

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Potencialidades das Substâncias Húmicas,
Extratos de Algas e suas Combinações como
Bioestimulantes em Plantas: Características
Estruturais e Modo de Ação**

Tadeu Augusto van Tol de Castro

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA –
CIÊNCIA DO SOLO**

**POTENCIALIDADES DAS SUSBTÂNCIAS HÚMICAS, EXTRATOS DE
ALGAS E SUAS COMBINAÇÕES COMO BIOESTIMULANTES EM
PLANTAS: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E MODO DE AÇÃO**

TADEU AUGUSTO VAN TOL DE CASTRO

Sob Orientação do Professor
Andrés Calderín García

e Co-orientação do Professor
Leandro Azevedo dos Santos

e da Professora
Ana Lúcia Vendramini

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor**, no
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Ciência do Solo, Área de
Concentração em Biologia do Solo.

Seropédica, RJ
Novembro de 2023

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

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

C355p	<p>Castro, Tadeu Augusto van Tol de, 1993- Potencialidades das substâncias húmicas, extratos de algas e suas combinações como bioestimulantes em plantas: características estruturais e modo de ação / Tadeu Augusto van Tol de Castro. – Seropédica, 2023. 177 f.: il.</p> <p>Orientador: Andrés Calderín García. Tese (Doutorado). – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, 2023.</p> <p>1. Ácido húmico. 2. Ácido fúlvico. 3. <i>Kappaphicus alvarezii</i>. 4. Caracterização físico-química. 5. Bioatividade. I. García, Andrés Calderín, 1981-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo. III. Título.</p>
-------	--

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

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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)



HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 21 / 2023 - CPGACS (12.28.01.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.075057/2023-90

Seropédica-RJ, 13 de novembro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO

TADEU AUGUSTO VAN TOL DE CASTRO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

TESE APROVADA EM 10/11/2023.

Andrés Calderín García. Dr. UFRRJ

(Orientador)

Everaldo Zonta. Dr. UFRRJ

Dariellys Martínez Balmori. Dra. Universidad de La Habana

Flávio Couto Cordeiro. Dr. UFRRJ

Marcio Osvaldo Lima Magalhães. Dr. UNEMAT

(Assinado digitalmente em 21/11/2023 23:45)

ANDRES CALDERIN GARCIA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptS (12.28.01.00.00.33)
Matrícula: 1399485

(Assinado digitalmente em 22/11/2023 19:04)

EVERALDO ZONTA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
IA (12.28.01.21)
Matrícula: 2213075

(Assinado digitalmente em 21/11/2023 15:29)

FLAVIO COUTO CORDEIRO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQA (11.39.00.22)
Matrícula: 2630672

(Assinado digitalmente em 21/11/2023 19:46)

DARIELLYS MARTINEZ BALMORI
ASSINANTE EXTERNO
Passaporte: M471292

(Assinado digitalmente em 21/11/2023 15:41)

MARCIO OSVALDO LIMA MAGALHÃES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 092.017.077-38

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **21**, ano: **2023**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão: **13/11/2023** e o código de verificação: **be4b1d292a**

DEDICATÓRIA

*Deus, por tudo.
À minha família, por todo o amor e carinho.
Aos meus amigos, pelos sorrisos e apoio.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar ao meu lado, dando-me forças para seguir, nunca deixando me faltar nada.

Agradeço a minha família, em especial meus pais Victor Geraldo Soares de Castro e Regina Maria van Tol de Almeida Castro, por todo amor, amizade, respeito, educação e paciência que me foram dados ao longo destes anos.

Agradeço à minha companheira Rafaela Silva Correa, por todo amor, força, compreensão, ajuda e horas compartilhadas para a realização deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, aonde nasci e cresci, por ser ontem, hoje e sempre meu lar, por ter sido fundamental na minha educação e formação e por todos os momentos que aqui passei.

Agradeço ao Prof^o Dr. Andrés Calderín García pela oportunidade, confiança, orientação, amizade, conselhos e todos os ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Agradeço ao Laboratório de Química Biológica do Solo e a todos os colegas de trabalho que nunca deixaram de estar presente, sou grato por fazer parte de um grupo tão unido e colaborativo. Em especial, agradeço ao Todo, à Craque, à Dêssa e ao Baby, por sempre estarem ao meu lado, muitas vezes antes do sol nascer e depois dele se pôr.

Agradeço à Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (SISH), à Universidad de Navarra, ao Prof^o Dr. José María García-Mina e a todo o grupo Bach da Timac Agro Espanha, pela oportunidade de realizar o treinamento e por toda orientação e ajuda no desenvolver do trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, Laboratório de Estudos da Relação Solo-Planta e Laboratório de Gênese e Classificação do solo por toda estrutura e amparo fornecidos.

Agradeço à “Fundação Coordenação de Projetos, Pesquisas e Estudos Tecnológicos – COPPETEC-UFRJ”, à Fundação Carlos Chagas Filho para Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - Brasil (Processo n^o. SisFAPERJ:2012028010), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Desenvolvimento Tecnológico - Brasil (CNPQ: n^o 402396/2021-9 Universal 18/2021, CNPq-N^o. 309722/2021-7, Bolsa de Pesquisa PQ -2), o Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da Universidade Federal Universidade Rural do Rio de Janeiro (PPGA-CS, UFRRRJ), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Processo n^o CAPES:001).

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Diz-se que antes de entrar no mar um rio treme de medo.
Ele olha pra trás, para o caminho que percorreu,
desde os picos das montanhas,
a longa estrada sinuosa que a atravessa florestas e aldeias.
E à sua frente, ele vê um oceano tão vasto,
que entrar parece nada mais do que desaparecer para sempre.
Mas não outra maneira. O rio não pode voltar.
Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência
O rio precisa correr o risco de entrar no oceano porquê só assim o medo desaparecerá,
porque é aí que o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano,
mas de tornar-se oceano.”*

Khalil Gibran

RESUMO GERAL

CASTRO, Tadeu Augusto van Tol. **Potencialidades das substâncias húmicas, extratos de algas e suas combinações como bioestimulantes em plantas: características estruturais e modo de ação.** 2023. 177f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

A crescente demanda global por alimentos tem levado ao uso mais intensivo do solo. Nesse contexto, surgiram novos e avançados bioinsumos, como os bioestimulantes e biofertilizantes, com o objetivo de promover a integração harmoniosa entre a produção de alimentos e o manejo sustentável do solo. O interesse na utilização de bioestimulantes à base de substâncias húmicas (SH) em áreas cultivadas já é uma realidade entre os agricultores. Por outro lado, a economia do mar vem sendo inserida cada vez mais na cadeia produtiva agrária de forma a gerar produtos agrícolas mais limpos e eficientes. Diante desta realidade, esta tese teve como objetivo avaliar os efeitos bioestimulantes em plantas de pepino (*Cucumis sativus*) da variedade Ashley e de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade nippombare, de frações húmicas extraídas de vermicomposto e leonardita, de extratos de algas extraídas de *Kappaphycus alvarezii*, assim como as suas combinações, aplicados via foliar e/ou radicular, previamente caracterizados. No capítulo I foi apresentada a caracterização físico-química de ácido húmico de vermicomposto (AHVC), ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) e ácido húmico de leonardita (AHCHECO) e discutida a bioatividade e o modo de ação dessas SH em plantas. No capítulo II, foi apresentada a caracterização físico-química dos subprodutos da alga *Kappaphycus alvarezii* (extrato aquoso e biomassa sólida) in natura e avaliado o efeito dos modos de aplicação (foliar e radicular) no crescimento e desenvolvimento, além dos diferentes modos de ação. No capítulo 3, foram avaliados e comparados os estímulos desencadeados pela aplicação foliar isolada e conjunta de AFVC e extrato de *Kappaphycus alvarezii* em plantas, na regulação gênica, metabolismo, na absorção e assimilação de nutrientes, no desempenho fotossintético, desenvolvimento radicular e crescimento, para a obtenção de bioestimulante foliar misto com potencial agrícola. As características físico-químicas das substâncias húmicas e dos extratos de *Kappaphycus alvarezii* resultaram em diferentes propriedades e bioatividades exercidas em plantas, com diferenças na expressão de genes, regulação hormonal, fotossíntese, absorção de nutrientes, quantidades de metabólitos solúveis, arquitetura radicular e acúmulo de biomassa. A aplicação de todos os compostos naturais resultou em plantas com maior desenvolvimento, porém de forma diferenciada dependendo de suas características estruturais. A aplicação radicular e foliar de AFVC e de extrato aquoso de *Kappaphycus alvarezii* (K-sap) resultou em estímulos diferenciados sobre o crescimento radicular e produção de biomassa, sendo as doses de melhor resposta diferentes para cada composto e forma de aplicação. Tanto para AFVC quanto para K-sap, foram necessárias aplicações em concentrações menores nas raízes do que nas folhas para o estímulo de maior resposta. O bioestimulante foliar misto com AFVC à 80 mg L⁻¹ + K-sap à 2% mostrou potencial para uso comercial em cultivo de plantas de arroz, aumentando sua produção. Os custos associados à produção e comercialização destes bioestimulantes foliares são considerados baixos, uma vez que são extraídos de compostos naturais e pulverizados em pequenas doses, além do potencial para utilização na conservação e no manejo de ecossistemas naturais e agrícolas, pois são biodegradáveis e não-tóxicos.

Palavras-chave: Ácido húmico. Ácido fúlvico. *Kappaphycus alvarezii*. Caracterização físico-química. Bioatividade.

GENERAL ABSTRACT

CASTRO, Tadeu Augusto van Tol. **Potentialities of humic substances, algae extracts and their combinations as biostimulants in plants: structural characteristics and mode of action.** 2023. 177p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The growing global demand for food has led to more intensive land use. In this context, new and advanced bioinputs have emerged, such as biostimulants and biofertilizers, with the aim of promoting a harmonious integration between food production and sustainable soil management. The interest in using biostimulants based on humic substances (HS) in cultivated areas is already a reality among farmers. On the other hand, the sea economy has been increasingly inserted into the agrarian production chain with the aim of generating cleaner and more efficient agricultural products. Given this reality, this thesis aimed to evaluate the biostimulant effects on cucumber plants (*Cucumis sativus*) of the *Ashley* variety and rice (*Oryza sativa* L.) of the *nippombare* variety, of humic fractions extracted from vermicompost and leonardite, of algae extracts extracted from *kappaphycus alvarezii*, as well as their combinations, applied via foliar and/or root, previously characterized. In chapter I, the physicochemical characterization of vermicompost humic acid (HAVC), vermicompost fulvic acid (FAVC) and leonardite humic acid (HACHECO) was presented and the bioactivity and mode of action of these SH in plants were discussed. In chapter 2, the physical-chemical characterization of subfractions of the algae *Kappaphycus alvarezii* (aqueous extract and solid biomass) in natura (without addition of preservatives) was presented and the effect of application modes (foliar and root) on growth and development was evaluated, in addition of the different resulting modes of action. In chapter 3, the stimuli triggered by the isolated and joint foliar application of FAVC and *Kappaphycus alvarezii* extract in plants were evaluated and compared, on gene regulation, metabolism, absorption and assimilation of nutrients, photosynthetic performance, root development and growth, aiming to obtaining a mixed foliar biostimulant with agricultural potential. The physicochemical characteristics of humic substances and *Kappaphycus alvarezii* extracts resulted in different properties and bioactivity exerted on plants, with differences in gene expression, hormonal regulation, photosynthesis, nutrient absorption, amounts of soluble metabolites, root architecture and accumulation of biomass. In general, the application of all natural compounds resulted in plants with greater development, but with different forms depending on their structural characteristics. The root and foliar application of FAVC and aqueous extracted from *kappaphycus alvarezii* (K-sap) resulted in different stimuli on root growth and biomass production, with the best response doses being different for each compound and form of application. For both FAVC and K-sap, applications at lower concentrations were necessary in the roots than in the leaves to stimulate a greater response. The mixed foliar biostimulant with AFVC at 80 mg L⁻¹ + K-sap at 2% showed potential to be used commercially in the cultivation of rice plants, increasing their production. The costs associated with the production and commercialization of these foliar biostimulants are considered low, since they are extracted from natural compounds and sprayed in small doses, in addition to the potential to be used in the conservation and management of natural and agricultural ecosystems, as they are biodegradable and not -toxic.

Keywords: Humic acid. Fulvic acid. *Kappaphycus alvarezii*. Characterization. Bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema didático para mostrar a formação de estruturas húmicas supramoleculares a partir da deposição de matéria orgânica no solo. 1) Deposição de detritos vegetais e animais no solo. 2) Incorporação de moléculas orgânicas ao solo, produtos da decomposição e 3) Formação de frações húmicas e carbono orgânico dissolvido. Fonte: retirado e adaptado de Moura et al., (2023)..... 8
- Figura 2.** Estímulos sobre o desenvolvimento de raízes de plantas de arroz tratadas via radicular com ácido húmico extraído de organossolo (AHSOLO), de sedimentos do Rio Negro – AM (AHRN) e de vermicomposto (AHVC), em trabalho realizado por Castro et al. (2021). Fonte: próprio autor. 10
- Figura 3.** Estímulo ao desenvolvimento em plantas de arroz pela aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH) em condições de estresse hídrico induzido por polietilenoglicol (PEG), em estudo conduzido por Castro et al. (2022). Fonte: Próprio Autor. 14
- Figura 4.** (A) Interações químicas de ácidos húmicos e membrana radicular; (B) Acúmulo de estruturas húmicas nas raízes; (C) Aglomeração de ácido húmico nas concentrações de 40 e 80 mg L⁻¹ em raízes após 24, 48 e 72 horas de aplicação. Fonte: Retirado e adaptado de García et al. (2019). 16
- Figura 5.** Metodologia esquemática para estudo dos efeitos das substâncias húmicas (SH) nas plantas com base na relação entre estrutura, propriedades e função. Fonte: retirado e adaptado de García et al. (2019)..... 17
- Figura 6.** Cultivo de *Kappaphicus alvarezii* na baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil. Foto: Andrés Calderín García..... 19
- Figura 7.** (A) *Kappaphicus alvarezii* recém colhida; (B) Extrato líquido de *Kappaphicus alvarezii* (K-sap). Fotos: próprio autor. 20
- Figura 8.** Espectros IVTR do ácido húmico de vermicomposto (A1), ácido fúlvico de vermicomposto (A2) e ácido húmico de leonardita (A3). Análise de componentes principais PCA-IVTR, scores (B1) e loadings (B2) realizado com os espectros puros. ... 38
- Figura 9.** Espectros RMN ¹³C PC RAM do ácido húmico de vermicomposto (A1), ácido fúlvico de vermicomposto (A2) e ácido húmico de leonardita (A3). Análise de componentes principais PCA-IVTR, scores (B1) e loadings (B2) realizado com os espectros puros. Quantidade relativa dos tipos de carbono (C1), aromaticidade (C2), alifaticidade (C3) e índice de hidrofobicidade (C4). 39
- Figura 10.** Gráfico de dispersão dos dados observados e curva estimada pelo modelo de regressão linear quadrática com faixas de confiança para a variável comprimento total da raiz (a), área total da raiz (b), volume radicular (c) e número total de raízes (d) em função das doses de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC), medidas em intervalos de 24 h a 144 h após o fornecimento, n=20. 42
- Figura 11.** Superfície de resposta e gráfico de contorno, respectivamente. Área de superfície radicular total (A, E), classes de raízes finas (B, F), médias (C, G) e grossas (D, H), de plantas de arroz sob doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) medidos em intervalos de 24 h a 144 h após a aplicação. 43

Figura 12. Superfície de resposta e gráfico de contorno, respectivamente. Volume total de raízes (A, E), classes de raízes finas (B, F), médias (C, G) e grossas (D, H), de plantas de arroz sob doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) medidos em intervalos de 24 h a 144 h após a aplicação.....	44
Figura 13. Superfície de resposta e gráfico de contorno, respectivamente. Número total de pontas de raízes (A, E), classes de raízes superfinas (B, F), finas (C, G) e grossas (D, H), de plantas de arroz sob doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) medidos em intervalos de 24 h a 144 h após a aplicação.	45
Figura 14. Superfície de resposta e gráfico de contorno, respectivamente. Comprimento total das raízes (A, E), classes de raízes superfinas (B, F), finas (C, G) e grossas (D, H), de plantas de arroz sob doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) medidos em intervalos de 24 h a 144 h após a aplicação.....	46
Figura 15. Superfície de resposta e gráfico de contorno, respectivamente. Número de bifurcações (A, C) e diâmetro médio das raízes (B, D) de plantas de arroz sob doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) medidos em intervalos de 24 h a 144 h após a aplicação.	47
Figura 16. Quantificação dos parâmetros morfológicos das raízes de plantas de arroz tratadas pela aplicação foliar de doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto. Área radicular (A), volume radicular (B), diâmetro médio radicular (C), comprimento radicular (D), número de bifurcações radiculares (E), número total de raízes (F), número de raízes finas (G), número de raízes médias (H) e número de raízes grossas (I), n=40.	49
Figura 17. Produção de biomassa fresca das raízes (A), bainhas (B) e folhas (C) e de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) pela aplicação foliar de doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto. Conjunto de dados de um tratamento com a mesmas letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$), n=40.....	51
Figura 18. Produção de biomassa seca das raízes (A), bainhas (B) e folhas (C) de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) pela aplicação foliar de doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto. C. Conjunto de dados de um tratamento com a mesmas letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$), n=40.....	52
Figura 19. Expressão relativa normalizada de diferentes genes em raízes de plantas de pepino submetidas à aplicação de ácido húmico extraído de vermicomposto à 50mg L^{-1} , em relação ao controle, n=4.	54
Figura 20. Expressão relativa normalizada de diferentes genes em raízes de plantas de pepino submetidas à aplicação de ácido fúlvico extraído de vermicomposto à 50mg L^{-1} , em relação ao controle, n=4.	55
Figura 21. Expressão relativa normalizada de diferentes genes em raízes de plantas de pepino submetidas à aplicação de ácido húmico extraído de leonardita à 50mg L^{-1} , em relação ao controle n = 4.	56
Figura 22. Concentração de ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e de citocininas, em raízes e folhas de plantas de pepino sob aplicação via radicular de diferentes substâncias húmicas à 50 ppm. Barras com a mesmas letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$), n=4.	60

