochondrial nitric oxide synthase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, (305) p. 771-775.
- APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F. & LOW, P.S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiology* 90:109-116. 1989.
- ATTINÀ, E.; NOSTRO, G.; SIDARI, M.; CACCO, G. Changes in gene structure and its expression induced by humic substances in plant tissues. First Workshop of International Soil Science Society, Working Group, MO, Canada, p. 11-15. 1992.
- AZEVEDO RA, ALAS RM, SMITH RJ, LEA PJ. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104, 280-292 (1998)
- BAES, A. U.; BLOOM, P. R. Diffuse reflectance and transmission Fourier transformation infrared (DRIFT) spectroscopy of humic and fulvic acids. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 53, p. 695-700, 1989.
- BARRETO, RL.; CORREIA, C.R.D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 6, 1046-1054, 2005
- BÉCARD, G.; FORTIN, J. A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, Oxford, v. 108, p. 211-218, 1988.
- BELIGNI M.V., LAMATTINA L. 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell & Environment* 24: 267–278.
- BELIGNI MV, LAMATTINA L (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215–221
- BELIGNI MV, LAMATTINA L. 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell & Environment* 24: 267–278.
- BENITES, V. de M. Caracterização de solos e de substâncias húmicas em áreas de vegetação rupestre de altitude. 2002. 71 f. Tese (Doutorado).

BENITES, V.M.; MADARI, B.; MACHADO, P. L. O. de A. Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2003. 7 p. (Embrapa Solos. Comunicado Técnico, 16).

BENKOVÁ, E., MICHNIEWICZ, M., SAUER, M., TEICHMANN, T., SEIFERTOVA, D., JURGENS, G., FRIML, J. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115, 591–602, (2003).

BERBARA, R. L. L.; FONSECA, H. M. A. C. Colonização e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.) *Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas*. Lavras, 1996. p. 39-65.

BERNIER, G., HAVELANGE, A., HOUSSA, C., PETITJEAN, A. E LEJEUNE, P. Physiological Signals That Induce Flowering. *The Plant Cell*, 5, 1147-1155, (1993).

BERTOSA, B., KOJIC-PRODIC, B., WADE, R.C., RAMEK, M., PIPERAKI, S., TSANTILI-KAKOULIDOU, A., TOMIC, S. A new approach to predict the biological activity of molecules based on similarity of their interaction Welds and the log p and log d values: application to auxins. *J.Chem. Inf. Comp. Sci.*, 43, 1532–154,1(2003).

BOTTOMLEY, W.B. Some effects of organic-promotion substances (auximones) on the growth of *Lemna minor* in mineral cultural solutions. *Proc. R. Soc. A. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 89:481-505, (1917)

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.

BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P.M.; PARDO, J. M. Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends Plant Science*, v. 3, p. 411-412. 1998.

BREUSEGEM, F.V., VRANOVÁ, E., DAT, J.F. & INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161:405-414. 2001.

BUFFLE J., GRETER F.L., HAERDI W.: Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. *Anal. Chem.* 49:216. 222, 1977.

CACCO G, DELL'AGNOLA G (1984) Plant growth regulator activity of soluble humic complex. *Can J Soil Sci* 64: 225–228

CAMACHO, A.; SANCHEZ-MORENO, R.; LUGO-BERNAL, I (2004). Control of superoxide production in mitochondria from maize mesocotyls. *FEBS Letters* (570) p.52-56.

CANELLAS, L. P. Avaliação de características físico-químicas de ácidos húmicos. 1999. 164 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. (eds.) In: *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes. 309p. 2005.

CANELLAS, L. P.; GURIDI, F.; SANTOS, G. de A.; RUMJANEK, V. M.; BRAZ-FILHO, R. Aumento da resolução de espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  com uso de KCl 0,03 mol L<sup>-1</sup>. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, p. 131-132, 2001.

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<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology* 130, 1951-1957, (2002).

CANELLAS, L.P.; TEIXEIRA JUNIOR, L.R.L.; DOBBS, L.B.; SILVA, C.A.; MÉDICI, L.O.; ZANDONADI, D.B.; FAÇANHA, A.R. Humic acids crossinteractions with root and organic acids, *Ann. Appl. Biol.* 153, 157–166 (2008).

CANTO-CANCHÉ, B.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Chemical from roots, hairy roots, and their application. *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. 1999.

CASIMIRO I., BEECKMAN T., GRAHAM N., BHALERAO R., ZHANG H., CASERO P., SANDBERG G., BENNETT M.J. Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends in Plant Science*. 8, 165–171, (2003).

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*, New York, US., v.6, p.853-855, 1975.

CHEN, Y., AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. In: MacCarthy, P., Clapp, C.E., Malcolm, R.L., Bloom, P.R. (eds) *Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Readings*. Madison, WI: American Society of Agronomy Inc., Soil Science of America, Inc. p. 161-186, (1990).

CHEN, Y., CLAPP, C., MAGEN, H. Mechanism of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 50, 1089-95, (2004).

CHEN, Y., SENESI, N., SCHNITZER, M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 41, p.352-358. 1977.

CHO, H.T., COSGROVE, D.J. (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 3237–3253.

CHRISTIAN, M., STEFFENS, B., SCHENCK, D., LÜTHEN, H. The diageotropic mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. *Planta* 218, 309–314, (2003).

CHUKOV, S.N. Study by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of humic acid and molecular parameters in antropogenically disturbed soil. In: international Meeting of International Substances Society 10, 2000. Toulouse. *Proc. International Humic Substances Society*. v. 2, p. 81-84.

CLAUSSEN, M., LÜTHEN, H., BÖTTGER, M. Inside or outside? Localization of the receptor relevant to auxin-induced growth. *Physiologia plantarum* 98, 861-867, (1996).

- COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. Introduction to infrared and raman spectroscopy. New York: Academic, 1964. 511 p.
- COOKSON SJ, WILLIAMS LE, MILLER AJ. Light–dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in Arabidopsis leaf cells. *Plant Physiology* (2005) 138:1097-1105.
- COONEY, R.V., HARWOOD, P.J., CUSTER, L.J., FRANKE, A.A. (1994). Light-mediated conversion of nitrogen-dioxide to nitric-oxide by carotenoids. *Environ. Health Perspectives* 102, 460-462.
- CORPAS, F.J., BARROSO, J.B., CARRERAS, A., QUIRÓS, M., LEÓN, A.M., ROMERO-PUERTAS, M.C., ESTEBAN, F.J., VALDERRAMA, R. PALMA, J.M., SANDALIO, L.M., GÓMEZ, M. AND DEL RÍO, L.A. (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* 136, 2722-2733.
- CORREA-ARAGUNDE N, GRAZIANO M, LAMATTINA L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218, 900–905 (2004)
- CORREA-ARAGUNDE, N., GRAZIANO, M., CHEVALIER, C., LAMATTINA, L. (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J. Exp. Bot.*, 57: 581–588.
- COSGROVE, D.J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement, *Plant Cell* , 9, 1031–1041, (1997).
- DAVIDSON, L. R. Root system. The forgotten component of pastures. Wilson, J. R. (Ed.). *Plant relation in pastures*. Brisbane: CSIRO, 1978. p. 86-94.
- DAVIES, P.J. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2<sup>a</sup> ed.; Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 899, (1995).
- DE MICHELIS, M. I.; SPANSWICH, R. M. H<sup>+</sup>-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiology*, Rockville, v. 81, p. 542-547, 1986.
- DE SMET, I.; VANNESTE, S.; INZE, D.; BEECKMAN T. Lateral root initiation or the birth of new meristem. *Plant Molecular Biology*. 60, 871–887 (2006).
- DEBRUYNE, I. (1983) Inorganic Phosphate Determination: Colorimetric Assay Based on the Formation of a Rhodamine B-Phosphomolybdate Complex, *Analytical Biochemistry* 130:454-460.
- DELL'AGNOLA G, NARDI S (1987) Hormone-like effect and enhanced nitrate uptake induced by depolycondensated humic fractions obtained from *Allolobofora* and *A. caliginosa* faeces. *Biol Fertil Soils* 4: 115–118
- DELL'AGNOLA G, FERRARI G, NARDI S. 1981. Antidote action of humic substances on atrazine inhibition of sulphate uptake in barley roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 15, 101-104.

- DELLEDONNE, M., XIA, Y.J., DIXON, R.A., LAMB, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588.
- DESIKAN R, HANCOCK JT, BRIGHT J, HARRISON J, WEIR I, HOOLEY R, NEILL SJ. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. *Plant. Physiol.* 137, 831– 834, (2005)
- DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; ESTELLE, M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435, 441–45, (2005).
- DIETZ, K. J.; TAVAKOLI, N.; KLUGE, C.; MIMURA, T.; SHARMA, S. S.; HARRIS, G. C.; CHARDONNENS, A. N.; GOLLDACK, D. Significance of the V type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of experimental Botany*, v. 52, n. 363, p. 1969-1980, 2001.
- DOBBSS, L.B., MEDICI, L.O., PERES, L.E.P., PINO-NUNES, L.E., RUMJANEK, V.M., FAÇANHA, A.R., CANELLAS, L.P. (2007) Changes in root development of Arabidopsis promoted by organic matter from oxisols. *Annu. Appl. Biol.*, 151:199-211.
- DUBY, G., BOUTRY, M. (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Arch.* 457:645–655. During the Reproductive Period in Two Brazilian Rice Varieties. *Journal of Plant Nutrition*,
- DURNER, J., WENDEHENNE, D., KLESSIG, D.F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 10328-10333.
- EDGERTON, M. D., TROPSHA, A., AND JONES, A. M. Modelling the auxin-binding site of auxin-binding protein 1 of maize. *Phytochemistry* 35, 1111–1123, (1994).
- ELENA, A., DIANE, L., EVA, B., MARTA, F., ROBERTO, B., ZAMARREÑO, A.M., GARCIA-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 Physiol. Biochem.*, 47 215–223, (2009).
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília, DF: Embrapa - Serviço de Produção de Informação, 2006. 412 p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos, 5).
- FAÇANHA AR, DE MEIS L (1998) Reversibility of H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiol* 116:1487–1495
- FAÇANHA, A.R., FAÇANHA, A.L.O., OLIVARES, F.L., GURIDI, 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* 37,1301-1310, (2002).

- 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*, 1980.
- FARRIMOND, J. A., ELLIOTT, M. C., AND CLACK, D. W. Charge separation as a component of the structural requirements for hormone activity. *Nature*, 274, 401–402, (1978).
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. *Anal. Chem.*, v.49, 1980, 1977.
- FELLER, C., BEARE, M.H. Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics. In: *Geoderma*, v.79, p.69-116, 1997.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. *Turrialba*, v.34, p.9-18, 1984.
- FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Absorção de nutrientes. In: Fernandes, M. S. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 15-152, 2006.
- FERRER, M.A., ROS-BARCELÓ, A. (1999). Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Environ.* 22, 891-897.
- FLAIG, W. An introductory review on humic substances: aspects of research on their genesis, their physical and chemical properties, and their effect on organisms. In: POVOLEDO, D.; GOLTERMAN, H. L. (Eds.), *Humic substances. Their structure and function in the biosphere*. Proc. Inter. Meeting. Wageningen, The Netherlands. p. 19-42. 1975.
- FLORES T, TODD CD, TOVAR-MENDEZ A. Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant. Physiol.* 147,1936–1946 (2008)
- FLORES, H. E. "Organized root systems for production of specialty chemicals", 9th International Biotechnology Symposium, Crystal City, VA, Aug. 16-21, 1992.
- FONTANA, A. Caracterização química e espectroscópica da matéria orgânica em solos do Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2006. 70p.
- FORDE, B.G. Nitrate transporters: structure, function and regulation, *Biochim. Biophys. Acta* 1465 (2000) 219-235.
- FOREMAN J, DEMIDCHIK V, BOTHWELL JHF, MYLONA P, MIEDEMA H, TORRES MA, LINSTEAD P, COSTA S, BROWNLEE C, JONES JDG. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422,442–446 (2003)
- FOYER CH, NOCTOR G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17:1866-1875.
- FOYER, C.H., LELANDAIA, M. & KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92:696-717. 1994.