- Figura 23.** Estímulos radiculares em plantas de pepino submetidas a aplicação via radicular de AHVC, AFVC e AHCHCO à 50 e 100 mg L⁻¹. Área radicular (A), volume radicular (B), comprimento radicular (C), número de bifurcações radiculares (D), diâmetro radicular (E), número total de raízes (F), número de raízes finas (G), número de raízes médias (H) e número de raízes grossas (I), n=3. 65
- Figura 24.** Acúmulo de biomassa fresca das folhas (A) e das raízes (B) e de biomassa seca de folhas (C) e de raízes (D) em plantas de pepino sob aplicação via radicular de AHVC, AFVC e AHCHCO à 50 e 100 mg L⁻¹. Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p<0,05), n=5. 67
- Figura 26.** Espectros IVTR das frações de algas, biomassa residual da extração das algas seca mediante aplicação de calor em estufa A), liofilização a1) e do extrato aquoso seco em estufa a2), liofilização a3). Análise de componentes principais PCA-IVTR, scores B) e loadings b1) realizado com os espectros puros. 85
- Figura 27.** Espectros RMN ¹³C PC RAM das frações de algas, biomassa residual da extração das algas seca mediante aplicação de calor em estufa A), liofilização a1) e do extrato aquoso seco em estufa a2), liofilização a3). Análise de componentes principais -PCA, scores B) e loadings b1) realizado com os espectros puros. Quantidade relativa dos tipos de carbono C), aromaticidade c1), alifaticidade c2) e índice de hidrofobicidade c3). 87
- Figura 28.** Produção de biomassa fresca e biomassa seca das raízes, bainhas e folhas das plantas de arroz avaliada em dois momentos, pela aplicação radicular de K-sapL a concentrações de 1%, 2%, 3%, 5% e 10% (v:v). 90
- Figura 29.** Quantificação dos parâmetros morfológicos das raízes das plantas de arroz tratadas via radicular a concentrações de 1%, 2%, 3%, 5% e 10% (m:m) de K-sap, avaliados em dois momentos. 92
- Figura 30.** Conteúdo de Na⁺ e K⁺ na parte aérea das plantas tratadas com diferentes concentrações de K-sap: 1%, 2%, 3%, 5% e 10% (v:v) aos 22 e 25 dias, n=5. 93
- Figura 31.** Produção de biomassa fresca e biomassa seca das raízes, bainhas e folhas e de plantas de arroz pela aplicação foliar de K-sap a concentrações de 5%, 10%, 15%, 20% e 25% (m:m). 94
- Figura 32.** Quantificação dos parâmetros morfológicos das raízes das plantas de arroz tratadas pela aplicação foliar de K-sap a concentrações de 5%, 10%, 15%, 20% e 25% (m:m), n=40. 96
- Figura 33.** Expressão relativa de genes relacionados a bombas de prótons, metabolismo de nitrogênio e sistema oxidativo em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas sob diferentes condições. Barras com a mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey (p < .05), n=4. 99
- Figura 34.** Concentração de N-NO₃⁻ (A), concentração de N-NH₄⁺ (B), concentração de N-amino (C) e concentração de açúcares solúveis (D) em raízes, bainhas e folhas de arroz plantas (*Oryza Sativa* L.) cultivadas em diferentes condições. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05), n=4. 101
- Figura 35.** Expressão relativa de genes relacionados a absorção e translocação de potássio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas sob diferentes condições. Barras com a mesma

letra não foram significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=4$.
..... 103

Figura 36. Teor de N, K e P em raízes, bainhas e folhas nas plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com K_{AIV} -sap via radicular e foliar. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=4$ 104

Figura 37. Parâmetros fotossintéticos de plantas de arroz cultivadas em diferentes condições deduzidos pela análise do teste JIP de transientes de fluorescência normalizados usando o controle como referência. Índice de desempenho fotossintético (PIABS), índice de desempenho fotossintético total (PITOTAL), rendimento quântico máximo da fotoquímica primária ($\phi P0$), rendimento quântico do transporte de elétrons de Q ($\phi R0$), rendimento quântico do transporte de elétrons ($\phi E0$), eficiência com a qual um elétron pode mover o intersistema de aceptores de elétrons reduzidos em o intersistema para o acceptor final de elétrons FSI (δRv), eficiência com a qual um éxciton capturado no centro de reação (RC) pode mover um elétron de QA – para o intersistema de aceptores de elétrons (0E0), redução do acceptor final de elétrons no elétron FSI lado do acceptor por RC (RE0/RC), fluxo de transporte de elétrons por RC (ET0/RC), fluxo de energia dissipada por RC (DI0/RC), fluxo de absorção por RC (ABS/RC), fluxo de energia aprisionada por RC (TR0/RC), complexo de evolução de oxigênio (OEC). (A) 24 horas; (B) 48 horas; (C) 72 horas; (D) 96 horas; (E) 120 horas; (F) 144 horas. $n=11$ 106

Figure 38. Fluorescência transiente da clorofila *a* de folhas de plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) adaptadas ao escuro, cultivadas em diferentes condições. Fluorescência relativa variável entre as etapas O e P (Wt; A, D, G, J, M, P) em tempo logarítmico; Fluorescência relativa variável entre os passos O e I (WOI; B, E, H, K, N, Q) em tempo logarítmico; Fluorescência relativa variável entre as etapas I e P (WIP; C, F, I, L, O, R) e WOI na inserção. $n=11$. 107

Figura 39. Parâmetros radiculares modificados em plantas de arroz pela aplicação foliar (2% e 10%) e radicular (2%) de K-sap. Área (A), volume (B), comprimento (C), diâmetro (D), bifurcações (E), quantidade total de raízes (F), quantidade de raízes finas (G), quantidade de raízes médias (H) e quantidade de raízes grossas (I). Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=20$ 109

Figura 40. Produção de biomassa fresca (A) e seca (B), altura das plantas (C) e número de folhas por planta (D) de arroz pela aplicação foliar (2% e 10%) e radicular (2%) de K-sap. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=20$ 110

Figura 41. Expressão relativa de genes relacionados a bombas de prótons e metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Barras com a mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ($p < .05$), $n=4$ 125

Figura 42. Concentração de $N-NO_3^-$ (A), concentração de $N-NH_4^+$ (B), concentração de N-amino livre (C) e concentração de açúcares solúveis (D) em raízes, bainhas e folhas de arroz plantas (*Oryza Sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=4$ 127

Figure 43. Expressão relativa de genes relacionados a absorção e translocação de potássio e sistema oxidativo em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes

- bioestimulantes foliares. Barras com a mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ($p < .05$), $n=4$ 129
- Figura 44.** Teor de N, K e P em raízes, bainhas e folhas nas plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$), $n=4$ 130
- Figura 45.** Parâmetros fotossintéticos de plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) cultivadas sob pulverização foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap, pela análise do teste JIP de transientes de fluorescência normalizados usando o controle como referência. Índice de desempenho fotossintético (PIABS), índice de desempenho fotossintético total (PITOTAL), rendimento quântico máximo da fotoquímica primária ($\phi P0$), rendimento quântico do transporte de elétrons de Q ($\phi R0$), rendimento quântico do transporte de elétrons ($\phi E0$), eficiência com a qual um elétron pode mover o intersistema de aceptores de elétrons reduzidos em o intersistema para o acceptor final de elétrons FSI (δRv), eficiência com a qual um éxciton capturado no centro de reação (RC) pode mover um elétron de QA – para o intersistema de aceptores de elétrons (OE0), redução do acceptor final de elétrons no elétron FSI lado do acceptor por RC (RE0/RC), fluxo de transporte de elétrons por RC (ET0/RC), fluxo de energia dissipada por RC (DI0/RC), fluxo de absorção por RC (ABS/RC), fluxo de energia aprisionada por RC (TR0/RC), complexo de evolução de oxigênio (OEC). (A) 24 horas; (B) 48 horas; (C) 72 horas; (D) 96 horas; (E) 120 horas; (F) 144 horas. $n=5$ 133
- Figura 46.** Fluorescência transiente da clorofila α em folhas adaptadas ao escuro de plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) cultivadas sob pulverização foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap. Fluorescência variável relativa entre o O e P (Wt; A, D, G, J, M, P) em escala logarítmica; Fluorescência variável relativa entre o O e I (WOI; B, E, H, K, N, Q) em escala logarítmica; Fluorescência variável relativa entre o I e P (WIP; C, F, I, L, O, R) e WOI no gráfico. $n = 5$ 134
- Figura 47.** Parâmetros radiculares modificados em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Área (A), volume (B), comprimento (C), diâmetro (D), bifurcações (E), quantidade total de raízes (F), quantidade de raízes finas (G), quantidade de raízes médias (H) e quantidade de raízes grossas (I). Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$), $n=20$ 136
- Figura 48.** Produção de biomassa fresca (A) e seca (B), altura das plantas (C) e número de folhas por planta (D) de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$), $n=20$ 138
- Figura 49.** Análise das componentes principais da produção de biomassa fresca e seca de raízes, bainhas e folhas, altura das plantas, número de folhas por planta e morfologia radicular de plantas de arroz sob aplicação de diferentes bioestimulantes foliares. 139
- Figura 50.** Fluorescência transiente da clorofila α de folhas adaptadas ao escuro de plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) submetida à diferentes doses e formas de aplicação de k-sap. Fluorescência variável relativa entre as etapas O e J (WOJ; A, B, C, D, E, F) e cinética média (eixo vertical direito) representada entre as etapas O e J (Δ WOJ), revelando a banda K; Fluorescência variável relativa entre as etapas O e K (WOK; G, H, I, J, K, L) e cinética média (eixo vertical direito) representada entre as etapas O e K (Δ WOK), revelando a banda

L. (A, G) = 24 horas; (B, H) = 48 horas; (C, I) = 72 horas; (D, J) = 96 horas; (E, K) = 120 horas; (F, L) = 144 horas. n= 11. 175

Figura 51. Fluorescência transiente da clorofila α de folhas adaptadas ao escuro de plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) submetida à pulverização foliar de diferentes bioestimulantes. Fluorescência variável relativa entre as etapas O e J (WOJ; A, B, C, D, E, F) e cinética média (eixo vertical direito) representada entre as etapas O e J (Δ WOJ), revelando a banda K; Fluorescência variável relativa entre as etapas O e K (WOK; G, H, I, J, K, L) e cinética média (eixo vertical direito) representada entre as etapas O e K (Δ WOK), revelando a banda L. (A, G) = 24 horas; (B, H) = 48 horas; (C, I) = 72 horas; (D, J) = 96 horas; (E, K) = 120 horas; (F, L) = 144 horas. n= 5. 177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de nucleotídeos (5' a 3') usadas para amplificar os scripts de cDNA na análise quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	35
Tabela 2. Composição elementar, relações atômicas e relação E4/E6 (UV-vis) de AHVC, AFVC e AHCHECO.	36
Tabela 3. Composição de macro e micronutrientes presentes nas diferentes frações húmicas.	40
Tabela 4. Composição elementar de raízes e folhas de plantas de pepino submetidas a aplicação radicular de AHVC, AFVC e AHCHECO à 50 ppm.	61
Tabela 5. Concentração de nutrientes em raízes e folhas de plantas de pepino tratadas com AHVC, AFVC e AHCHECO à 50 e 100 mg L ⁻¹	63
Tabela 6. Sequências de nucleotídeos (5' a 3') usadas para amplificar os scripts de cDNA na análise quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	81
Tabela 7. Composição elementar, relações atômicas dos diferentes extratos de <i>Kappaphycus alvarezii</i>	83
Tabela 8. Composição de macro, micronutrientes e metais pesados presentes nas frações de extratos aquoso de algas e da biomassa residual da extração das algas.	89
Tabela 9. Sequências de nucleotídeos (5' a 3') usadas para amplificar os scripts de cDNA na análise quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	121
Tabela 10. Parâmetros instrumentais usados para a fonte de íons OptaMax NG para a determinação das concentrações de ABA, IAA, Ácido Salicílico e Ácido.....	171
Tabela 11. Precisão m/z dos fitohormônios e padrões internos, Energia de Colisão e seus principais fragmentos para determinação das concentrações de ABA, IAA, Ácido Salicílico, Ácido Jasmônico e Jasmonoil Isoleucina.	171
Tabela 12. Parâmetros instrumentais usados para a fonte de íons OptaMax NG para a determinação das concentrações de citocinina em tecidos vegetais.....	171
Tabesa 13. Precisão m/z dos fitohormônios e padrões internos, Energia de Colisão e seus principais fragmentos para determinação das concentrações de citocininas em tecidos vegetais.	171
Tabela 14. Caracterização química composicional da massa íntegra de algas de <i>Kappaphycus alvarezii</i>	172
Tabela 15. Principais parâmetros do teste JIP (Adaptada de YUSUF et al., 2010).....	172
Tabela 16. Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> de <i>Oryza Sativa</i> L. var. nippombare submetida a diferentes doses e formas de aplicação de k-sap.	173
Tabela 17. Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> de <i>Oryza Sativa</i> L. var. nippombare submetida à pulverização foliar de diferentes bioestimulantes.	176

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AIA – Ácido indolácetico

ABA – Ácido abscísico

AH - Ácidos húmicos

AHCHECO – Ácidos húmicos extraídos de leonardita

AHVC - Ácido húmico de vermicomposto

AF - Ácidos fúlvicos

AFVC – Ácidos fúlvicos de vermicomposto

APX – Ascorbato peroxidase

CAT – Catalases

CEO – Complexo de evolução do oxigênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GA₃ – Ácido giberélico

IVTF – Infravermelho com transformada de Fourier

K-sap – Extrato líquido de *Kappaphicus alvarezii*

K-sapE – Extrato líquido de *Kappaphicus alvarezii* seco em estufa

K-sapL – Extrato líquido de *Kappaphicus alvarezii* liofilizado

K-msrE – Massa residual seca em estufa

K-msrL – Massa residual seca em liofilizador

MOS – Matéria orgânica do solo

POX – Peroxidase

RMN C¹³ PC RAM - Ressonância magnética nuclear do isótopo do ¹³C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico

SH - Substâncias húmicas

SOD – Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL	4
2.1 Bioestimulantes	4
2.2 Substâncias Húmicas.....	7
2.2.1 Efeitos das substâncias húmicas no sistema radicular de plantas	9
2.2.2 Absorção de nutrientes pela ação das substâncias húmicas	11
2.2.3 Outros estímulos em plantas pela aplicação de substâncias húmicas	12
2.2.4 Ação das substâncias húmicas em condições de estresse vegetal.....	13
2.2.5 Modos de ação das substâncias húmicas.....	15
2.2.6 Relação estrutura – propriedade – função de substâncias húmicas em plantas	16
2.3 Algicultura.....	18
2.3.1 <i>Kappaphycus alvarezii</i>	20
2.3.2 Bioatividade de K-sap em plantas.....	21
3. CAPÍTULO I CARACTERIZAÇÃO, DOSE VS RESPOSTA E BIOATIVIDADE DE DIFERENTES SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM PLANTAS	23
3.1 RESUMO.....	24
3.2 ABSTRACT.....	25
3.3 INTRODUÇÃO	26
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.4.1 Caracterização físico-química dos compostos húmicos.....	28
3.4.2 Condições experimentais para os ensaios com aplicação de substâncias húmicas	30
3.4.3 Avaliações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas	32
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.5.1 Caracterização químico-espectroscópica das frações húmicas	36
3.5.2 Experimento 1 – dose vs resposta de ácido fúlvico extraído de vermicomposto aplicado via radicular	41
3.5.3 Experimento 2 – dose vs resposta de ácido fúlvico extraído de vermicomposto aplicado via foliar.....	47
3.5.4 Experimento 3 – mecanismos envolvidos na bioatividade de substâncias húmicas	53
3.6 CONCLUSÕES	68
4. CAPÍTULO II CARACTERIZAÇÃO, DOSE VS RESPOSTA E BIOATIVIDADE DO EXTRATO DE <i>KAPPAPHYCUS ALVAREZII</i>	69
4.1 RESUMO.....	70
4.2 ABSTRACT.....	71

4.3 INTRODUÇÃO	72
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	74
4.4.1 Caracterização físico-química dos extratos aquosos de <i>Kappaphicus alvarezii</i> obtidos de diferentes maneiras	74
4.4.2 Condições experimentais para os ensaios com aplicação do K-sap.....	76
4.4.3 Avaliações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas	77
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4.5.1 Caracterização Químico-Espectroscópica da seiva extraída de <i>Kappaphicus alvarezii</i>	83
4.5.2 Experimento 1 – Dose vs Resposta do K-sap Aplicado Via Radicular	89
4.5.3 Experimento 2 – Dose vs resposta do K-sap por aplicação foliar.....	93
4.5.4 Experimento 3 – mecanismos envolvidos na bioatividade de K-sap aplicado por diferentes vias e concentrações	97
4.6 CONCLUSÕES	111
5. CAPÍTULO III POTENCIALIDADES E EFEITOS DA APLICAÇÃO FOLIAR DE BIOESTIMULANTE MISTO DE ÁCIDO FÚLVICO E K-SAP SOBRE A REGULAÇÃO METABÓLICA, DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO VEGETAL	112
5.1 RESUMO.....	113
5.2 ABSTRACT.....	114
5.3 INTRODUÇÃO	115
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	117
5.4.1 Condições experimentais para o ensaio com aplicação dos potenciais bioestimulantes mistos	117
5.4.2 Avaliações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas	117
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
5.5.1 Experimento final – potencialidades de diferentes bioestimulantes aplicados via foliar	123
5.6 CONCLUSÕES	140
6. CONCLUSÕES GERAIS	141
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
8. APÊNDICES	171

1. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda global por alimentos tem levado a um uso mais intensivo do solo, resultando no aumento do consumo de fertilizantes químicos (MARTINS, 2021). No entanto, o uso excessivo de fertilizantes e práticas inadequadas de manejo têm causado problemas como erosão do solo, salinização e a perpetuação de abordagens extrativistas. Isso ocorre em um cenário de crescente escassez de recursos naturais e preocupações com a contaminação ambiental (PAHALVI et al., 2021; NADARAJAN & SUKUMARAN, 2021). Nesse contexto, surgiram novos e avançados bioinsumos, como os bioestimulantes e biofertilizantes, que estão sendo adotados na agricultura com o objetivo de promover uma integração harmoniosa entre a produção de alimentos e um manejo sustentável do solo, em respeito ao meio ambiente. (AMMAR et al., 2022; SAVY & COZZOLINO, 2022).

Os bioestimulantes estão sendo cada vez mais incorporados aos sistemas de produção agrícola com a finalidade de ajustar os processos fisiológicos das plantas, visando aprimorar a produtividade. Notavelmente, nos últimos vinte anos, os bioestimulantes vegetais, que são derivados de materiais naturais, têm atraído uma atenção significativa tanto da comunidade científica quanto das empresas comerciais. (KHAN et al., 2009; CRAIGIE, 2011; SHARMA et al., 2014; DU JARDIN, 2015; YAKHIN et al., 2017; TRIVEDI et al. 2018; OLAETXEA et al., 2019; GARCÍA et al., 2019; TAVARES et al., 2020; CASTRO et al., 2021,2023). Segundo Du Jardin (2015) um bioestimulante vegetal é definido como qualquer substância ou microrganismo aplicado às plantas com a finalidade de aprimorar a eficiência nutricional, aumentar a tolerância ao estresse abiótico e/ou melhorar as características de qualidade da colheita, independentemente de seu teor de nutrientes.

Os bioestimulantes representam uma abordagem potencialmente inovadora para a regulação e modificação dos processos fisiológicos nas plantas, com o propósito de estimular o crescimento, atenuar os efeitos das limitações causadas pelo estresse e incrementar o rendimento agrícola (YAKHIN et al., 2017). Preferencialmente, os bioestimulantes devem ser classificados de acordo com a respostas fisiológicas desencadeadas nas plantas, e não de acordo com sua composição. O foco dos estudos deve ser na compreensão dos “mecanismos de operação” dos bioestimulantes, como indicado pelos efeitos benéficos gerais na produtividade das plantas. Esses efeitos incluem a melhoria de processos como a fotossíntese, o retardamento da senescência, a regulação de fitohormônios, a captação de nutrientes e água, a regulação gênica, alterações nos ciclos de crescimento e na estrutura das plantas (KHAN et al., 2009; SHARMA et al., 2012; ERTANI et al., 2013).

O interesse na utilização de bioestimulantes à base de substâncias húmicas (SH) em áreas cultivadas já é uma realidade entre os agricultores. Estudos em plantas de arroz, milho, pepino e *arabidopsis*, mostraram que as SH podem provocar uma série de estímulos, incluindo alterações na morfologia, crescimento e arquitetura das raízes, influenciando o desenvolvimento das plantas. Elas também aumentam a taxa respiratória, melhoram a fotossíntese e aumentam a produção de adenosina trifosfato e aminoácidos. Além disso, podem afetar a expressão e/ou supressão de genes, atuam na regulação hormonal e influenciam na atividade de diversas enzimas. Quando aplicadas no solo, as reações das SH resultam em melhorias nos aspectos físicos, químicos e biológicos do sistema, incluindo o aumento da agregação do solo, da porosidade, da capacidade de troca iônica, da complexação de íons tóxicos e da fertilidade. (TREVISAN et al., 2009; MORA et al., 2012; JANNIN et al., 2012; OLAETXEA, 2015; GARCÍA et al; 2016; DE HITA, 2020; CASTRO et al., 2021, 2022).

Os custos associados às substâncias húmicas são geralmente considerados baixos, uma vez que são derivadas de compostos orgânicos e aplicadas em concentrações relativamente

baixas. O potencial dessas substâncias para serem utilizadas na conservação e no manejo de ecossistemas naturais e agrícolas é promissor. No entanto, é necessário realizar estudos que estabeleçam as concentrações ideais de aplicação, os métodos de aplicação adequados e as propriedades a serem avaliadas para orientar a produção e comercialização desses produtos (ARANCON et al., 2006; AMERI & TEHRANIFAR, 2012).

Por outro lado, a economia do mar vem sendo inserida cada vez mais na cadeia produtiva agrária com o objetivo de gerar produtos agrícolas mais limpos e eficientes (TAN & LAMERS, 2021; CAKMAK et al., 2022). O extrato aquoso proveniente de *Kappaphycus alvarezii* é considerado ambientalmente sustentável, biodegradável e não tóxico, não representando uma fonte de poluição para o meio ambiente e sem riscos para seres humanos e animais. Sua aplicação em plantas apresenta diversos benefícios, por meio de regulações gênicas e hormonais, estímulos no desenvolvimento radicular e na absorção de nutrientes, aumento na produção de biomassa e de produtividade. A maioria dos estudos e relatórios descreve os efeitos benéficos do extrato de quando aplicado por pulverização foliar (KARTHIKEYAN & SHANMUGAM, 2017; PATEL et al., 2018; TRIVEDI et al., 2018; KUMAR et al., 2020; TRIVEDI et al., 2021; CASTRO et al., 2023).

O bioestimulante derivado de *K. alvarezii* possui uma pegada de carbono extremamente reduzida, o que pode desempenhar um papel crucial na mitigação do impacto das mudanças climáticas globais causadas pelas emissões agrícolas. Isso o torna uma peça de grande importância, também no contexto das políticas ambientais. Atualmente, o uso de macroalgas na agricultura, principalmente como biofertilizante ou bioestimulante, está despertando um interesse considerável entre os produtores, devido ao seu significativo potencial biotecnológico para aprimorar o desempenho produtivo das plantas cultivadas (CHOJNACKA, SAEID & MICHALAK, 2012; GHOSH et al. 2015; SINGH et al. 2018). Devido ao potencial das algas para serem utilizadas em sistemas de produção mais sustentáveis, como a agricultura orgânica e a agricultura biodinâmica, diversos estudos foram conduzidos para avaliar os efeitos dos bioestimulantes à base de algas em diferentes culturas, incluindo pimenta, alho, arroz e tomate (ZODAPE et al., 2011; PAUDEL et al., 2012; SHALABY & EL-RAMADY, 2014; TARRAF et al., 2015; GARCIA-GONZALEZ & SOMMERFELD, 2015).

Para a utilização dessas substâncias, se faz necessário compreender os modos de ação de produtos químicos agrícolas, o que se tornou um requisito fundamental tanto para a comercialização eficaz quanto, muitas vezes, para a regulamentação de produtos manufaturados utilizados na agricultura. Os contínuos investimentos realizados por entidades comerciais na pesquisa de bioestimulantes e no desenvolvimento de produtos desempenharão um papel crítico na descoberta contínua neste campo. Esses investimentos inevitavelmente levarão à identificação de novos fenômenos biológicos, vias e processos que talvez não tivessem sido descobertos se a categoria de bioestimulantes não existisse ou não fosse considerada legítima (YAKHIN et al., 2017).

Assim, o presente trabalho tem como **hipótese científica**:

H0: não existe uma relação entre a forma de aplicação, concentração e características físico-químicas de bioestimulantes provenientes de substâncias húmicas e extratos de *kappaphycus alvarezii* com os estímulos e modos de ação sobre a regulação gênica, fisiologia, metabolismo, desenvolvimento e produção de plantas;

H1: substâncias húmicas e extrato de *kappaphycus alvarezii* exercem diferentes estímulos sobre os modos de ação, regulação gênica, fisiologia, metabolismo, desenvolvimento e produção de plantas, de acordo com suas características físico-químicas, forma de aplicação e concentração, sendo aditivos com potencial para a produção de um bioestimulante misto.

O estudo foi dividido em três capítulos, identificados a seguir:

Capítulo I - Caracterização, dose vs resposta e bioatividade de diferentes substâncias húmicas em plantas;

Capítulo II - Caracterização, dose vs resposta e bioatividade do extrato de *kappaphycus alvarezii*;

Capítulo III - Potencialidades e efeitos da aplicação foliar de bioestimulante misto de ácido fúlvico e k-sap sobre a regulação metabólica, desenvolvimento e crescimento vegetal.

O **objetivo geral** proposto por este trabalho foi:

Avaliar os efeitos bioestimulantes em plantas de pepino e arroz, de frações húmicas extraídas de vermicomposto e leonardita, de extratos de algas extraídas de *kappaphycus alvarezii*, assim como as suas combinações, aplicados via foliar e/ou radicular, previamente caracterizados.

Os **objetivos específicos** da tese foram:

- a. Obter ácidos húmicos a partir de vermicomposto e de leonardita, assim como ácido fúlvico de vermicomposto, purificados de acordo com a metodologia da IHSS;
- b. Obter extratos aquosos a partir da macroalga *Kappaphycus alvarezii* (K-sap) cultivadas na baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil;
- c. Caracterizar a estrutura e a composição das frações húmicas e os extratos de *kappaphycus alvarezii* (K-sap) mediante a utilização de técnicas espectroscópicas de IVTF e RMN ¹³C PC RAM, assim como como composição elementar e absorção atômica;
- d. Avaliar os modos de ação e estímulos sobre regulações hormonais e gênicas, concentrações de metabólitos solúveis, desempenho fotossintético, absorção e assimilação de nutrientes, desenvolvimento radicular e produção de biomassa em plantas, resultantes da aplicação radicular e/ou foliar de diferentes doses e frações de SH e K-sap;
- e. Relacionar mediante técnicas de quimiométricas as estruturas e fragmentos químicos nas SH e K-sap que são responsáveis pela bioatividade em plantas, isolando e caracterizando as estruturas em interação com as plantas;
- f. Comprovar a eficiência de um bioestimulante misto contendo SH e K-sap, de aplicação via foliar ou radicular, com base em todas as informações obtidas, que seja capaz de melhorar a o desenvolvimento geral das plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bioestimulantes

A definição de bioestimulante introduzida por KAUFFMAN et al. (2007) engloba a seguinte classificação: “Os bioestimulantes estão disponíveis em uma variedade de formulações e com ingredientes variados, mas geralmente são classificados em três grupos principais com base em sua fonte e conteúdo. Esses grupos incluem substâncias húmicas, produtos contendo hormônios e produtos contendo aminoácidos”. Em 2012, a Comissão Europeia atribuiu um estudo sobre bioestimulantes vegetais para avaliar as substâncias e materiais envolvidos, que foi publicado por DU JARDIN (2012), aonde o autor afirma que bioestimulantes vegetais são substâncias e materiais, com exceção de nutrientes e pesticidas, que, quando aplicados para plantas, sementes ou substratos de cultivo em formulações específicas, têm a capacidade de modificar os processos fisiológicos das plantas de uma forma que proporcione benefícios potenciais ao crescimento, desenvolvimento e/ou respostas ao estresse. Três anos depois, uma nova definição foi proposta por DU JARDIN (2015), que foi apoiada por evidências científicas, em que os autores afirmam que um bioestimulante vegetal é qualquer substância ou microrganismo aplicado às plantas com o objetivo de melhorar a eficiência nutricional, a tolerância ao estresse abiótico e/ou características de qualidade da colheita, independentemente do seu conteúdo de nutrientes.

Outros autores afirmam que bioestimulantes são extratos obtidos de matérias-primas orgânicas contendo compostos bioativos, e que os componentes mais comuns dos bioestimulantes são elementos minerais, substâncias húmicas, vitaminas, aminoácidos, quitina, quitosana e poli e oligossacarídeos (HAMZA & SUGGARS, 2001; KAUFFMAN et al. 2007; BULGARI et al., 2015). Do ponto de vista legal, os bioestimulantes podem conter vestígios de hormônios naturais das plantas, mas sua ação biológica não deve ser atribuída a eles; caso contrário, devem ser registrados como reguladores do crescimento de plantas (BULGARI et al., 2015). Segundo Du Jardin (2015), a palavra bioestimulante foi cunhada por especialistas em horticultura para descrever as substâncias que promovem o crescimento de plantas sem serem nutrientes, melhoradores de solo ou pesticidas.

A composição dos bioestimulantes é parcialmente desconhecida devido à complexidade dos extratos e a ampla gama de moléculas contidas na solução, tornando difícil o entendimento de quais são os compostos mais ativos. Os mecanismos ativados pelos bioestimulantes ainda estão sob investigação (ERTANI et al., 2011; GUINAN et al., 2013). Os bioestimulantes devem, preferencialmente, serem classificados com base nas respostas fisiológicas das plantas, e não com base na sua composição (ERTANI et al., 2013). YAHKIN et al. (2017) afirmam que existem poucos produtos bioestimulantes para os quais um local alvo bioquímico específico, um modo de ação e mecanismo de ação conhecidos tenham sido identificados. O “mecanismo de ação” descreve a integral de todos os eventos bioquímicos após a aplicação do bioestimulante, enquanto o “modo de ação” caracteriza as principais características de uma molécula bioativa e sua ação bioquímica específica que leva ao seu efeito nas plantas tratadas (ALIFERIS & JABAJI, 2011). Portanto, o foco deve estar na identificação dos “mecanismos de ação” dos bioestimulantes, conforme indicado pelos impactos positivos gerais na produtividade das plantas através do aprimoramento de processos como fotossíntese, senescência, modulação de fitohormônios, absorção de nutrientes e água, expressão de genes responsáveis pela tolerância a estresses abióticos e alterações na arquitetura e fenologia das plantas (KHAN et al., 2009; SHARMA et al., 2012).

Os bioestimulantes podem atuar diretamente na fisiologia e metabolismo das plantas ou indiretamente pelas melhorias nas condições do solo, podendo ser aplicados no solo ou nas folhas, dependendo de sua composição e dos resultados desejados (NARDI et al., 2009;

KUNICKI et al. 2010). Esses produtos são geralmente aplicados em adição aos tratamentos de fertilização padrão para melhorar a eficiência do uso de nutrientes e a qualidade dos produtos (HECKMAN, 1994). Os bioestimulantes diferem dos fertilizantes porque atuam no metabolismo das plantas, sendo capazes de modificar a fisiologia e morfologia vegetal (NARDI et al., 2006; PETROZZA et al. 2013). O efeito de um bioestimulante pode ser diferente de espécie para espécie, e até de cultivar para cultivar, e depende de fatores ambientais, da dose e tempo de aplicação (KUNICKI et al. 2010). A aplicação de bioestimulantes vegetais é capaz de modificar o metabolismo primário e secundário das plantas (COLLA et al., 2015; ROUPHAEL et al., 2015) levando à síntese e acúmulo de moléculas antioxidantes (metabólitos secundários).

Estudos publicados sugerem que vários bioestimulantes melhoram a produtividade das plantas através do aumento da assimilação de N, C e S (JANNIN et al., 2012, 2013), estímulo na fotossíntese, melhores respostas ao estresse, alteração na senescência e melhor transporte de íons (KHAN et al., 2009; PARADIKOVIC et al., 2011; BHUPENCHANDRA et al., 2020). Também foi relatado que os bioestimulantes aumentam os teores de aminoácidos livres, proteínas, carboidratos, compostos fenólicos, pigmentos e de várias enzimas. O efeito protetor de muitos bioestimulantes contra estresses bióticos e abióticos tem sido associado à regulação nos níveis de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo estresse, à ativação do sistema de defesa antioxidante das plantas ou ao aumento dos níveis de compostos fenólicos (ERTANI et al., 2011, 2013).