FREIXO, A. A. Caracterização da matéria orgânica de latossolos sob diferentes sistemas de cultivo através de fracionamento físico e espectroscopia de infravermelho. 2000. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

FREIXO, A. A.; CANELLAS, L. P. & MACHADO, P. L. O. Propriedades espectrais da matéria orgânica leve-livre e leve intra-agregado de dois latossolos sob plantio direto e preparo convencional. R. Brás. Ci. Solo, 26:445-453, 2002.

FRÍAS, I., CALDEIRA, M.T., PEREZ, C.J.R., NAVARRO, A.J.P., CULIANEZ, M.F.A., KUPPINGER, O., STRANSKY, H., PAGES, M., HAGER, A., SERRANO, R. A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8, 1533-1544, (1996).

FRIML J., YANG X., MICHNIEWICZ, M., WEIJERS D., QUINT A. A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science*, 306, 862-65, (2004).

GABALDÓN C, LÓPEZ-SERRANO M, POMAR F, MERINO F, CUELLO J, PEDREÑO MA, ROS BARCELÓ A. Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. *FEBS Letters* (2005) 580:4311-4316.

GALINA, A.; REIS, M.; ALBUQUERQUE, M.C.; PUYOU, A.G.; PUYOU M.T.G. E DE MEIS, L. (1995). Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *Journal Biochemistry*, (309) p. 105 - 112.

GALVAN A, FERNANDEZ E. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2001) 58:225-233.

GARCÉS, N. P. Características actuales del humus en los principales tipos de suelos de Cuba. Nitra: Universidad de Agricultura de Nitra, 1987. 200 p. Tesis Doctoral.

GIANNINI, J. L.; BRISKIN, D. P. Proton Transport in Plasma-Membrane and Tonoplast Vesicles from Red Beet (*Beta vulgaris* L) Storage Tissue - A Comparative Study of Ion Effects on Delta-pH and Delta-PSI. *Plant Physiology*, Urbana, IL, USA, v. 84, n.3, p.613-618, 1987.

GILLISSEN, B., BÜRKLE, L., ANDRÉ, B., KÜHN, C., RENTSCH, D., BRANDL, B., FROMMER, WB (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 291-300.

GLASS, A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: Physiological constraints upon nitrogen absorption. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.22, n.5, p.453-470, 2003.

GODWIN, I.D., FORD - LLOYD, B.V., NEWBURY, H.J. In Vitro approaches to extending the host - range of *Agrobacterium* for plant transformation. *Aust J Bot*, Melbourne, v. 40, p.751 - 763, 1992.

- GOUVÊA, K.J.; SOUZA, J.F.; MAGALHÃES, C.A.N.; MARTINS, I.S. (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segment. *Plant Regulation* (21), p.183-187.
- GOWRI, G.; KENIS, J. D.; INGEMARSSON, B.; REDINBAUGH, M. G.; CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of maize to environmental nitrate. *Plant Molecular Biology*, v.18, p.55-64, 1992.
- GRAZIANO, M., BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. (2002). Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiol.* 130, 1852-1859.
- GRÜN, S.; LINDERMAYR, S.; DURNER, J. (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany*, (57) n. 3, p. 507-516.
- GUILLOIN S, TREMOUILLAUX-GUILLER J, PATI PK, RIDEAU M, GANTET P (2006). Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends Biotechnol.* 24: 403-409.
- GUMINSKI S (1968) Present days view on physiological effects induced in plant organisms by humic compounds. *Soviet Soil Sci* 9:1250–1255
- HAGEN G, GUILFOYLE T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* 49, 373–85, (2002).
- HAGER, A. Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.*, 116, 483-505, (2003).
- HAGER, A.; DEBUS, G.; EDEL, H. -G.; STRANSKY, H. & SERRANO, R. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high- turnover pool of plasma-membrane H<sup>+</sup> ATPase. *Planta*, 185:527-537, 1991.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford, University Press. 1989.
- HAVIR EA, MCHALE NA. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 1987 Jun;84(2):450–455.
- HOAGLAND DR, ARNON D. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Agricultural Experimental Station Circular* 347. University of California.
- HUANG, S., KERSCHBAUM, H.H., ENGEL, E., HERMANN, A. (1997). Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*. *J. Neurochem.* 69, 2516-2528.
- HUBER SC, KAISER WM (1996) 5-Aminoimidazole-4-carboxiamide riboside activates nitrate reductase in darkened spinach and pea leaves. *Physiol Plantarum* 98: 833–837
- IGNARRO, L. J.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990, 30, 535.

IVANCHENKO, M.G., MUDAY, G.K., DUBROVSKY, J.G. Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55, 335–347, (2008).

JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical Biophysical Res. Commun.*, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.

JOO JH, YOO HJ, HWANG I, LEE JS, NAM KH AND BAE YS. Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett.* 579, 1243–1248 (2005)

JORGE, L. A. C.; CRESTANA, S. SIARCS 3.0: Novo aplicativo para análise de imagens digitais aplicado à ciência do solo. In: XII Congresso Latino Americano de Ciência do Solo; I Reunião Brasileira de Biologia do Solo; IV Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia Do Solo; 1996, Águas de Lindóia, SP. Resumos... Águas de Lindóia, SP: USP/SLCS/SBCS, 1996. 5 p. CD ROM.

KAISER WK, HUBER SC. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany.* 2001;52:1981–1989.

KASAI, M.; SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress increase H<sup>+</sup> efflux and activities of ATP- and PPI- dependent H<sup>+</sup> pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots. *Plant cell physiol.* V.33, p. 1035-1039, 1992.