Os compostos bioativos presentes em alguns bioestimulantes são propostos para exibir atividade de sinalização em plantas ou induzir vias de sinalização (FORDE & LEA, 2007; IVANOV et al., 2010; ARBONA et al., 2013). Bioestimulantes desenvolvidos a partir de substâncias húmicas, materiais orgânicos complexos, algas marinhas, antitranspirantes, aminoácidos livres, extratos brutos de plantas inferiores e superiores têm demonstrado frequentemente efeito no estado hormonal das plantas (RATHORE et al., 2009; DU JARDIN, 2012; YAKHIN et al., 2012; KUREPIN et al., 2014). Embora compostos semelhantes a hormônios possam estar presentes em bioestimulantes, também é possível que a síntese de hormônios possa ser induzida em plantas tratadas (JANNIN et al., 2012), e que aminoácidos, glicosídeos, polissacarídeos e ácidos orgânicos estejam contidos em muitos bioestimulantes, podendo atuar como precursores ou ativadores de hormônios vegetais endógenos (PARADIKOVIC et al., 2011).

As substâncias húmicas (SH) ocorrem naturalmente em compostos orgânicos poliméricos e são produzidos pela decomposição de materiais orgânicos, sendo o seu uso como bioestimulante bastante estudado nos últimos anos (JANNIN et al., 2012; CANELLAS et al., 2013; BALDOTTO & BALDOTTO, 2014; GARCÍA et al., 2019; TAVARES et al., 2020; CASTRO et al., 2021). O custo de produção das SH é considerado baixo, uma vez que são extraídos de compostos orgânicos e aplicados em baixas concentrações, indicando ser um produto de alto potencial comercial (AMERI & TEHRANIFAR, 2012).

De acordo com um relatório da FAO (2006), uma quantidade substancial de algas (15 milhões de t ano⁻¹) é usada como condicionadores de solo, suplemento de nutrientes e como bioestimulantes na agricultura. A aplicação ocorre principalmente por pulverização foliar e melhoram o crescimento das plantas, a tolerância a salinidade, ao frio e a seca, a atividade fotossintética e a resistência a fungos, bactérias e vírus, melhorando o rendimento e a produtividade de muitas culturas (NORRIE & KEATHLEY, 2006; GAJC-WOLSKA et al., 2013; SHARMA et al., 2014).

Apesar de muitos estudos com bioestimulantes abordarem com um maior foco a aplicação nas raízes de plantas, investigando seus modos de ação e estímulos, principalmente os envolvendo substâncias húmicas, a aplicação direta nas folhas apresenta diversos benefícios para as culturas, sendo necessários mais estudos envolvendo o modo de ação dos bioestimulantes aplicados via foliar (DE HITA et al., 2020; PATEL et al., 2023). Por exemplo,

Kishor et al. (2020) realizaram um estudo que demonstrou a eficácia da aplicação conjunta de ácido húmico tanto via foliar quanto no solo, juntamente com 100% da dose recomendada de fertilizante (NPK) dividido em três parcelas, acompanhada por uma pulverização foliar contendo uma mistura de nutrientes. Esse tratamento se destacou como o mais eficaz e rentável para plantas de café, resultando em um aumento significativo no rendimento das plantas, bem como nos níveis de nutrientes presentes nas folhas, quando comparado com o grupo controle.

De acordo com Kritzinger e Lötze (2019), diversos elementos afetam o desempenho da pulverização foliar, e um deles está relacionado com as características inerentes à própria planta, particularmente no que diz respeito às suas folhas. Devido às características hidrofóbicas das superfícies foliares, é essencial que haja permeabilidade cuticular para permitir o fluxo dos bioestimulantes foliares. As cutículas são, em sua essência, compostas por três estruturas distintas: a camada mais externa, onde as ceras epicuticulares predominam; a camada central composta pela cutina e/ou cutana, e ceras intracuticulares; e, finalmente, a camada mais interna que inclui, além dos biopolímeros mencionados, polissacarídeos provenientes das paredes celulares das células epidérmicas (MOURA et al., 2023).

Os estômatos, lenticelas e tricomas são estruturas presentes nas superfícies vegetais, que têm a capacidade de facilitar a absorção de soluções nutritivas e outros compostos químicos. Os estômatos consistem em pequenos poros especializados formados por duas células-guarda, cujo processo de abertura e fechamento regula as trocas gasosas entre a folha e a atmosfera. As lenticelas são estruturas epidérmicas macroscópicas presentes em caules, pedicelos ou frutos, que também podem absorver soluções aplicadas às partes aéreas das plantas. Os tricomas são apêndices unicelulares ou multicelulares que se projetam a partir da epiderme e podem facilitar a absorção de nutrientes devido à sua reduzida cutinização. (GERARDIN et al. em 2018; EGUIGUREN et al. em 2020).

Naturalmente ocorre a deposição de compostos higroscópicos aplicados na superfície foliar, no entanto, o molhamento e absorção de soluções neste órgão podem também ser estimulados pela inclusão de adjuvantes, que são co-formulantes na solução de bioestimulantes ou fertilizante a ser aplicada. Existem uma variedade de categorias desses produtos, dependendo de como eles operam: adesivos (que aumentam a aderência da solução, garantindo maior resistência à chuva), umectantes (que retardam a secagem da solução ao diminuir o ponto de deliquescência da formulação na folha), surfactantes (que reduzem a tensão superficial), penetrantes (que melhoram a capacidade de penetração nas folhas, facilitando a "solubilização" dos componentes cuticulares), entre outros (MOURA et al. em 2013).

A absorção eficaz por via foliar requer a abertura adequada dos estômatos e temperaturas moderadas, a fim de prevenir possíveis danos, como a queima das folhas. Além disso, deve-se evitar aplicações foliares em dias ventosos e durante períodos de chuva até 4 horas após a pulverização, para não comprometer o molhamento e absorção pelas folhas. Segundo Portu et al. (2015), apesar de todas as vantagens da prática da pulverização foliar, é difícil prever as respostas das plantas, uma vez que a eficácia deste procedimento depende de diversos fatores, tais como: a espécie vegetal em questão, a composição da cutícula foliar, o tempo de aplicação, aspectos fenológicos, condições ambientais, dentre outros. Por tanto, são necessários mais estudos relacionados aos efeitos e modos de ação de bioestimulantes aplicados via foliar em plantas.

2.2 Substâncias Húmicas

A matéria orgânica possui fundamentalmente dois grupos, o das substâncias não-humificadas e o das substâncias húmicas (SH). O primeiro é formado por compostos quimicamente definidos, geralmente incolores, simples e de baixo peso molecular, utilizados como substrato por microrganismos, sendo assim, de existência transitória. Alguns exemplos são os aminoácidos, proteínas, álcoois, ligninas e aldeídos. As SH constituem aproximadamente 60% da matéria orgânica, sendo amplamente distribuídas no planeta, estando presentes no solo, na água e nos sedimentos, e representam o maior reservatório de carbono orgânico da Terra (MUSCOLO et al., 2007; MUSCOLO & SIDARI, 2009).

Musco et al. (2007) afirmam que as SH são formadas por transformação química e biológica de matéria vegetal e animal, e de metabolismo microbiano, resultando em uma estrutura supramolecular composta por moléculas heterogêneas, de coloração escura e maior estabilidade e peso molecular, interagindo em função do seu tamanho, forma, afinidade química e hidrofobicidade (Figura 1).

Piccolo (2016) caracteriza o processo de humificação como dinâmico, ocorrendo interação por forças covalentes, forças de van der Waals, ligações π - π e CH- π , entre biomoléculas, lipídeos, polissacarídeos, DNA, RNA, entre outros, originando uma molécula supraestrutural. Os principais componentes moleculares das substâncias húmicas são os ácidos alifáticos, os éteres, os ésteres, os álcoois, os anéis aromáticos, os polissacarídeos e os polipeptídeos. Embora as ações funcionais dessas substâncias sofram influência direta pela configuração química que apresentam em solução, as relações entre atividade e estrutura não são claras (MORA et al., 2010; CANELLAS et al., 2012) (Figura 1).

As substâncias húmicas são divididas classicamente em três principais frações com distintas características físico-químicas, baseando-se em suas propriedades de solubilidade. São usualmente classificadas como: ácido fúlvico (AF), fração solúvel em meios alcalino e ácido; ácido húmico (AH), fração solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido ($\text{pH} < 2$); e humina, fração insolúvel em qualquer condição de pH (BOTERO, 2010). No entanto, alguns autores defendem que as huminas não satisfazem a definição clássica de substâncias húmicas, pois estas parecem estar compostas por uma mistura complexa de agregados estáveis de biomoléculas e não de material humificado, podendo corresponder basicamente a fragmentos de ácidos húmicos fortemente ligados à fração mineral do solo (SIMPSOM et al., 2007; GARCÍA et al., 2019) (Figura 1).

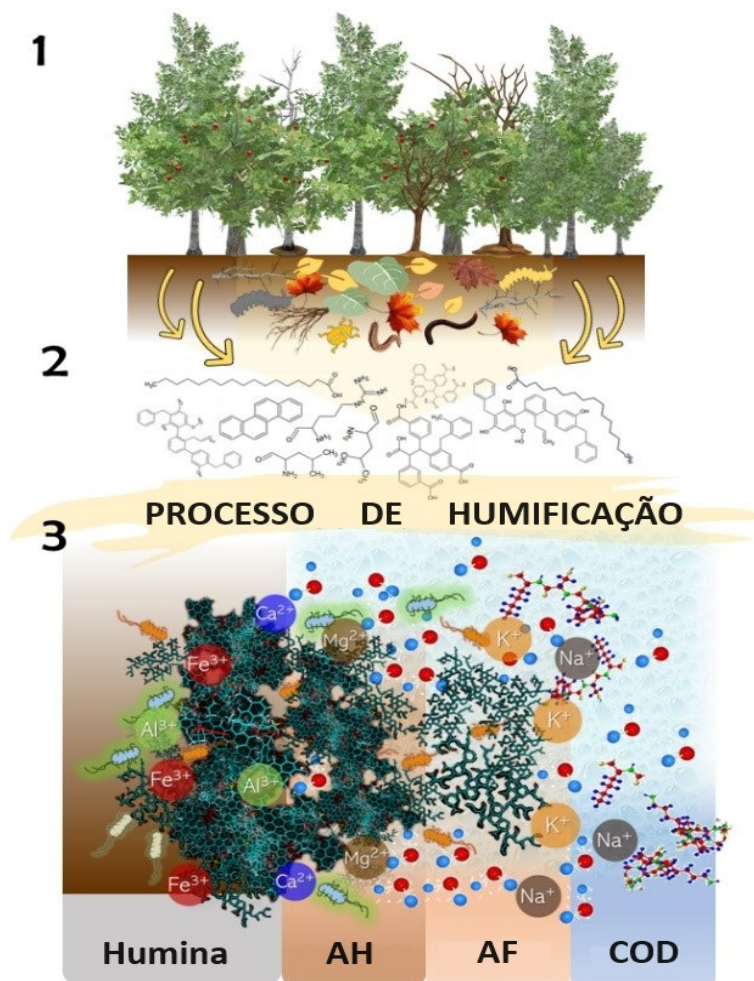


Figura 1. Esquema didático para mostrar a formação de estruturas húmicas supramoleculares a partir da deposição de matéria orgânica no solo. 1) Deposição de detritos vegetais e animais no solo. 2) Incorporação de moléculas orgânicas ao solo, produtos da decomposição e 3) Formação de frações húmicas e carbono orgânico dissolvido. Fonte: retirado e adaptado de Moura et al., (2023).

A possibilidade de isolar a partir da matéria orgânica humificada as frações fundamentais das substâncias húmicas, permitiu o avanço no estudo e conhecimento sobre suas estruturas, propriedades e funções, sendo os ácidos húmicos e ácidos fúlvicos os maiores alvos de interesse e pesquisa. As características relacionadas a estrutura das frações húmicas são dependentes da fonte de origem e do período de formação ou transformação (GARCÍA, 2013).

Processos químicos, físicos e espectroscópicos aplicados com êxito em pesquisas envolvendo macromoléculas têm sido utilizados para estudos com substâncias húmicas, visando estabelecer a composição e estrutura geral da molécula, assim como justificar as diversas propriedades que elas apresentam. Os estudos dessas substâncias vão desde os métodos de extração, fracionamento e purificação até a caracterização. Os métodos de extração mais utilizados são Kononova, Dabin, Danneberg & Ullah, Schnitzer, Swift, Benites e os de purificação são os com ácido fluorídrico (HF), resina DAX-8 e diálise, além do processo de liofilização (PRIMO, MENEZES & SILVA, 2011; CANELLAS et al., 2012). Segundo García (2013) dentre as técnicas de caracterização estruturais mais utilizadas estão: as espectrofotométricas (UV-vis e Fluorescência), as espectroscópicas (FTIR, RMN¹³C e ¹H), as

espectrométricas (espectrometria de massas), as cromatográficas (HPSEC) e as microscópicas (MEV), assim como as diferentes combinações destas.

Mesmo com todas as contradições existentes em relação ao modelo estrutural, algumas características das SH já estão esclarecidas: a) os ácidos húmicos e ácidos fúlvicos são misturas heterogêneas de moléculas polidifusas, com intervalos de massa molar variando de algumas centenas até milhares (STEVENSON, 1982); b) existem alterações na razão entre ácido húmico e ácido fúlvico em função do material de origem. Essa razão está associada ao grau de humificação do mesmo (ROCHA, et al. 1998).

Segundo Sposito (2004), as substâncias húmicas possuem quatro principais propriedades de acordo com a estrutura que apresentam: polifuncionalidade, caracterizada por um grande número de grupos funcionais que proporcionam amplo espectro de reatividade; carga macromolecular negativa, que permite maior reatividade com outras moléculas; hidrofiliabilidade, que corresponde a tendência de formar fortes pontes de hidrogênio com a água; e maleabilidade estrutural, que diz respeito a capacidade de associação intermolecular e alteração na conformação da molécula em função da variação de pH, dos valores de redox, da concentração eletrolítica e da ligação com grupamentos funcionais.

Baldotto & Baldotto (2014) afirmam que dentre as fontes mais comuns para a extração de ácidos húmicos estão “a leonardita, o carvão, o solo, os resíduos de animais, os compostos orgânicos feitos de húmus de minhoca (vermicomposto), de torta de filtro, de esterco bovino, de cama-de-frango, de resíduos de alimentos, de lixo urbano, de lodo e de sedimentos”. Independente da fonte utilizada, é comum observar que concentrações menores de AH apresentam atividade estimulante na fisiologia vegetal, e que elevadas concentrações resultam em inibição do crescimento e desenvolvimento das plantas (BALDOTTO et al., 2009).

Diversos estudos relatam a capacidade de SH em estimular indiretamente o crescimento e desenvolvimento de plantas, associado aos seus efeitos de melhoria nas características químicas, físicas e biológicas do solo, como pelo aumento da agregação do solo, retenção de água, trocas iônicas e complexação de íons tóxicos no solo. São substâncias consideradas bioestimulantes por promoverem o desenvolvimento vegetal por meio de pequenas quantidades. Nas plantas modificam a morfologia, crescimento e a arquitetura das raízes, atuam sobre o desenvolvimento da planta, aumentam a taxa respiratória e estimulam o ciclo de Krebs, a fotossíntese e a produção de adenosina trifosfato e aminoácidos (MUSCOLO et al., 2007; TREVISAN et al., 2009; JANNIN et al., 2012).

2.2.1 Efeitos das substâncias húmicas no sistema radicular de plantas

A raiz é o órgão das plantas responsável pela absorção de água e de nutrientes, pela regulação de alguns hormônios vegetais e pela exsudação de ácidos orgânicos e síntese de aminoácidos. As raízes são, ainda, responsáveis pela sustentação das plantas, pela interação com a rizosfera e pela detecção e resposta a sinais ambientais (MENG et al., 2019; TAVARES et al., 2020).

Segundo Vaughan e Malcolm (1985), as modificações mais evidentes em espécies vegetais por ação das SH estão associadas ao crescimento e desenvolvimento de raízes. De fato, os efeitos mais observados e relatados na literatura pela ação das SH no sistema radicular de plantas envolvem a emissão de raízes laterais e de pêlos radiculares, o alongamento das raízes, o aumento do diâmetro, da área e do volume radicular. Estudos realizados por diversos autores demonstraram a expressão desses efeitos no desenvolvimento radicular com estímulos diferenciados de acordo com a fonte, concentração e característica físico-químicas da SH adicionada (BALDOTTO et al., 2012; DOBBSS et al., 2007; CANELLAS et al., 2011; GARCÍA et al., 2016a; GARCÍA et al., 2019b; TAVARES, 2014; TAVARES, 2020; CASTRO et al., 2021; CASTRO et al., 2022) (Figura 2).