KASAMO K, YAMANISHI H (1991) Functional reconstitution of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from mung bean (*Vigna radiata* L.) hypocotyls in liposomes prepared with various molecular species of phospholipids. *Plant Cell Physiol* 32: 1219–1225

KEELEY, J. E., C. J. FOTHERINGHAM. 1997. Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science* 276:1248-1250.

KERWIN, J.F.; LANCASTER, J.R.; FELDMAN, P.L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J. Med. Chem.* 38: 4343-4360 (1995).

KING, P. A.; JAMISON, E.; STRAHS, D.; ANDERSON, V. E.; BRENOWITZ, M.; *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 2473.

KLEPPER, L. (1990). Comparison between NO<sub>x</sub> evolution mechanisms of wild type and NR1 mutant soybean leaves. *Plant Physiol.* 93, 26-32.

KÖGEL-KNABER, I. C and N NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. *Geoderma*, Amsterdam, v. 80, p. 243-270, 1997.

KOLBERT Z, BARTHA B, ERDEI L. Osmotic stress- and indole-3-butyric acid-induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* 133, 406–416 (2008)

KONONOVA, M. M. Soil organic matter, its nature, its role in soil formation and in soil fertility. Oxford: Pergamon Press, 1966. p.127-166.

KONONOVA, M. M. Soil organic matter, its nature, its role in soil formation and in soil fertility. Oxford: Pergamon Press, 1966. p.127-166.

KONONOVA, M. M. Soil organic matter. New York: Pergamon Press, 2<sup>a</sup> ed.1966. 555p.

KONONOVA, M.M. Materia Orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación. Barcelona, Oikostau, 1982. 364p.

KOWALTOWSKI, A.; COSTA, A. D.T.; VERCESI, A. (1998). Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. FEBS letters, (425), P.213-216.

KUMADA, K. Chemistry of soil organic matter. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1987. 241 p.

KUZNETSOVA, S., KNAFF, D.B., HIRASAWA, M., LAGOUTTE, B., SÉTIF, P. (2004). Mechanism of spinach chloroplast ferredoxin-dependent nitrite reductase: spectroscopic evidence for intermediate states. Biochem. 43, 510-517.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, p.680-685, 1970.

LAM, H.-M.; COSCHIGANO, K.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; TJADEN, G.; OLIVEIRA, I.; NGAI, N.; HSIEH, M.-H.; CORUZZI, G. Use of arabidopsis mutants and genes to study amide and amino acid biosynthesis. Plant Cell, v.7, p.887-898, 1995.

LAMATTINA L, GARCÍA-MATA, GRAZIANO M, PAGNUSSAT G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. Annual Review of Plant Biology. 2003;54:109–136.

LANTERI ML, PAGNUSSAT GC, LAMATTINA L (2006) Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. J Exp Bot 57: 1341–1351

LAW, R. David and SUTTLE, Jeffrey C. Chromatin remodelling in plant cell culture: patterns of DNA methylation and histone H3w and H4 acetylation vary during growth of asynchronous potato cell suspensions. Plant Physiology and Biochemistry, June 2005, vol. 43, no. 6, p. 527-534.

LAXALT AM, RAHO N, HAVE AT, LAMATTINA L. Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells. J Biol Chem 282, 21160–21168 (2007)

LESHEM, Y.Y., WILLS, R.B.H., KU, V.V.V. (1998). Evidence for function of the free radical gas nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. Plant Physiol. Biochem. 36, 825-833.

LEYSER O. Dynamic integration of auxin transport and signalling. Curr. Biol. (2006) 16:R424–33.

- LI, H.T., SAMOUILOV, A., LIU, X.P., ZWEIER, J.L. (2004). Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J. Biol. Chem.* 279, 16939-16946.
- LI, J., YANG, H., PEER, W. A., RICHTER, G., BLAKESLEE, J. J., BANDYOPADHYAY, A., TITAPIWANTAKUN, B., UNDURRAGA, S., KHODAKOVSKAYA, M., RICHARDS, E. L., KRIZEK, B., MURPHY, A.S., GILROY, S., GAXIOLA, R. (2005). Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin mediated organ development. *Science*, 310:121-125.
- LIMA, W. L.; OLIVEIRA, J. R.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; RAPOSO, T. P.; ALVES, G. C.; SILVA, E. M. R.; BERBARA, R. L. L. Editoração de imagens para avaliação do crescimento de plantas ou microrganismos com o programa SIARCS®. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 2006. 32 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 14). Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/bot014.pdf>
- LIN, H.; SALUS, S.S.; SCHUMAKER, K.S. Salt Sensitivity and the Activities of the H<sup>+</sup>-ATPases in Cotton Seedlings. *Crop Science*, v.37, p.190-197, 1997.
- LJUNG, K., HULL, A.K., CELENZA, J., YAMADA, M., ESTELLE, M., NORMANLY, J. SANDBERG, G. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *The Plant Cell* 17, 1090-1104, (2005).
- LOMBARDO MC, GRAZIANO M, POLACCO J, LAMATTINA L (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* 1: 28–33
- LUO H, MORSOMME P, BOUTRY M (1999) The two major types of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases show different enzymatic properties and confer differential pH sensitivity of yeast growth. *Plant Physiol* 119: 627–634
- MACDONALD H. Auxin perception and signal transduction. *Physiologia Plantarum*. 100, 423–430, (1997).
- MAESHIMA, M. Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica*, Amsterdam, v. 1465, p. 37-51, 2000.
- MAGALHAES, J.R., MONTE, D.C, DURZAN, D. (2000). Nitric oxide and ethylene emission in Arabidopsis thaliana. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 6, 117-127.
- MAGGIONI, A.; VARANINI, Z.; NARDI, S.; PINTON, R. Action of soil humic matter on plant roots: stimulation of ion uptake and effects on (Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>) ATPase activity. *Science of*
- MALAMY, J.E. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.*, 28, 67-77, (2005).  
Managing Agricultural Residues, Boca Raton, Lewis Publishers, p. 41-76,1994
- MARCHANT, A., BHALERAJ, R., CASIMIRO, I., EKLOF, J., CASERO, P.J., BENNETT, M., SANDBERG, G. AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *Plant Cell*, 14, 589–597 (2002).

- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. London: Academic Press. 1995.
- Martins, O.B., and L. DeMeis (1985) Stability and Partial Reactions of Soluble and Membrane-bound Sarcoplasmic Reticulum ATPase, *J Biological Chemistry* 260:6776-6781.
- MATSUOKA, K.; HIGUCHI, T.; MAESHIMA, M.; NAKAMURA, K. A vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell*, v. 9, p. 533-546. 1997.
- MCDOWELL, J.J., DANGL, J.L. (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* 25, 79-82.
- MERRICK, M. J. & EDWARDS, R. A. (1995). Nitrogen control in Bacteria. *Microbiological Reviews*, 59(4): 604-622.
- MICHELET, B.; BOUTRY, M. The plasma membrane H-ATPase. A highly enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol*, v. 108, p. 1-6. 1995.
- MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed). *Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, p. 01-08. 1999.
- MIELNICZUK, J.; BAYER, C.; VEZZANI, F.; FERNANDES, F. F.; DEBARBA, L. Manejo de Solo e culturas e sua relação com estoques de carbono e nitrogênio do solo. *Tópicos em ciência do solo*, Viçosa, MG, V.3, 2003.
- MILLER AJ, SMITH SJ. 1996. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal of Experimental Botany* 300, 843-854.
- MITTLER, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, (7), n.9, p.405-410.
- MODOLO, L.V., CUNHA, F.Q., BRAGA, M.R., SALGADO, I. (2002). Nitric oxide synthase mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. *Plant Physiol*. 130, 1288-1297.
- MORIAU, L., MICHELET, B., BOGAERTS, P., LAMBERT, L., MICHEL, A., OUFATTOLE, M., BOUTRY, M. (1999) Expression analysis of two gene subfamilies encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia* reveals the major transport functions of this enzyme. *Plant J.*, 19: 31-4.
- MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica*, Amsterdam, v. 1465, p. 1-16, 2000.
- MURGIA, I., DELLEDONNE, M., SOAVE, C. (2002). Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 30, 521-528.
- MUSCOLO A, NARDI S. 1999. Effetti di due frazioni umiche sul metabolismo azotato di cellule di *Daucus carota*. In: *Le ricerche di base e le applicazioni delle sostanze umiche alle soglie Del 2000. IV Convegno Nazionale dell' IHSS*, 26-28 Maggio, Alghero, Italy, 103-106.

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* 31, 1303–1311, (1999).

NANNIPIERI, P.; GREGO, S.; DELL'AGNOLA, G.; NARDI, S. Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. In NANNIPIERI, P (Ed.): *Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici & selvicolturali*. Bologna: Patron Editore, 67-78, (1993) (1999).

NAPIER, R.M.; DAVID, K.M.; PERROT-RECHENMANN, C. A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol.Biol.* 49, 339–48, (2002).

NARDI S, CONCHERI G, DELL'AGNOLA G, SCRIMIN P. 1991. Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1341-1346.

NARDI S, CONCHERI G, DELL'AGNOLA G. 1996. Biological activity of humic substances. In: Piccolo A, ed. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 361-406.

NARDI S., PIZZEGHELLO D., GESSA C., FERRARESE L., TRAINOTTI L., CASADORO G. A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry*. 32, 415–419, (2000).

NARDI, S., PANUCCIO, M.R., ABENAVOLI, M.R., MUSCOLO, A. Auxin-like effect of humic substances from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. *Soil Biol. Biochem.*, 26, 1341-1346, (1994).

NARDI, S., TOSONI, M., PIZZEGHELLO, D., PROVENZANO, M.R., CILENTI, A., STURARO, A., RELLA, R., VIANELLO, A. Chemical characteristics and biological activity of organic substances extracted from soils by root exudates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 2012-2019, (2005).

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; RENIERO, F.; MUSCOLO, A. Biological activity of humic substances extracted from soils under different vegetation cover. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v. 30, p. 621-634, 1999.

NEILL SJ, DESIKAN R, HANCOCK J. Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol.* 5, 388-395 (2002)

NELSON, N. (1994). Energizing porters by proton-motive force. *J. exp.Biol.* 196, 7-14. New York, US, v.21, n.10, p.2049-2063, 1998.

NICOMEDES JUNIOR, J. Produção de raízes transformadas por infecção com *Agrobacterium rhizogenes* em diferentes espécies vegetais. 2003. 82 p, Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

NIEMEYER, J.; CHEN, Y.; BOLLAG, J. M. Characterization of humic acids, composts, and peat by diffuse reflectance fourier transform infrared spectroscopy. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 56, p.135-140, 1992.

NIU, X., BRESSAN, R.A., Hasegawa, P.M., 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 109, 715–742.

NOVOTNY, E. H. Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo. 2002. 215 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Carlos.

OKADA K, UEDA J, KOMAKIMK, BELL CJ, SHIMURA Y. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of Arabidopsis floral bud formation. *Plant Cell* 3, 677–84, (1991).

ORLOV, R. Humic acids of soils. Washington, D.C.: USDA: The National Science Foundation, 1985. 378 p.

ÖTVÖS, Krisztina; PASTERNAK, Taras P.; MISKOLCZI, Pál; DOMOKI, Mónika; DORJGOTOV, Dulguun; SZÜCS, Attila; BOTTKA, Sandor; DUDITS, Dénes and FEHÉR, Attila. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant Journal*, September 2005, vol. 43, no. 6, p. 849-860.

PAGNUSSAT G.C.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology*, (129), p.954-956.