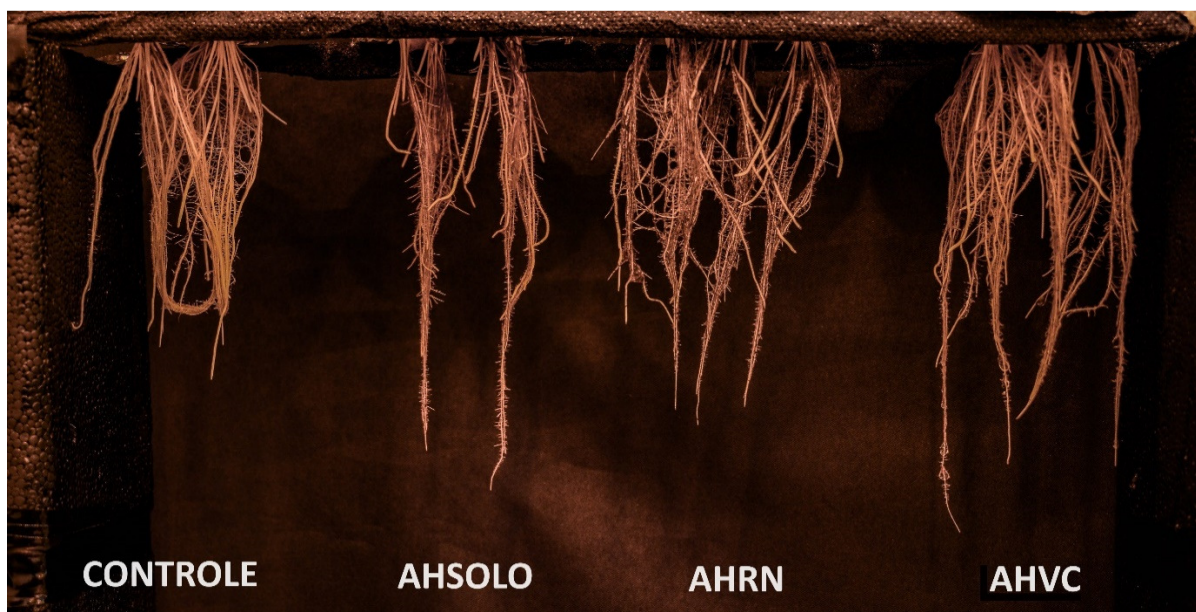


Figura 2. Estímulos sobre o desenvolvimento de raízes de plantas de arroz tratadas via radicular com ácido húmico extraído de organossolo (AHSOLO), de sedimentos do Rio Negro – AM (AHRN) e de vermicomposto (AHVC), em trabalho realizado por Castro et al. (2021). Fonte: próprio autor.

A fonte de onde foram extraídas e a concentração das SH são fatores que afetam diretamente o tipo e a intensidade dos estímulos ao alongamento e emissão de raízes em plantas de milho (*Zea mays*) (ZANDONADI et al., 2007) e de *Arabidopsis* (DOBBSS et al., 2010). Canellas et al. (2002) também observaram aumento na emissão, no alongamento, na área e nos sítios mitóticos de raízes em plantas de milho com a aplicação de ácidos húmicos em diferentes concentrações. Observaram, porém, efeito prejudicial sobre estas variáveis quando foram aplicadas altas concentrações desses ácidos. García et al. (2016) relataram efeitos sobre o comprimento, emissão, diâmetro, área e volume radiculares de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes concentrações de ácido húmico e substância húmica íntegra extraídos de vermicomposto. García et al. (2016b) e Tavares (2014) também observaram que baixas concentrações (40 e 60 mg L⁻¹) de ácidos húmicos extraídos de vermicomposto estimularam em maior intensidade o desenvolvimento de raízes de arroz.

O aumento da área radicular por efeito das SH está diretamente associado ao incremento do comprimento e número de raízes em plantas de milho e café tratadas com SH extraída de lodo da estação de tratamento (FAÇANHA et al., 2002). Schimidt et al. (2007) relataram estímulos ao desenvolvimento radicular de *Arabidopsis* devido ao efeito das SH, expresso pelo aumento da densidade e do comprimento dos pêlos radiculares e da multiplicação de células do córtex e da epiderme. A aplicação de diferentes doses de ácido húmico em plantas de arroz em estágio inicial de desenvolvimento, durante um período de 144 horas, resultou em modificações diferenciadas do sistema radicular, mostrando estímulos mais estáveis em períodos mais longos de interação das SH com as raízes da planta (TAVARES et al., 2020). OJWANG & COOK (2013) sugerem que a interação SH-raízes é capaz de alterar a homogeneidade da membrana radicular, podendo torná-la permeável a fragmentos húmicos de menor tamanho. Autores como CANELLAS et al. (2012), AGUIAR et al. (2013), GARCÍA et al. (2016, 2019) e CASTRO et al. (2021) identificaram correlação entre as estruturas e propriedades encontradas no composto húmico com o tipo e intensidade do estímulo desencadeado no sistema radicular das respectivas plantas estudadas.

Todas as alterações na morfologia, fisiologia e genética molecular de raízes submetidas ao contato com SH resultam em melhorias na eficiência de absorção de água e de nutrientes, e em favorecimento à interação planta-microrganismo, devido ao aumento dos pontos de ligação e colonização das raízes (BALDOTTO & BALDOTTO, 2014). O mecanismo pelo qual as SH interagem com o sistema radicular das plantas constitui um dos pontos mais desconhecidos dentro desta área de estudo. No entanto, de acordo com DOBBS et al. (2007), está claro que, de maneira geral, o estímulo sobre o crescimento e desenvolvimento radicular ocorre pela aplicação de baixas ou intermediárias doses de SH, podendo ser observado até mesmo um efeito inibitório em elevadas concentrações.

2.2.2 Absorção de nutrientes pela ação das substâncias húmicas

Por mais que os mecanismos responsáveis pelo estímulo à absorção de nutrientes pelas plantas tratadas com SH ainda não estejam totalmente definidos, são evidentes os efeitos benéficos dos compostos húmicos na nutrição vegetal. Dentre os efeitos positivos das SH sobre a nutrição mineral das plantas está a capacidade de impulsionar a atividade da enzima H^+ -ATPase da membrana plasmática radicular e a de estimular a absorção de alguns macro e micronutrientes (CANELLAS et al., 2015; JINDO et al., 2016b; TAVARES et al., 2019; ZANIN et al., 2018). O efeito da SH no estímulo à absorção de íons deve-se tanto a efeitos diretos no metabolismo vegetal como também a alterações nas propriedades do solo.

Segundo NARDI et al. (2009), os efeitos das SH na absorção de nutrientes são, possivelmente, mediados por estímulos na síntese e atividade de enzimas presentes na membrana. Diversos autores observaram aumento na extrusão de H^+ em raízes tratadas com SH, associado a melhorias no estado nutricional das plantas, demonstrando o envolvimento da enzima H^+ - ATPase no aumento da absorção de nutrientes por plantas tratadas com composto húmicos (FAÇANHA et al., 2002; JINDO et al., 2012; TAVARES, 2016; ZANDONADI et al., 2007).

Segundo QUAGGIOTTI et al (2004), a aplicação de substâncias húmicas estimula a absorção de nitrato (NO_3^-) por raízes de milho, possivelmente devido à regulação da síntese de RNAm da principal enzima H^+ ATPase de milho, a *Mha2*. Jannin et al. (2012) também verificaram estímulos na absorção e assimilação de NO_3^- em *Brassica napus* L., concomitantemente à expressão de genes que codificam transportadores de NO_3^- . TAVARES et al. (2019) e CASTRO et al. (2021) demonstraram que a aplicação de AH de vermicomposto em plantas de arroz exerceu influência na nutrição vegetal por meio de estímulos no influxo de nitrogênio nas formas de $N-NO_3^-$ e de $N-NH_4^+$.

Há relatos do aumento da disponibilidade de fósforo (P) no solo e, conseqüentemente, dos níveis desse nutriente nas folhas e raízes de plantas, devido à ação de SH (URRUTIA et al., 2013). Em estudo em que houve aplicação de AH em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), ocorreu a expressão de genes que codificam para transportadores de P, além do aumento da biomassa de raízes e dos teores de P foliar (JINDO et al., 2016b). Alguns estudos de expressão gênica têm mostrado que SH aplicadas em plantas de canola (*Brassica napus* L.) regulam componentes do metabolismo do enxofre (S) por meio da regulação dos genes *BnSultr1.1* e *BnSultr1.2*, referentes aos sistemas de transporte desse íon, contribuindo para o aumento dos teores de S em raízes e folhas (JANNIN et al., 2012). Também foi verificado aumento na disponibilidade de ferro (Fe) no solo, devido à formação de complexos solúveis, por efeito de compostos húmicos (VARANINI; PINTON, 2006). Aguirre et al. (2009) observaram que plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) tratadas com SH apresentaram aumento na expressão e atividade da enzima Fe^{+3} -quelato redutase e do transportador de Fe de alta afinidade (*CsIRT1*).

2.2.3 Outros estímulos em plantas pela aplicação de substâncias húmicas

Além dos efeitos das SH no sistema radicular de plantas, pode-se destacar também efeitos positivos na parte aérea. Os ácidos húmicos exercem influência em níveis distintos de organização em diversas etapas relacionadas à fisiologia das plantas, como expressão de genes, metabolismo primário e secundário, crescimento e desenvolvimento, produção de flores, frutos e sementes, e acúmulo de biomassa (JANNIN et al., 2012; TREVISAN, 2011).

Segundo Nannipieri et al. (1993), os efeitos diretos do composto húmico no metabolismo vegetal são resultados: da influência positiva sobre o transporte de íons, facilitando a absorção de nutrientes; do aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas no ciclo de Krebs, aumentando a produção de ATP; do aumento do conteúdo de clorofilas; do aumento da síntese de ácidos nucleicos; do efeito seletivo sobre a síntese proteica; e do estímulo ou inibição da atividade de diversas enzimas.

A aplicação de SH em diferentes espécies de plantas também exerce influência na regulação dos conteúdos de $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$, por meio de modificações na atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase (ZANNIN et al., 2018; 2019). As substâncias húmicas e suas frações resultam em melhoria na eficiência fotossintética, estimulando a biossíntese de clorofilas e carotenoides (BALDOTTO & BALDOTTO, 2014; JANNIN et al., 2012; MORA et al., 2010), além de atuarem no metabolismo do carbono por alterações nas taxas de glicose, frutose e amido (CANELLAS et al., 2013) e por mudanças na atividade da enzima invertase (PIZZEGHELLO et al., 2001). A aplicação de AH em plantas de trigo (*Triticum* spp.) resultou em incremento no conteúdo de lipídeos nos tilacoides e nas membranas fotossintéticas (KULIKOVA et al., 2016).

Na literatura são encontrados diversos relatos que evidenciam o aumento no teor de clorofilas a e b pela aplicação de diferentes tipos de ácidos húmicos em plantas de diversas espécies de interesse econômico, como o abacaxi, gramíneas de clima frio, chicória e alfafa (BALDOTTO et al., 2009; GHOLAMI et al., 2019; KAMYABA et al., 2016; SOFI et al., 2018). Baldotto et al. (2009) relatam que a síntese ou degradação de carotenoides em plantas tratadas com SH não segue um padrão de estímulo, havendo aumento, redução e estabilidade em seu teor, de acordo com a fonte e dose de composto húmico aplicada.

Estudos de expressão gênica, realizados mediante microarray, têm mostrado que AH aplicados em *Brassica napus* regulam componentes do metabolismo de C, N e S por meio de estímulo na expressão dos genes *BnNRT2.1*, *BnSultr1.1* e *BnSultr1.2* (JANNIN et al., 2012), enquanto outros estudos revelam que AH podem regular a atividade de enzimas responsivas ao metabolismo da glicose e dos ácidos tricarbóxicos (NARDI et al., 2007). A aplicação de SH em plantas de milho levou à redução nos teores de glicose e frutose nas folhas e ao aumento da concentração de amido (CANELLAS et al., 2013). Pizzeghello et al. (2001) observaram aumento na atividade da enzima invertase pela aplicação de SH em *Fagus sylvatica* L., favorecendo a formação de hexose a partir da hidrólise de sacarose, dando origem a um substrato disponível para células em desenvolvimento.

Mora et al. (2010) trataram plantas de pepino com AH, via radicular, e verificaram alterações na distribuição de nitrato entre parte aérea e raiz. Os autores concluíram que o aumento da concentração de nitrato na parte aérea está associado ao aumento na concentração de citocininas e poliaminas, resultando em estímulos no crescimento.

De acordo com Olaetxea et al. (2018), as SH estimulam o crescimento vegetal por afetar o balanço hormonal das plantas e ativar promotores de genes responsivos às auxinas (TREVISAN et al., 2010). Pizzeghello et al. (2013) observaram que a aplicação de SH extraídas de leonardita resultou em atividade citocinínica em plantas de rabanete (*Raphanus sativus* L.). Além da conhecida influência das SH na síntese de AIA, estudos mostram que esse incremento na atividade da H^+ -ATPase poderia ser desencadeado pela produção de óxido nítrico pela raiz,

envolvendo consequentemente o AIA e vias dependentes ou às vezes não dependentes de etileno (ZANDONADI et al., 2010; MORA et al., 2014; OLAETXEA et al., 2019). Mora et al. (2014) mostram que a aplicação de SH causa um aumento na concentração de ABA radicular, dependente de AIA e etileno (MORA et al. 2014). De Hita et al. (2020) mostrou que aplicação radicular e foliar de ácido húmico estimula o desenvolvimento de plantas de pepino por meio de regulação hormonal envolvendo o ácido jasmônico.

2.2.4 Ação das substâncias húmicas em condições de estresse vegetal

O estresse vegetal pode ser definido como uma condição ambiental que impossibilita a planta de atingir seu máximo potencial genético (TAIZ et al., 2017). O estresse corresponde a causa primária de decréscimo na taxa de crescimento e produtividade das plantas (LAWLOR & CORNIC, 2002), podendo ser classificado como estresses abióticos (fatores edafoclimáticos) e estresses bióticos (insetos fitoparasitas e microrganismos fitopatogênicos). Diversos estudos têm demonstrado os efeitos positivos, diretos e indiretos, da aplicação de substâncias húmicas em plantas cultivadas sob condições adversas.

De acordo com Vellini et al. (2008), a disponibilidade de água é o fator ambiental que mais limita a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, afetando cerca de 64% de toda região cultivável do planeta (CRAMER et al., 2011). Segundo TAIZ et al. (2017), o déficit hídrico pode ocasionar transtornos fisiológicos e bioquímicos nas plantas em nível primário (diminuição do potencial hídrico e desidratação celular) e secundário (redução da expansão celular e foliar, diminuição das atividades celulares e metabólicas, fechamento estomático, inibição fotossintética, abscisão foliar, alteração na partição de carbono, cavitação, desestabilização de membranas e proteínas, produção de EROs, citotoxicidade iônica e morte celular). Os ácidos húmicos e fúlvicos têm demonstrado capacidade de reduzir os efeitos negativos resultantes da baixa disponibilidade de água em diferentes espécies de plantas. A aplicação de SH em plantas submetidas a essas condições exerce influência no sistema de defesa oxidativo, no crescimento vegetal, nos teores de pigmentos fotossintéticos e nos teores de prolina (AGUIAR et al., 2016; GARCÍA et al., 2012; GARCÍA et al., 2014b).

A aplicação de diferentes doses de AH no sistema radicular de plantas de arroz sob déficit hídrico, demonstrou efeitos de proteção antiestresse, comprovado pelas alterações na atividade das peroxidases (POX) e pelos baixos níveis de peróxido de hidrogênio e de malondialdeído, quando comparadas às plantas sob estresse hídrico e sem aplicação de AH (GARCÍA, 2013). Aguiar et al. (2016) realizaram trabalho em que foi aplicado SH em plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob déficit hídrico e observaram aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalases e peroxidases no metabolismo oxidativo.

Os efeitos de proteção das substâncias húmicas contra o estresse hídrico ocorrem por meio da regulação das enzimas do sistema oxidativo, responsáveis por balancear os níveis endógenos de EROs em folhas e raízes. As SH evitam que ocorra um acúmulo de espécies reativas de oxigênio ao ponto de desencadear peroxidação e desnaturação dos tecidos vegetais. As alterações nos níveis de EROs durante o estágio inicial de resposta ao estresse levam à fosforilação e desfosforilação de fatores de transcrição diferentes, podendo atuar como fator de sinalização para aclimatação frente ao estresse (GARCÍA et al., 2012; GARCÍA et al., 2014b; TAIZ et al., 2017).

Castro et al. (2022) realizaram experimento em que plantas de arroz foram submetidas ao estresse hídrico e aplicação de ácido húmico extraído de vermicomposto, os autores observaram que plantas sob escassez hídrica tratadas com AHVC produziram maior biomassa do que plantas apenas sobre estresse hídrico, por meio de alterações na arquitetura radicular e regulações no metabolismo de N e C (Figura 3).