PAGNUSSAT GC, LANTERI ML, LOMBARDO MC, LAMATTINA L (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol* 135: 279–286

PALMGREN MG, SOMMARIN M, SERRANO R, LARSSON C (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 266: 20470–20475

PEDROSO, M.C., MAGALHAES, J.R., DURZAN, D. (2000) Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci.* 157, 173-180.

PICCOLO, A. Humus and soil conservation, In: Piccolo, A. Humic substances in terrestrial ecosystems. Amsterdam: Elsevier (1996).

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agr.*, 75, 57-133, (2002).

PINTON R, VARANINI Z, VIZZOTO G, MAGGIONI A (1992) Soil humic substances affect transport-properties of tonoplast vesicles isolated from oat roots. *Plant Soil* 142:203–210

PINTON, R., CESCO, S., LACOLETTIG, G., ASTOLFI, S., VARANINI, Z. Modulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Soil*, 215, 155-161, (1999).

PORTER, W. L., THIMANN, K. V. Molecular requirements for auxin action. Halogenated indoles and indoleacetic acid. *Phytochemistry* 4, 229–243, (1965).

POTTERS, Geert; PASTERNAK, Taras; GUISEZ, Yves; PALME, Klaus J. and JANSEN, Marcel. Strees-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, March 2007, vol. 12, no. 3, p. 98-105

PUGLISI, E.; FRAGOULIS, G.; DELREY, A.M.; SPACCINI, R.; GIGLIOTTI, G.; SAID-PULLICINO D.; TREVISAN, M. Carbon deposition in soil rhizosphere following amendments with soluble fractions, as evaluated by combined soil-plant rhizobox and reporter gene systems, *Chemosphere* 73, 1292–1299 (2008).

PULLMAN, M.E., H.S. PENEFSKY, A. DATTA, AND E. RACKER (1960) Partial triphosphatase. *J. Biological Chemistry* 235:3322-3329.

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.). *J. Exp. Bot.*, 55, 803-813, (2004).

QUINT M, GRAY WM. Auxin signaling. *Curr Opin Plant Biol* 9: 448–453, (2006).

RAO CNR. 1963. Chemical applications of infrared spectroscopy. London: Academic Press.

RATAJCZAK, R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-Translocating ATPase. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1465, p. 17-36, 2000.

RAVEN, PETER H.; EVERT, RAY F.; EICHHORN, SE. *Biologia Vegetal*. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.28, (2001).

RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, Rockville, v. 99, p. 1271-1274, 1992.

REA PA, KIM Y, SARAFIAN V, POOLE RJ, DAVIES JM, SANDERS D (1992) Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends Biochem Sci* 17: 348–353

REINHARDT D, PESCE ER, STIEGER P, MANDEL T, BALTENSPERGER K. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426, 255–60, (2003).

REMYNGTON, D.L.; VISION, T.J.; GUILFOYLE, T.J.; REED, J.W. Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. *Plant Physiology*, 135, 1738-1752, (2004).

RIBEIRO, E.A., CUNHA, F.Q., TAMASHIRO, M.S.C., MARTINS, I.S. (1999). Growth phasedependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.* 445, 283-286.

RICE, J. A.; MACCARTHY, P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Organic Geochemistry*, v. 17, p. 635-648. 1991.

- ROBSON, C. A.; VANLERBERGHE, G. C. (2002) Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria dependent and independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiology*, (129) p.1908-1920.
- ROCKEL, P.; STRUBE, F.; ROCKEL, A. WILDT, J. & KAISER, W.M. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exper. Bot.*, 53: 103-110, 2002.
- RODRIGUEZ-SERRANO M, ROMERO-PUERTAS MC, ZABALZA A, CORPAS FJ, GOMEZ M, DEL RIO LA, SANDALIO LM (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots: imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ* 29 1532–1544
- ROGG, L.E.; BARTEL, B. Auxin signaling: derepression through regulated proteolysis. *Developmental Cell*, 1, 595–604, (2001).
- RÖMHELD, V.; MULLER, C.; MARSCHNER, H. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiol*, v.76, p. 603–606. 1984.
- ROSS, J.J.; O'NEILL, D.P.; SMITH, J.J.; KERCKHOFFS, L.H.J.; ELLIOTT, R.C. Evidence that auxin promotes gibberellinA1 biosynthesis in pea. *Plant Journal*, 21, 547–552, (2000).
- RUCK, A., PALME, K., VENIS, M.A., NAPIER, R.M., FELLE, R.H. Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin-binding protein in the auxin stimulation of plasma-membrane current in *Zea mays* protoplasts. *Plant J.*, 4, 41-46, (1993).
- SAKIHAMA, Y., MURAKAMI, S., YAMASAKI, H. (2003). Involvement of nitric oxide in the mechanism for stomatal opening in *Vicia faba* leaves. *Biol. Plant.* 46, 117-119.
- SANDALIO, L.M., GÓMEZ, M. AND DEL RÍO, L.A. (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* 136, 2722-2733.
- SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH, E.I.S. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79, 53-61, (2004).
- SANTI, S.; LOCCI, G.; PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in maize roots induced for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake, *Plant Physiol*, v. 109, p. 1277-1283. 1995.
- Santiago LJM, Louro RP, Oliveira DE. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonialyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. *Ann Bot* 2000;86(5):1023-32.
- SANTNER, A., CALDERON-VILLALOBOS, L.I.A., ESTELLE, M. Plant hormone are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5, 301-307, (2009).
- SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. 2.ed. Porto Alegre: Genesis Edições, 2008.

SANTOS, L. A. Absorção e Remobilização de NO<sub>3</sub> em Arroz (*Oryza sativa* L.): Atividade das Bombas de Prótons e a Dinâmica do Processo. 88 f. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, UFRRJ, 2006.

SATTELMACHER, B.; GERENDAS, J.; THOMS, K.; BRUCK, H.; BAGDADY, N. H. Interaction between root growth and mineral nutrition. *Environmental and Experimental Botany*, v.33, p.63-73, 1993.

SAUER, P., FRÉBORT, I. (2003). Molybdenum cofactor-containing oxidoreductase family in plants. *Biol. Plant.* 46, 481-490.

SAVIANI, E.E., ORSI, C.H., OLIVEIRA, J.F.P., PINTO-MAGLIO, C.A.F., SALGADO, I. (2002). Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Lett.* 510, 136-140.

SCANDALIOS, JG Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.*, 101, 7-12 (1993)

SCHMIDT, W., SANTI, S., PINTON, R., VARANINI, Z. Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in *Arabidopsis*. *Plant Soil*, 300:259-267, (2007).

SCHNITZER, M.; GUPTA, U.C. Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Science Society of America Proceedings*, Madison, v. 27, p. 274-277, 1965.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U.; *Humic substances in the environment*, Marcel Dekker; New York 1972.

SCHNITZER, M.; PRESTON, C. M. Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 50, p. 326-331, 1986.

SCHROEDER, JI 1995. Magnesium-independent activation of inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in *Vicia faba* guard cells. *FEBS Lett.* 363: 157-160

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Science*, Baltimore, v. 162, n. 2, p. 115-130, 1997.

SERRANO, R. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v. 40, p. 61-94. 1989.

SHAW AW, VOSPER AJ (1977) Solubility of nitric oxide in aqueous and non-aqueous solvents. *J Chem Soc Faraday Trans 1* 73:1239-1244.

SHIN, R., AND SCHACHTMAN, D.P. (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root response to nutrient deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8827–8832.[

SITT M, MULLER C, MATT P, GIBON Y, CARILLO P, MORCUENDE R, SCHEIBLE WR, KRAPP A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot.* 2002;53:959–970.

SODEK, L. 2004. Metabolismo do nitrogênio. In: Gilberto Barbante Kerbauy. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.94-113.

FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Growth, and Accumulation of Nitrogen and Soluble Sugars in Growth, and accumulation of nitrogen and soluble sugars in carrot and clover hairy roots in two culture media with and without arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, India, v. 12, n. 1, p. 29-33, 2006.

SOUZA, E. S.; STARK, E. M. L. M.; SOUZA, S. R.; FONSECA, H. M. C.; BERBARA, R. L. L. Protease activity and development in *Daucus carota* and *Trifolium repens* hairy roots in culture media containing different nitrogen source and levels. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 8 (2): 251-259. 2002.

SOUZA, S. R. Efeitos da aplicação foliar de nitrogênio pós-antese sobre as enzimas de assimilação de N e acúmulo de proteínas em grãos de arroz. 1995. 152 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 1995.

SOUZA, S. R. ; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: Fernandes, M. S. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 215-252, 2006.

SOUZA, S. R.; SOUZA, E. S.; BERBARA, R. L. L. ; FERNANDES, M. S.; STARCK, M. L. Enzymes of Nitrogen Metabolism and Proteases Activity in Hairy Roots of Clover and Carrots, with and without Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Journal of Plant Nutrition*, v. 30, p. 1185-1204, 2007.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; MAGALHÃES, J. R. Effects of Supplemental Nitrogen on Nitrogen-Assimilation Enzymes, Free Amino Nitrogen, Soluble Sugars, and Crude Protein of Rice. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, New York, US., v.30, n.5 & 6, p.711-724, 1999.

STEVENSON, F.J. & COLE, M.A. *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur and micronutrients*. New York, John Wiley & Sons, 1999. 427p.

STEVENSON, F.J. *Humus chemistry: genesis, composition, reaction*. New York: John Wiley & Sons. 1982. 443 p.

STITT, M. Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Bot. Acta*, 111:167-175, 1998.

STÖHR, C., STRUBE, F., MARX, G., ULLRICH, W.R., ROCKEL, P. (2001). A plasma membrane bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212, 835-841.

STÖHR, C.; STREMLAU, S. (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, (57), n.3, p.463-470.

STUEHR, D.J. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 339-359.

SWIFT, R. S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D. L.; PAGE, A. L.; HELMKE, P. A.; LOEPPERT, R. H.; SOLTANPOUR, P. N.; TABATABAI, M. A.; JOHNSTON, C. T.; SUMNER, M. E. (Ed.). *Methods of soil analysis*. Madison: Soil Science Society of America: American Society of Agronomy, 1996. p. 1011-1020. (Soil Science Society of America Book Series, 5). Part 3. Chemical methods.

SZE, H. H<sup>+</sup>-translocating ATPase: advances using membrane vesicles. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36:175-208, 1985.

SZE, H.; LI, X. & PALMGREN, M.G. Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-Pumping ATPases: regulation and Biosynthesis. *Plant Cell.*, 11:677-689, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

TAKAHASHI, S., YAMASAKI, H. (2002). Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett.* 51, 145-148.

TAVARES FILHO, J.; TESSIER, D. Characterization of soil structure and porosity under long-term conventional tillage and no-tillage systems. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 33,1006-12, (2009).

TAYEH, M.A., MARLETTA, M.A. (1989). Macrophage oxidation of L-arginine on nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* 264, 19654-19658.

*the Total Environment*, v. 62, p. 355-363. 1987.

THENG, B.K.G., TATE, K.R., SOLLINS, P. 1989. Constituents of organic matter in temperate and tropical soils. In: Coleman, D.C., Oade, J.M., Uehara, G. (Ed.) *Dynamics of Soil Organic Matter in tropical Ecosystems*. Honolulu, University of Hawaii. p. 5-32.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant Cell and Environment*, v.23, p.1005-1024, 2000.

TORRENTES, A; JAYASUNDERA, S. & SCHMIDT, W.J. Influence of the polarity of organic matter on the sorption of acetamide pesticides. *J. Agric. Food Chem.* 45:3320- 3325, 1997.

TREVISAN, S., PIZZEGHELLO, D., RUPERTI, B., FRANCIOSO, O., SASSI, A., PALME, K., QUAGGIOTTI, S., NARDI, S. (2009) Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. *Plant Biol.*, 1-12.