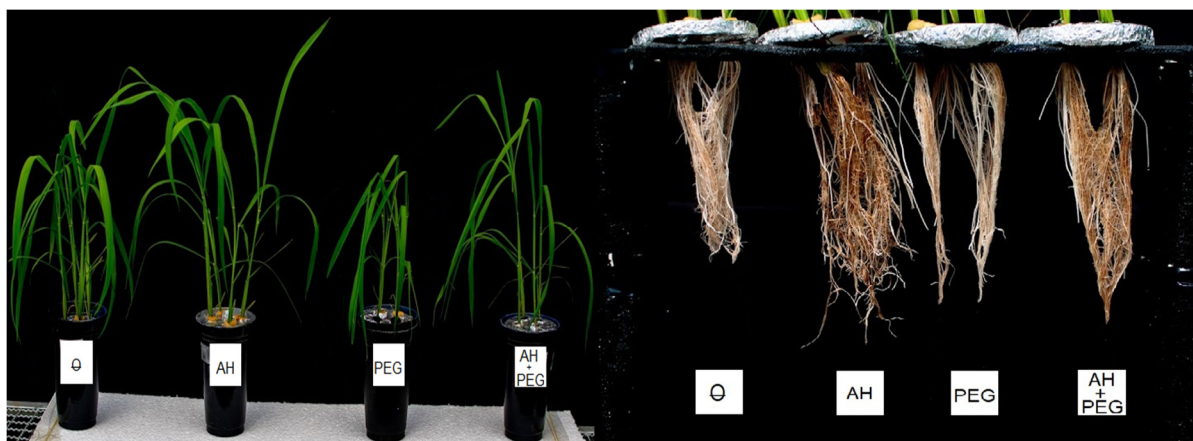


Figura 3. Estímulo ao desenvolvimento em plantas de arroz pela aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH) em condições de estresse hídrico induzido por polietilenoglicol (PEG), em estudo conduzido por Castro et al. (2022). Fonte: Próprio Autor.

O processo de salinização de um solo está ligado à qualidade da água usada na irrigação, à existência e nível de drenagem natural e/ou artificial do solo, à profundidade do lençol freático e à concentração original de sais no perfil do solo (VIEIRA, 2014). Os efeitos imediatos da salinidade sobre os vegetais são a seca fisiológica, proveniente do decréscimo do componente osmótico do potencial hídrico do solo; o desequilíbrio nutricional, devido ao aumento da concentração de íons, inibindo a absorção de outros nutrientes; e o efeito tóxico de certos íons em elevadas concentrações, como o cloro, sódio e boro (ERTHAL et al., 2010; SILVA et al., 2013). As SH podem melhorar os efeitos negativos do estresse salino em plantas, estimulando o desenvolvimento de raízes, modificando a captação de minerais e reduzindo o tamanho da membrana plasmática. Esse efeito foi observado em plantas de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) cuja aplicação de AH interferiu positivamente nos parâmetros de produção das plantas cultivadas em condições salinas (PARKSOY et al., 2010).

Asik et al. (2009) relatam melhorias na absorção de nutrientes em plantas de trigo (*Triticum durum* cv. Salihli) submetidas a estresse salino com a aplicação de SH, via raiz e folhas, incluindo aumento na absorção de macro e micronutrientes. A aplicação de SH em solos salinos ($EC = 12,86 \text{ dS m}^{-1}$) melhorou as respostas de defesa antiestresse do algodão (*Gossypium barbadense* L.), resultando em melhor desenvolvimento das plantas devido a efeitos indiretos (alterações favoráveis nas propriedades químicas do solo) e a efeitos diretos (estímulo na absorção de nutrientes, regulação osmótica nas plantas e ação sobre o crescimento) (RADY et al., 2016). Estímulos positivos à produção de prolina, absorção de nutrientes, estabilidade da membrana e crescimento de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas em condições de elevada salinidade em resposta à aplicação de SH também é relatado (AYDIN et al., 2012).

Outra fonte de estresse para as plantas é a contaminação do solo por metais pesados, sendo este também um sério problema que afeta o meio ambiente e intensificado ao longo dos anos devido ao crescimento industrial (SILVA et al., 2014). Os sintomas de toxidez por metais pesados em plantas são resultados de alterações nos processos metabólicos, sendo responsáveis por perda de eficiência fotossintética e redução do crescimento (ADRIANO et al., 1971; PARMAR et al., 2013). As SH podem melhorar as propriedades de solos contaminados com metais pesados devido às suas características físico-químicas, que permitem a formação de compostos complexos com íons metálicos. Segundo Schnitzler (1978), maiores quantidades de grupamentos funcionais oxigenados em SH são responsáveis pelo aumento da interação com metais pesados. Devem ser ressaltados três aspectos da interação SH-metal pesado: a

diversidade de sítios de ligação presentes no composto húmico, a variabilidade estereoquímica das reações e a presença de interações eletrostáticas (KOOPAL et al., 2001).

Os sistemas endógenos de defesa das plantas à fitotoxidez por metais pesados podem ser reforçados pela aplicação de SH. Para lidar com os efeitos negativos dos metais pesados nas plantas, diversos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos são mobilizados para atuarem na eliminação das espécies reativas de oxigênio (CANELLAS et al., 2015). Sergiev et al. (2013) constataram que após aplicação de SH em triticale (*Triticosecale Wittmack*) cultivado em solo contaminado com metais pesados, a atividade de enzimas envolvidas na eliminação oxidativa foi reduzida em comparação às plantas tratadas apenas com metal pesado, indicando que o composto húmico atuou sobre mecanismos regulatórios de proteção.

2.2.5 Modos de ação das substâncias húmicas

Existem muitos estudos mostrando os estímulos positivos das SH no metabolismo, crescimento e desenvolvimento de plantas, no entanto ainda não houve total consenso na padronização dos modos de ação pelo qual essas substâncias exercem seus efeitos. Diversos autores propõem que o início de ação das SH esteja relacionado à dissociação da supraestrutura húmica e subsequente disponibilização das frações bioativas e de fragmentos húmicos que mimetizam os hormônios vegetais, havendo interação destas moléculas com as raízes, resultando na regulação das vias de sinalização hormonal (RUSSEL et al., 2006; DOBBS et al., 2010; MUSCOLO et al., 2013).

A concepção do arranjo supraestrutural das SH indica que compostos capazes de regular e estimular o crescimento vegetal estejam unidos à estrutura húmica (ROSA, 2001). Puglisi et al. (2008) observaram aumento na exsudação de ácido orgânico em plantas de milho submetidas à aplicação de substâncias húmicas. A liberação de prótons e ácidos orgânicos na rizosfera resultam em alteração de pH neste meio, possibilitando a dissociação da supraestrutura húmica e subsequente disponibilização das frações bioativas, de outra forma indisponíveis (RUSSELL et al., 2006). Estudos apontam, quanto à atuação celular e molecular das SH, para um estímulo na atividade e síntese de enzimas H^+ ATPases da membrana plasmática, em um efeito semelhante ao auxínico (FAÇANHA et al., 2002; JINDO et al., 2012).

A extrusão de prótons pelas H^+ ATPases membranares está envolvida diretamente em dois mecanismos essenciais para o desenvolvimento das plantas: a energização de sistemas secundários de transportes de íons, essencial para absorção de nutrientes; e o aumento da plasticidade da parede celular, fator fundamental para o crescimento vegetal (RAYLE; CLELAND, 1992). O segundo mecanismo está relacionado com a teoria do crescimento ácido por efeito auxínico, uma vez que o bombeamento de prótons pelas H^+ ATPases resulta na acidificação e afrouxamento da parede celular por atividade enzimática, favorecendo a expansão celular e o crescimento da planta (FAÇANHA et al., 2002).

Por outro lado, estudos demonstraram que a aplicação de SH resulta em um tipo de “estresse brando” na planta, havendo aglomeração e deposição de fragmentos húmicos na superfície das raízes, sendo este nível de estresse capaz de melhorar as funções metabólicas por meio de regulações no metabolismo oxidativo e de resposta antiestresse (ASLI & NEUMANN, 2010; GARCÍA, et al., 2012; GARCÍA et al., 2014b). Petrov et al. (2015) afirmam que alguns níveis de estresse podem resultar em melhorias no metabolismo da planta, sendo esta condição denominada como “eustresse”. Castro et al. (2021, 2022) observou um distúrbio inicial causado pela aplicação de ácidos húmicos extraídos de diferentes fontes, identificado por redução do desempenho fotossintético seguido dias após por um aumento da eficiência fotoquímica, justificado pelo estímulo das atividades metabólicas da planta como forma de aclimação ao “estresse” detectado.

Asli e Neumann (2010) classificam o tipo de estresse ocasionado pelas SH em espécies vegetais como um “estresse coloidal”, uma vez que a deposição da suspensão coloidal (SH) na superfície das raízes resulta em alterações metabólicas na planta. García et al. (2012, 2014b) observaram que a aplicação de ácido húmico extraído de vermicomposto em plantas de arroz resultou em um estresse coloidal, afirmando que esse fenômeno possivelmente foi responsável pela regulação dos níveis de EROs, por meio da atividade de enzimas associadas ao metabolismo oxidativo das plantas e pelo aumento do desenvolvimento radicular. García et al. (2014b) relataram que as SH influenciam na atividade das enzimas peroxidase e superoxidodismutase do sistema oxidativo, regulando os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os efeitos na peroxidação de lipídeos (GARCÍA et al., 2014b) (Figura 4).

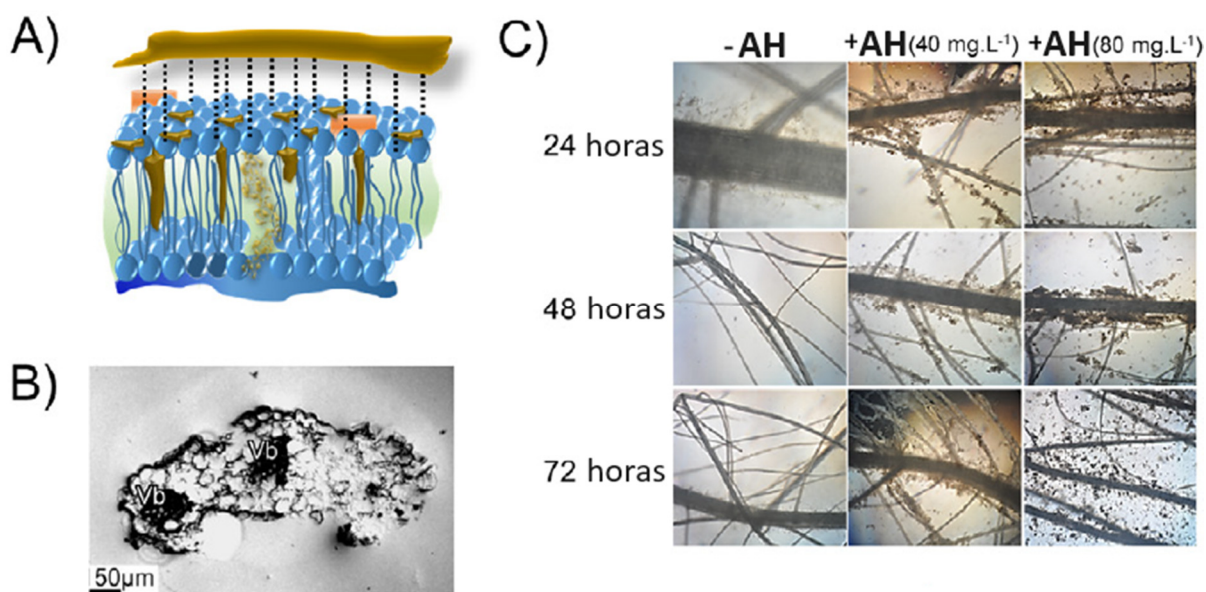


Figura 4. (A) Interações químicas de ácidos húmicos e membrana radicular; (B) Acúmulo de estruturas húmicas nas raízes; (C) Aglomeramento de ácido húmico nas concentrações de 40 e 80 mg L⁻¹ em raízes após 24, 48 e 72 horas de aplicação. Fonte: Retirado e adaptado de García et al. (2019).

Os modos de ação das SH na sinalização, seja hormonal ou pela regulação dos níveis de EROS, podem resultar em estímulos positivos no crescimento, desenvolvimento e no metabolismo de defesa das plantas (BERBARA & GARCÍA, 2014). Segundo García et al. (2018), as características estruturais das SH podem explicar suas interações iniciais e seus efeitos no metabolismo vegetal.

2.2.6 Relação estrutura – propriedade – função de substâncias húmicas em plantas

As propriedades que as substâncias húmicas apresentam são dependentes de suas estruturas e possuem influência direta na atividade biológica que exercem em plantas (BERBARA; GARCÍA, 2014). As principais características estruturais da supraestrutura húmica se encontram caracterizadas, no entanto, são necessários mais relatos sobre a relação existente entre as estruturas das SH e sua bioatividade (GARCÍA et al., 2019) (Figura 5).

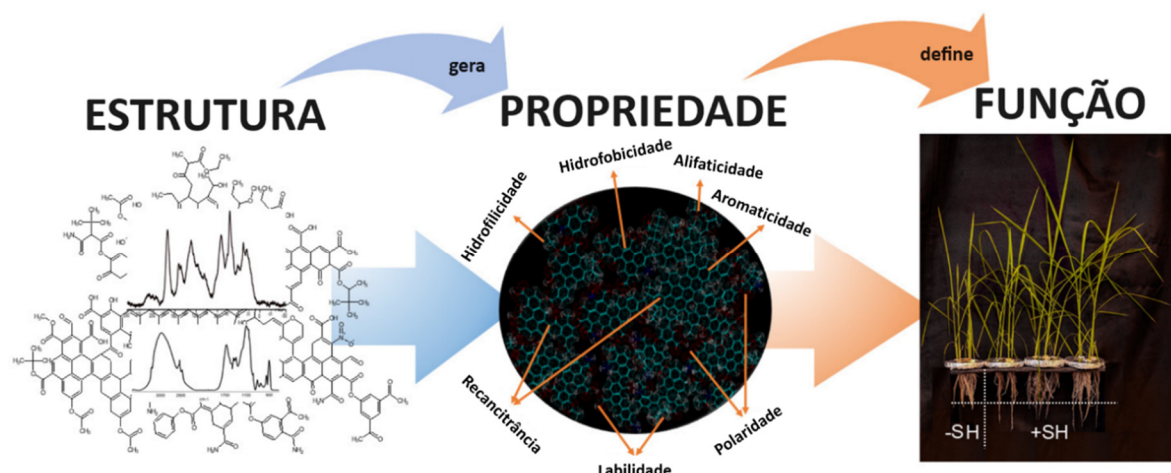


Figura 5. Metodologia esquemática para estudo dos efeitos das substâncias húmicas (SH) nas plantas com base na relação entre estrutura, propriedades e função. Fonte: retirado e adaptado de García et al. (2019).

Canellas et al. (2010) afirmam que a bioatividade das SH exercida sobre o sistema radicular está relacionada com a mobilidade e diversidade estrutural dessas substâncias. Alguns autores mostraram que o balanço estrutural entre os componentes polares e apolares presentes nas SH define propriedades como labilidade e recalcitrância, e são os parâmetros que mais influenciam a atividade biológica destes compostos em plantas (GARCÍA et al., 2016a; 2019b).

Em trabalho realizado por García et al. (2016a, 2016b) em plantas de arroz, os autores observaram, entre outros fatores, que as estruturas de AH contendo predomínio de cadeias alifáticas não funcionalizadas, carbonilas e carboxilas, estão correlacionadas com o número e alongamento de raízes de menor diâmetro, enquanto estruturas aromáticas e cadeias alifáticas funcionalizadas associaram-se ao alongamento de raízes de maior diâmetro. Esses autores também observaram, de maneira geral, estímulo à emissão de novas raízes pelas SH em que predominavam compostos alifáticos e oxigenados, e estímulo ao alongamento radicular pelo caráter mais aromático dessas substâncias.

García et al. (2012, 2014b) mostraram que estruturas alifáticas e funcionalizadas com oxigênio em ácidos húmicos parecem ser responsáveis pelos efeitos protetores em plantas de arroz sob baixa disponibilidade de água. A melhoria na germinação de sementes de algumas espécies foi observada pela aplicação de substâncias húmicas com maior teor de fenólicos, hidroxilas e oxigênio (TRAVERSA et al., 2014).

Castro et al. (2021) aplicaram via radicular em plantas de arroz três ácidos húmicos extraídos de diferentes fontes (vermicomposto, organosolo e sedimentos do Rio Negro – AM) com diferenças estruturais e, conseqüentemente, diferentes propriedades. Estes autores observaram que a bioatividade desencadeada em plantas pela aplicação dos três tipos de ácidos húmicos resultou em estímulos diferentes sobre os teores metabólitos solúveis, pigmentos fotossintéticos, arquitetura radicular e produção de biomassa.

Em estudo com plantas de cenoura (*Daucus carota* L.), Muscolo et al. (2007) observaram que a fração húmica de baixo peso molecular, com maior presença de carboxilas e de menor aromaticidade, apresentou interação com as membranas celulares. A aplicação de frações húmicas de menor tamanho molecular e com alta flexibilidade estrutural em plantas de milho aumentou a atividade de enzimas que atuam na glicólise (NARDI et al., 2007). Vaccaro et al. (2009) relataram que plantas de milho (*Zea mays* L.) tiveram o crescimento e atividade de enzimas do metabolismo do nitrogênio estimulados por fragmentos húmicos mais hidrofílicos e menos complexos.

Outro estudo de relação estrutura-função realizado com SH em plantas de milho (*Zea mays*) mostrou, mediante análise quimiométrica, que a presença de estruturas O-alkyl e methoxyl/N alkyl, em conjunto com a propriedade de hidrofobicidade, são determinantes para promover a emissão de raízes laterais (CANELLAS et al., 2012). A utilização de quimiometria e espectroscopia para estudar a relação entre estrutura e bioatividade mostraram uma correlação positiva entre a presença de grupamentos metoxi, cadeias aromáticas substituídas e carboxilas, com o crescimento de plantas de milho (AGUIAR et al., 2013). Scaglia et al. (2016) relataram que a atividade “auxínica” das SH em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) pode ser uma consequência da presença de aminoácidos e ácidos carboxílicos em sua composição.

A utilização de técnicas de caracterização físico-química, referente a moléculas de maior tamanho, vêm sendo cada vez mais implementadas em trabalhos envolvendo substâncias húmicas ao longo dos últimos anos, objetivando estabelecer a estrutura e composição geral da molécula, assim como justificar as diversas propriedades que apresentam. A compreensão das características estruturais, responsáveis por determinada atividade biológica das SH, é essencial para uma melhor explicação dos mecanismos pelos quais essas substâncias exercem seus efeitos.

É indiscutível a ocorrência de diversos efeitos positivos acarretados pelas SH, tanto no solo como nas plantas. Cada vez mais estudos têm sido realizados nesta área, visando compreender os mecanismos pelos quais os AH exercem sua bioatividade. A atividade biológica destas supramoléculas está diretamente associada à sua origem, tamanho molecular, composição, estrutura e concentração. É essencial uma melhor compreensão da relação entre a bioatividade e as características físico-químicas dessas substâncias, para que assim haja uma aplicação efetiva e objetiva na produção e desenvolvimento agrícola.

2.3 Algicultura

As algas marinhas podem ser classificadas, com base nos seus pigmentos fotossintéticos, em três grupos: algas verdes (*Chlorophyta*), algas marrons (*Phaeophyta*) e algas vermelhas (*Rhodophyta*). Dentre elas, as algas vermelhas compreendem mais de 60% das 30 mil toneladas de algas cultivadas no mundo (FAO, 2018). As algas são responsáveis por importantes funções no ambiente, compondo um grupo de organismos muito diversificado que abrange as microalgas e macroalgas (AZEREDO, 2012), existem em um variado número de classes e são distinguidas, principalmente, pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular (SCHMITZ et al., 2012), sendo uma importante fonte de alimento, principalmente em países asiáticos como China, Japão e Coreia (MARSHAM et al. 2007; RIOUX et al. 2009), fertilizantes e combustíveis (MONDAL et al. 2017). Além disso, muitos relatos foram publicados sobre compostos isolados de algas marinhas com várias atividades biológicas, demonstrando sua capacidade de produzir metabólitos diferentes daqueles encontrados em espécies terrestres (CARDOZO et al. 2007; FERNANDES et al. 2014).

A algicultura marinha tem grande capacidade de produção de biomassa em curto espaço de tempo, estudos mostram que esta macroalga cresce de 3,8% a 8,7% ao dia sem a utilização quaisquer nutrientes. As algas também absorvem nutrientes e metais pesados em locais poluídos, servem de abrigo a outros organismos marinhos, reduzem ações de ondas em zonas costeiras, retiram o gás carbônico da atmosfera, geram empregos, renda e negócios para as comunidades litorâneas (UNICAMP, 2020). A atividade de cultivo de algas marinhas transformou a vida de dezenas de milhares de produtores de algas como resultado de seus ganhos econômicos derivados da agricultura (VALDERRAMA et al. 2013) (Figura 6).

As algas vermelhas tem alta demanda por conta de seu polissacarídeo de parede celular, sendo a fonte mais importante de carragena no mundo (BIXLER & PORSE, 2011), com aplicações comerciais incluindo gelificantes, espessantes e estabilizantes, especialmente em

alimentos congelados e sobremesas como gelatinas, pudins, além de queijos e creme de leite. Esse tipo de carragenina é usado em uma ampla gama de aplicações em alimentos processados, cosméticos, produtos de higiene pessoal, ingredientes farmacêuticos e ração animal (CAMPBELL E HOTCHKISS, 2017; LOUREIRO et al. 2017). As carragenas possuem estrutura semelhante à da celulose e estão presentes tanto na parede celular quanto em espaços intracelulares nesta espécie, tendo a função de proteger a alga de impactos da água, além de proteger contra o ressecamento (MOZART et al., 2020) (Figura 6).

No entanto, após quatro décadas de bons retornos econômicos, a agronomia marinha de algas produtoras de carragenina enfrenta uma série de novos desafios (não muito diferente da história da agricultura terrestre), apresentando gargalos e necessidades vitais da indústria para apoiar seu potencial de crescimento (BUSCHMANN et al., 2017). As razões atribuídas ao declínio da produção de algas marinhas incluíram a natureza intensiva das atividades agrícolas, má gestão agrícola, introdução de espécies não indígenas em novos locais agrícolas e alterações climáticas (COTTIER-COOK, et al. 2016). O fato de que os volumes totais relatados de algas vermelhas cultivadas continuaram a aumentar deveu-se a ainda mais fazendas de carragenófitas sendo estabelecidas em todo o mundo (HAYASHI, et al. 2017) (Figura 6).



Figura 6. Cultivo de *Kappaphicus alvarezii* na baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil.
Foto: Andrés Calderín García.

Atualmente, o uso de algas na agricultura terrestre, especialmente como biofertilizante ou bioestimulante, tem despertado o interesse de muitos produtores pelo seu potencial biotecnológico, com o intuito de melhorar o desempenho produtivo de plantas cultivadas (CHOJNACKA, SAEID & MICHALAK, 2012). Uma ampla gama de compostos bioestimulantes foi identificada em extratos de macroalgas, incluindo aminoácidos, polissacarídeos, vitaminas, ácidos graxos, elementos minerais, fenólicos e vestígios de fitohormônios (KAPOORE et al., 2021). Devido ao potencial das algas para uso em sistemas de produção mais sustentáveis como a agricultura orgânica e a agricultura biodinâmica, uma série de trabalhos foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito de bioestimulantes à base de algas em algumas culturas (ZODAPE et al., 2011; PAUDEL et al., 2012; SHALABY & EL-RAMADY, 2014; TARRAF et al., 2015; GARCIA-GONZALEZ & SOMMERFELD, 2015).

2.3.1 *Kappaphycus alvarezii*

A macroalga *Kappaphycus alvarezii* é uma espécie *Eukaryota* pertencente ao Reino *Plantae*, Subreino *Biliphyta*, Filo *Rhodophyta*, Subfilo *Rhodophytina*, Classe *Florideophyceae*, subclasse *Rhodymeniophycidae*, Ordem *Gigartinales*, Família *Areschougiaceae* e Gênero *Kappaphycus*, podendo alcançar até 100 cm de comprimento (GUIRY & GUIRY, 2008). Seus pigmentos fotossintéticos são as clorofilas *a* e *d* e as ficobilinas, com predominância da ficoeritrina. A cor das espécies varia desde rosa a negra, porém o predomínio é da cor avermelhada (LEE, 1989) (Figura 7A).

Os cultivos de *Kappaphycus alvarezii* iniciados nas Filipinas na década de 70 modificaram o cenário mundial da indústria de ficocolóides em 10 anos (ARECES, 1995) e empregaram mais de 60 mil famílias. O sucesso da maricultura de *Kappaphycus* inspirou a propagação para diversas regiões do mundo, como Estados Unidos, Japão, Cuba, Venezuela e Brasil (PICKERING et al., 2007). Este sucesso foi devido principalmente às características das espécies cultivadas, como rápido crescimento e metodologias simples de cultivo, com base na propagação vegetativa (MONDAL et al. 2014).

O extrato de *Kappaphycus alvarezii* (K-sap) é bem caracterizado (SINGH et al. 2016), contendo micro e macronutrientes, especialmente potássio, antioxidantes, fitohormônios, compostos de amônio quaternário como glicina betaína, colina, diversos aminoácidos e provavelmente várias outras moléculas ainda não identificadas, possivelmente ativando vias de sinalização, que sinergicamente podem alterar os processos fisiológicos da planta (KUMAR et al., 2020). Em geral, a *Kappaphycus alvarezii* é composta em média por 50,8% de carboidratos, 3,3% de proteínas, 3,3% de lipídios, 15,6% de cinzas, 12,4% de grupos sulfatados e 3,0% de aromáticos insolúveis (MASARIN et al., 2016; SOLORZANO-CHAVEZ et al., 2019). A fração lipídica é majoritariamente composta por ácidos gordos saturados (64,28%). Além disso, a *Kappaphycus alvarezii* apresenta aminoácidos essenciais, até 43% do teor total de aminoácidos, em especial fenilalanina, leucina e treonina (PEZESHK et al., 2019) (Figura 7B).

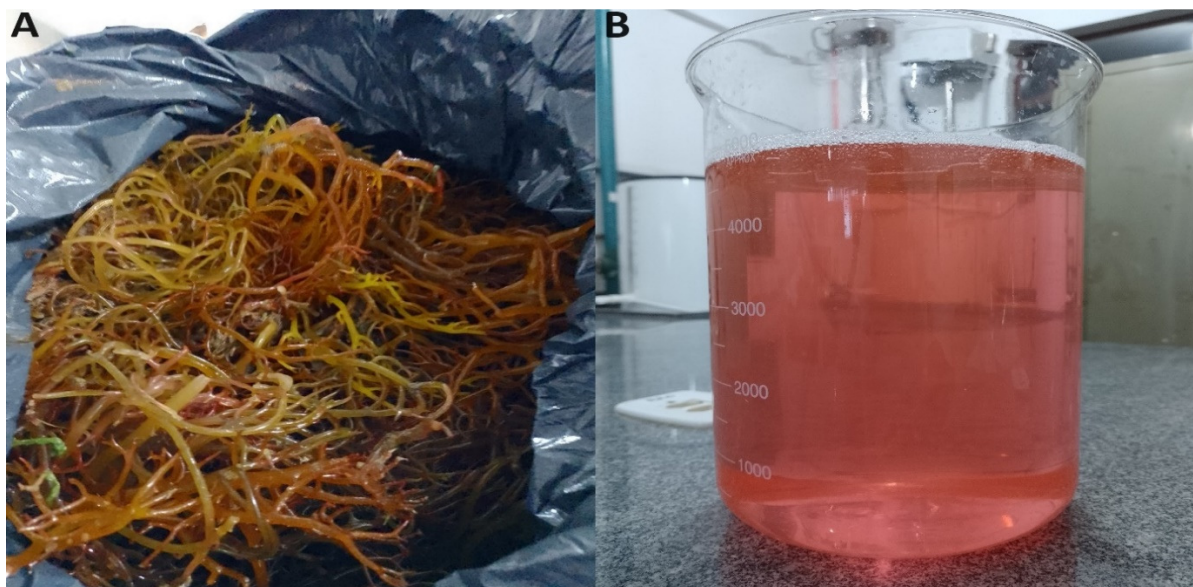


Figura 7. (A) *Kappaphycus alvarezii* recém colhida; (B) Extrato líquido de *Kappaphycus alvarezii* (K-sap). Fotos: próprio autor.

A extração de compostos alvo de *Kappaphycus alvarezii* pode ser realizada por métodos convencionais ou não convencionais. Os procedimentos convencionais são métodos bem estabelecidos, como maceração, percolação e Soxhlet, caso contrário, a extração líquida

pressurizada, extração subcrítica com água, extração com fluido supercrítico, extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom, estão dentro dos procedimentos não convencionais. Esses métodos alternativos apresentam várias vantagens sobre os convencionais, como alto rendimento, uso restrito de solvente orgânico, processo rápido e baixa temperatura, seletividade e custo, que resultam principalmente em processos ecologicamente corretos (RUDKE et al., 2020).

O extrato obtido de *K. alvarezii* tem uma pegada de carbono muito baixa (GHOSH et al. 2015). Assim, pode ser determinante na redução do impacto das mudanças climáticas globais que ocorrem por conta das emissões agrícolas e, portanto, assume uma enorme importância também no nível das políticas (SINGH et al. 2018). Recentes pesquisas mostram que o extrato de *Kappaphycus alvarezii* têm potencial bioestimulante para promover o desenvolvimento e crescimento geral das plantas, juntamente com maior tolerância à estresses (SHARMA et al., 2014; BLANKE & HINMAN, 2016; MICHALAK et al., 2017). Os extratos de algas marinhas aumentam o desenvolvimento radicular (CROUCH E VAN STADEN, 1992; CASTRO et al., 2023), o conteúdo de clorofila foliar (BLUNDEN et al., 1996), o número de folhas (RAYIRATH et al., 2008) e o conteúdo de flavonoides das plantas tratadas (FAN et al., 2011). Extratos líquidos obtidos de algas marinhas recentemente ganharam importância com pulverizações foliares para muitas culturas, incluindo várias gramíneas, cereais, flores e outras espécies vegetais (KARTHIKEYAN & SHANMUGAM, 2017).

2.3.2 Bioatividade de K-sap em plantas

É bem conhecido que o extrato líquido obtido pela expulsão mecânica da alga fresca *Kappaphycus alvarezii* (K-sap) é um potente bioestimulante vegetal com capacidade comprovada de aumentar o crescimento e a qualidade de várias culturas. Sua aplicação em plantas promove a germinação mais rápida das sementes, aumenta o rendimento da colheita, melhora qualidade das sementes, tem baixa emissão de carbono e é de baixo custo. Até onde sabemos, a maioria dos relatórios descreve o efeito de melhoria do K-sap quando aplicado como pulverização foliar, mas não como irrigação (TRIVEDI et al. 2018).

Karthikeyan e Shanmugam (2014) testaram a eficácia em 27 hortaliças diferentes com a aplicação foliar da alga *K. alvarezii*. A aplicação de 3 a 4 aplicações foliares com base no ciclo da cultura melhorou o crescimento, o rendimento e a qualidade do produto. Observou-se um aumento de 11% a 52% nos níveis de rendimento para diferentes culturas hortícolas. Triverdi et al. (2018) relataram que K-sap aplicado foliarmente mostrou ser eficaz em melhorar o efeito do estresse de umidade do solo de baixo a severo, com alterações associadas em vários processos fisiológicos relacionados a pigmentos, fotossíntese, fotoinibição, peroxidação lipídica, sistema de defesa antioxidante e espécies reativas de oxigênio em plantas de milho.

Após extensos testes de aplicação foliar com a seiva de *Kappaphycus alvarezii*, foi observado um aumento significativo nos rendimentos de batata (26%), cana-de-açúcar (30–40%), arroz em casca (15–30%) e milho (25–35%) (PRASAD et al. 2010; MONDAL et al. 2014; LAYEK et al. 2015). Estudos realizados por Shah et al. (2013) revelaram que o rendimento de grãos do trigo aumentou significativamente em 19,74% e 13,16% para plantas que receberam concentrações de 7,5% e 5,0% de *Kappaphycus alvarezii* e *Gracilaria edulis* sap., respectivamente, sobre o controle pulverizado com água. A melhoria do rendimento e da qualidade da grama verde foi relatada por Pramanick et al. (2013) com a aplicação de seiva de algas marinhas na forma de pulverização foliar em diferentes concentrações. O maior rendimento de grãos foi obtido com a aplicação de 15% de seiva de *Kappaphycus*, seguido de 15% de seiva de *Gracilaria* resultando em um aumento de 38,97% e 33,58% de rendimento de grãos, respectivamente, em relação ao controle. Leindah, Devi & Mani (2015) relataram

aumento no rendimento de arroz em 11,80% e 9,52% para aplicação de extrato de *Kappaphycus alvarezii* e *Gracilaria edulis* sap.

Melhorias na produtividade e qualidade de muitas culturas foram relatadas por meio da aplicação foliar de seiva (extrato líquido de alga marinha) de *K. alvarezii* (ZODAPE et al. 2010; SHAH et al. 2013). Rathore et al. (2009) relataram um aumento de 57% no rendimento da soja, sob condições de sequeiro em relação ao controle, após a aplicação de 15% de extrato de algas marinhas *Kappaphycus*. Dwivedi et al. (2014) relataram uma melhoria de 49,2 e 37,8% no rendimento de grama preta em relação ao controle após a aplicação de 15% de *Kappaphycus* e *Gracilaria* seiva em combinação com fertilizantes minerais, respectivamente. Em cana-de-açúcar, o uso de K-sap à 1% aumentou a produtividade em cerca de 25% em quatro colheitas (UNICAMP, 2021).