TUN, N.N., HOLK, A., SCHERER, G.F.E. (2001). Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters*, 509, 174-176.

TUN, N.N.; SANTA-CATARINA, C.; BEGUM, T.; SILVEIRA, V.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; SCHERER, G.F.E. Polyamine induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) release in *Arabidopsis* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 47, 346-354, (2006).

ULMASOV T, LIU ZB, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell.*; 7 :1611-1623, (1995).

VALDRIGHI, M.M.; PERA, A.; AGNOLUCCI, M.; FRASSINETTI, S.; LUNARDI D.; VALLINI, G. Effects of compost-derived humic acids on vegetable biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: a comparative study, *Agr. Ecosyst. Environ.* (1996) 58:133–144.

VANIN, A.F. LIU X., SAMOUILOV A., STUKAN R.A., ZWEIER J.L. (2000). Redox properties of iron-dithiocarbamates and their nitrosyl derivatives: implications for their use as traps of nitric oxide in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1474, 365-377.

VARANINI Z, PINTON R. 2001. Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. In: PINTON R, VARANINI Z, NANNIPIERI P, eds. *The rhizosphere*. Basel, Switzerland: Marcel Dekker, 141-158.

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

VAUGHAN D. 1986. Effetto delle sostanze umiche sui processi metabolici delle piante. In: BURNS RG, DELL'AGNOLA G, MIELE S, NARDI S, SAVOINI G, SCHNITZER M, SEQUI P, VAUGHAN D, VISSER SA, eds. *Sostanze Umiche effetti sul terreno e sulle piante*. Roma, Italy: Ramo Editoriale degli Agricoltori, 59-81.

VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. Influence of humic substances on growth and physiological process. In: VAUGHAN, D.; MALCOLM, R.E. (Ed.). *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1985. p.37-75.

VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. Influence of humic substances on growth and physiological process. In: VAUGHAN, D.; MALCOLM, R.E. (Ed.). *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1985. p.37-75.

VEZZANI, F. M.; MIELNICZUK, J. An overview of soil quality. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 33,4(2009).

WANG SY, JIAO HJ, FAUST M Changes in the activities of catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase in apple buds during bud break induced by thidiazuron. *J. Plant. Growth Regul.* 10,33–39 (1991)

WEIJERS D, BENKOVA E, JAGER KE, SCHLERETH A, HAMANN T. Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J.* 24, 1874–85, (2005).

WENDEHENNE, D., PUGIN, A., KLESSIG, D.F., DURNER, J. (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* 6, 177-183.

WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters Responsible for the Uptake and Partitioning of Nitrogenous solutes. Annual Review In Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, CA-USA, v.52, p.659-688, 2001.

WINK, D. A.; DARBYSHIRE, J. F.; NIMS, R. W.; SAAVEDRA, J. E.; FORD, P. C.; Chem. Res. Toxicol. 1993, 6, 23.

WOODWARD, A.W.; RATZEL, S.E.; WOODWARD, E.E.; SHAMOO, Y.; BARTEL, B. Mutation of E1-conjugating enzyme-related1 decreases RELATED TO UBIQUITIN conjugation and alters auxin response and development. Plant Physiol. 144:976–87, (2007).

WORLEY, C.K.; ZENSER, N.; RAMOS, J.; ROUSE, D.; LEYSER, O. Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling. Plant J. 21, 553–62, (2000).

YAMAGAMI, M., HAGA, K., NAPIER, R. M., LINO, M. Two distinct signaling pathways participate in auxin-induced swelling of pea epidermal protoplasts. Plant Physiology 134:735-747, (2004)

YAMASAKI, H., SAKIHAMA, Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. FEBS Lett. 468, 89-92.

YAN, F.; ZHU, Y.; MULLER, C.; ZORB, C.; SCHUBERT, S. Adaptation of H<sup>+</sup>-Pumping and Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase Activity in Proteoid Roots of White Lupin under Phosphate Deficiency. Plant Physiology, v.129, p.50-63, 2002.

YEMM, E. W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. Anal. Biochem., 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.

YEOMANS, J.C. & BREMNER, J.M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 19(13):1467-1476, 1988.

YONEBAYASHI, K.; HATTORI, T. Chemical and biological studies on environmental humic acids. I. Composition of elemental and Functional Groups of Humic Acids. Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo, v. 34, n. 4, p. 571-584, 1988.

YOUNG JC, OBERMANN WMJ ,HARTL FU (1998) Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. J Biol Chem, 273, 18007–18010.

ZAMBRYSKI, P., JOOS, H., GENETELLO, C., LEEMANS, J., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J. 1989. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J. 2:2143-2150.

ZAMBRYSKI, P., JOOS, H., GENETELLO, C., LEEMANS, J., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J. 1989. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J. 2:2143-2150.

ZANDONADI D.B., FACANHA A.R. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid *Chemosphere*, 78, (4), 457-466 (2010).

ZANDONADI DB, CANELLAS LP, FAÇANHA AR. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta*, 225,1583-1595 (2007)

ZANDONADI, D.B. (2006) Bioatividade de substâncias húmicas: promoção do desenvolvimento radicular e atividade das bombas de H<sup>+</sup>. Tese (Mestrado em Produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – Rj, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Uenf, 175p.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, Amsterdam, v. 79, p. 117-161, 1997.

ZHANG H, FORDE B. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*.1998;279:407–409

ZHANG Y, WANG L, LIU Y, ZHANG Q, WEI Q, ZHANG W (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in the tonoplast. *Planta* 224: 545–555

ZHAO DY, TIAN QY, LI LH, ZHANG WH. Nitric oxide is involved in nitrate-induced inhibition of root elongation in *Zea mays*. *Annals of Botany*. 2007a;100:497–503.

ZOTTINI, M., FORMENTIN, E., SCATTOLIN, M., CARIMI, F., LO SCHIAVO, F., TERZI, M. (2002). Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Lett*. 515, 75-78.