Diversas pesquisas atribuíram parte dos impactos dos extratos de *Kappaphycus* nas plantas à presença de fitohormônios em sua formulação (CRAIG, 2011). Quando a seiva de *K. alvarezii* é aplicada em plantas, ela desencadeia respostas de estímulo em plantações de arroz, batata e milho, devido à presença e concentrações adequadas de AIA (PRAMANICK et al., 2017; PRAMANICK et al., 2020; KUMAR et al., 2020; GARAI et al., 2021). É plausível que o estímulo proporcionado pela seiva de *Kappaphycus alvarezii* no crescimento das plantas derive do equilíbrio na quantidade de fitohormônios, pois outras pesquisas confirmaram que a exclusão de giberelina (GA_3) do extrato aprimora sua eficácia no milho (MONDAL et al., 2015). Por outro lado, estudos recentes demonstraram uma caracterização completa através de perfis metabólicos, nos quais foram identificados outros compostos responsáveis pela atividade em plantas, como cinetina, sulfabenzamida, proteínas e lipídios, além de fitohormônios, fotoprotetores, substâncias que conferem resistência a doenças, antioxidantes, bem como propriedades anti-herbivoria. Todos esses elementos, quando combinados, têm a capacidade de estimular o crescimento e desenvolvimento das plantas (VAGHELA et al., 2022).

Em plantas de milho submetidas a condições de escassez de água e tratadas com um extrato de *Kappaphycus alvarezii* a uma concentração de 10%, observou-se a regulação de mais de mil genes como resultado da influência do extrato de algas. Dentre esses genes, 380 genes foram ativados, enquanto 631 genes foram inibidos. Essas respostas genéticas estão relacionadas ao metabolismo de nitrogênio (transporte de NO_3^-), fotossíntese, H^+ -ATPase e síntese de ácido abscísico (ABA) (TRIVEDI et al., 2021). Em plantas de trigo expostas a condições de estresse salino e tratadas com o extrato de *Kappaphycus alvarezii*, houve uma proteção da membrana celular, impedindo a fuga de eletrólitos. Isso resultou na redução de parâmetros de estresse, como a quantidade de espécies reativas de oxigênio, níveis de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (PATEL et al., 2018). No caso de plantas de milho que receberam aplicações foliares de extratos aquosos de *Kappaphycus alvarezii* diluído a 10%, observou-se um aumento no rendimento e nos parâmetros relacionados ao número de grãos por espiga e ao comprimento da espiga. Simultaneamente, ocorreu uma diminuição das espécies reativas de oxigênio (ROS) e um aumento na atividade enzimática de regulação redox nas plantas (TRIVEDI et al., 2018).

É bastante claro que haverá muitas necessidades de insumos, como fertilizantes, bioestimulantes e bio-pesticidas para o futuro, práticas sustentáveis se fazem cada vez mais necessárias, esta é a hora da agronomia de algas marinhas atingir seu potencial global máximo (COTTIER-COOK et al. 2016; BUSCHMANN et al. 2017).

3. CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO, DOSE VS RESPOSTA E BIOATIVIDADE DE DIFERENTES SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM PLANTAS

3.1 RESUMO

A atividade biológica das substâncias húmicas (SH) é influenciada pela matéria de origem, tamanho molecular, concentração, estrutura e composição. Diversos métodos têm sido empregados na pesquisa das SH, com o propósito de desvendar sua estrutura molecular e composição, bem como justificar as propriedades e ação bioativa que apresentam. Visto que estudos de diferentes perspectivas sobre os mecanismos de ação são conduzidos com SH provenientes de fontes variadas, é desafiador concluir qual é o principal gatilho para todos esses efeitos metabólico-bioquímicos. Nesse contexto, este capítulo visou à caracterização do ácido húmico de vermicomposto (AHVC), ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) e ácido húmico de leonardita (AHCHECO), por meio de análises composicionais, espectroscópicas e de absorção atômica, bem como à discussão dos impactos dessas SH na regulação gênica e hormonal, absorção e acumulação de nutrientes, crescimento radicular e produção de biomassa em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade *nippombare* e de pepino (*Cucumis sativus*) da variedade *Ashley*. No experimento 1, foram estudadas as doses mais promissoras de AFVC aplicado via radicular no desenvolvimento de raízes (quantidade, comprimento, diâmetro, bifurcações, área e volume radicular). No experimento 2, foram estudadas as doses mais promissoras de AFVC aplicado via foliar no desenvolvimento radicular e acúmulo de biomassa fresca e seca de raízes, bainhas e folhas. No experimento 3, foram aplicados AHVC, AFVC e AHCHECO via radicular em concentrações de 50 e 100 mg L⁻¹, e avaliadas a expressão de genes de raízes envolvidos na absorção e assimilação de nutrientes, teores de fitohormônios, acúmulo de nutrientes, desenvolvimento radicular e produção de massa fresca e seca, comparando com a literatura e elucidando diferentes modos de ação desencadeados pelas SH em plantas. O AFVC apresenta a menor relação C/N, menor condensação aromática, maiores quantidades de estruturas carboxílicas e menor hidrofobicidade, o que o classifica como uma fração húmica com propriedades químicas mais reativas. Por outro lado, o AHCHECO exibe a maior relação C/N, maior condensação aromática, maiores quantidades de estruturas aromáticas não funcionalizadas e maior hidrofobicidade, caracterizando-o como a fração húmica com propriedades químicas mais estáveis. A aplicação radicular do AFVC demonstrou um aumento significativo no desenvolvimento das raízes nas doses de 40 e 60 mg L⁻¹, especialmente nas 72-96 horas após o início dos tratamentos. A aplicação foliar de AFVC na dose de 80 mg L⁻¹ contribuiu de maneira mais significativa para o desenvolvimento das raízes, bem como para a produção de biomassa fresca e seca das plantas. Em ambos os experimentos, doses mais elevadas inibiram o desenvolvimento e crescimento das plantas. O AHVC, AFVC e AHCHECO estimularam o crescimento vegetal, embora tenham agido de maneira distinta em termos de intensidade e momento. A aplicação radicular do AFVC a 50 mg L⁻¹ resultou em plantas com um melhor desenvolvimento radicular e um maior acúmulo de biomassa, mediado pela regulação gênica e hormonal, além de promover a absorção de nutrientes. Após 120 horas da aplicação das substâncias húmicas via radicular a 50 mg L⁻¹ em plantas de pepino, os genes *CsSultr1.2*, *CsNRT1.2A* e *CsIRT1*, juntamente com as quantidades de ácido salicílico e citocininas nos tecidos vegetais, mantiveram-se em níveis semelhantes aos observados por outros pesquisadores às 24 e 72 horas após a aplicação.

Palavras-chave: Ácidos húmicos. Ácidos fúlvicos. Espectroscopia. Modo de ação. Bioatividade.

3.2 ABSTRACT

The biological activity of humic substances (HS) is influenced by the source material, molecular size, concentration, structure and composition. Several methods have been used in HS research, with the purpose of unveiling their molecular structure and composition, as well as justifying the properties and bioactive action they present. Since studies from different perspectives on the mechanisms of action were conducted with HS from different sources, it is challenging to conclude which is the main trigger for all these metabolic-biochemical effects. In this context, this chapter aimed to characterize vermicompost humic acid (HAVC), vermicompost fulvic acid (FAVC) and leonardite humic acid (HACHECO), through compositional, spectroscopic and atomic absorption analyses, as well as, discussing the impacts of these HS on gene and hormonal regulation, absorption and accumulation of nutrients, root growth and biomass production in rice plants (*Oryza sativa* L.) of the *nippombare* variety and cucumber (*Cucumis sativus*) of the *Ashley* variety, helping to understand the(s) mode(s) of action of humic substances in plants. In experiment 1, the most promising doses of FAVC applied via root in root development were studied (quantity, length, diameter, bifurcations, area and root volume). In experiment 2, the most promising doses of FAVC applied via foliar development in development were studied. root and accumulation of fresh and dry biomass of roots, sheaths and leaves. In experiment 3, HAVC, AFVC and HACHECO were applied via the roots at concentrations of 50 and 100 mg L⁻¹, and the expression of root genes involved in absorption was evaluated. assimilation of nutrients, phytohormone levels, nutrient accumulation, root development and production of fresh and dry mass, comparing with the literature and elucidating different modes of action triggered by HS in plants. FAVC presents the lowest C/N ratio, lowest aromatic condensation, greater amounts of carboxylic structures and lower hydrophobicity, which classifies it as a humic fraction with more reactive chemical properties. On the other hand, HACHECO exhibits the highest C/N ratio, greater aromatic condensation, greater amounts of non-functionalized aromatic structures and greater hydrophobicity, characterizing it as the humic fraction with more stable chemical properties. Root application of FAVC demonstrated a significant increase in root development at doses of 40 and 60 mg L⁻¹, especially 72-96 hours after the start of treatments. Foliar application of FAVC at a dose of 80 mg L⁻¹ contributed more significantly to root development, as well as to the production of fresh and dry plant biomass. In both experiments, higher doses inhibited plant development and growth. HAVC, FAVC and HACHECO stimulated plant growth, although they acted differently in terms of intensity and moment. Root application of FAVC at 50 mg L⁻¹ resulted in plants with better root development and greater biomass accumulation, mediated by gene and hormonal regulation, in addition to promoting nutrient absorption. After 120 hours of application of humic substances via roots at 50 mg L⁻¹ in cucumber plants, the *CsSultr1.2*, *CsNRT1.2A* and *CsIRT1* genes, together with the amounts of salicylic acid and cytokinins in plant tissues, remained at levels similar to those observed by other researchers at 24 and 72 hours after application.

Keywords: Humic acids. Fulvic acids. Spectroscopy. Mode of action. Bioactivity.

3.3 INTRODUÇÃO

Devido a sua organização estrutural, as substâncias húmicas são caracterizadas como supramoléculas, apresentando estruturas hidrofóbicas e hidrofílicas. A organização e arranjo estrutural supramolecular destas substâncias é o resultado da organização desuniforme de moléculas heterogêneas, interagindo de acordo com seu tamanho, forma, afinidade química e hidrofobicidade (GARCÍA, 2013). Segundo Baldotto & Baldotto (2014), o vermicomposto e a leonardita estão entre as fontes mais utilizadas para a extração de substâncias húmicas.

Diversos processos têm sido utilizados para estudos com substâncias húmicas, objetivando estabelecer a estrutura e composição molecular, assim como justificar as propriedades e bioatividade que elas apresentam. Os estudos dessas substâncias vão desde os métodos de extração, fracionamento e purificação até a caracterização. Os métodos de extração mais utilizados são Kononova, Dabin, Danneberg & Ullah, Schnitzer, Swift, Benites, e os de purificação são os com ácido fluorídrico (HF), resina DAX-8, diálise e liofilização (PRIMO, MENEZES & SILVA, 2011; CANELLAS et al., 2012). Segundo García (2013) dentre as técnicas de caracterização estruturais mais utilizadas estão: as espectrofotométricas, as espectroscópicas, as espectrométricas, as cromatográficas e as microscópicas, assim como as diferentes combinações destas.

A atividade biológica das substâncias húmicas depende do material de origem, tamanho molecular, concentração, estrutura e composição (BALDOTTO & BALDOTTO, 2014). Considerando a regulação transcricional de redes genéticas, alguns estudos afirmam que a aplicação de SH afeta certos fatores de transcrição envolvidos na absorção radicular e subsequente metabolismo de diferentes nutrientes, mostrando efeitos positivos no metabolismo vegetal e no desenvolvimento radicular das plantas (AGUIRRE et al., 2009; OLAETXEA et al., 2015; OLAETXEA et al., 2019; GARCÍA et al., 2019; TAVARES et al., 2020; CASTRO et al., 2021).

Os efeitos diretos das SH em plantas envolvem efeitos locais nas membranas das células vegetais da raiz e/ou da parte aérea que, conseqüentemente, produzem alterações moleculares e bioquímicas nos níveis transcricional e pós-transcricional dentro da planta (DE HITA et al., 2020). Existem algumas visões que tentam explicar a ação das substâncias húmicas em plantas. O primeiro ponto de vista considera que a ação na raiz da planta, e portanto em toda a planta, é mediada pela possível presença de concentrações significativas de hormônios vegetais na sua composição (NARDI et al., 2002; CANELLAS et al., 2008; ZANDONADI et al., 2013) ou em alguns casos pela presença de moléculas com configuração de grupo atômico-funcional semelhante a certos hormônios vegetais, principalmente auxinas, que poderiam desencadear o mesmo efeito do hormônio vegetal real (TREVISAN et al., 2010; CANELLAS et al., 2011). Por outro lado, alguns estudos realizados por outros autores mostram que a aplicação de SH (de origem sedimentar) sem a presença de concentrações detectáveis de hormônios vegetais em sua estrutura também pode desencadear essas respostas moleculares e bioquímicas (MORA et al. 2010; 2012; 2014).

Outros autores mostraram que a aplicação de SH no sistema radicular de plantas resulta em um tipo de “estresse brando”, havendo deposição de fragmentos húmicos na superfície radicular, classificado como um estresse coloidal, sendo este nível de estresse capaz de melhorar as funções metabólicas por meio de regulações dos níveis de EROs e atividade de enzimas associadas ao metabolismo oxidativo das plantas (ASLI & NEUMANN, 2010; GARCÍA, et al., 2012; GARCÍA et al., 2014). Castro et al. (2021, 2022) mostraram que aplicação radicular de ácido húmicos extraídos de diferentes fontes desencadeia inicialmente redução do desempenho fotossintético com posterior aumento, resultando em plantas com maior desenvolvimento e acúmulo de biomassa. Os autores classificaram este efeito como um “eustresse”, uma vez que a redução inicial da eficiência fotossintética mostra um efeito

estressante, levando à um aumento da atividade metabólica como forma de adaptação ao “evento estressante” detectado pela planta.

Estudos realizados por diversos autores também têm mostrado e comprovado que as estruturas e propriedades das substâncias húmicas exercem efeito direto sobre a bioatividade que desencadeiam em plantas. García et al. (2012, 2014) mostraram que estruturas alifáticas e funcionalizadas com oxigênio em ácidos húmicos parecem ser responsáveis pelos efeitos protetores em plantas de arroz sob déficit hídrico. A germinação de sementes de diferentes espécies foi observada pela aplicação de substâncias húmicas com maior teor de fenólicos, hidroxilas e oxigênio (TRAVERSA et al., 2014). Em trabalho realizado por García et al. (2016a, 2016b) em plantas de arroz, os autores observaram que as estruturas de AH contendo predomínio de cadeias alifáticas não funcionalizadas, carbonilas e carboxilas, estão correlacionadas com o número e alongamento de raízes de menor diâmetro, enquanto estruturas aromáticas e cadeias alifáticas funcionalizadas associaram-se ao alongamento de raízes de maior diâmetro. A aplicação de ácidos húmicos, com diferentes estruturas e propriedades, em plantas de arroz resultou em estímulos diferenciados sobre os metabólitos solúveis, pigmentos fotossintéticos, arquitetura radicular e produção de biomassa (CASTRO et al., 2021).

Considerando que as pesquisas que sustentam diferentes pontos de vista sobre o modo de ação são realizadas com SH de diferentes origens é bastante difícil concluir qual é o principal mecanismo que desencadeia todos estes efeitos metabólico-bioquímicos. Por outro lado, pode ser possível que cada tipo de SH atue de sua própria maneira ou de mais de uma maneira.

Dentro deste contexto, este capítulo teve como objetivo caracterizar composicional e estruturalmente ácido húmico de vermicomposto (AHVC), ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) e ácido húmico de leonardita (AHCHECO), utilizando técnicas de análises composicional e espectroscópica, assim como discutir os efeitos dessas SH no metabolismo, morfologia e desenvolvimento da cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade nippombare e do pepino (*Cucumis sativus*) da variedade Ashley, auxiliando na compreensão do(s) modo(s) de ação das substâncias húmicas em plantas.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Caracterização físico-química dos compostos húmicos

a) Material de partida para obtenção das substâncias húmicas

As frações húmicas utilizadas no estudo foram obtidas a partir de vermicomposto (AHVC e AFVC) e de leonardita (AHCHECO). O ácido húmico de vermicomposto e o fúlvico de vermicomposto foram extraídos a partir do produto da vermicompostagem de esterco bovino processado por minhocas vermelhas africanas (*Eudrilus eugeniae* spp.) durante aproximadamente 90 dias, na Fazendinha Agroecológica do km 47, Seropédica-RJ. O AHCHECO foi extraído na Facultad de Ciencias da Universidad de Navarra, obtido a partir de leonardita de origem tcheca.

b) Fracionamento e purificação das substâncias húmicas

As SH foram obtidas seguindo a metodologia da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (SISH) e de acordo com o protocolo metodológico descrito por Swift (1996). Resumidamente, para a obtenção das frações húmicas a partir dos materiais de origem, após pré-tratamento com HCl, uma dissolução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ foi adicionada à uma massa do material em proporções de 10:1 (v:m) sob atmosfera de N₂ e em agitação por 24 h. Em seguida o material foi centrifugado a 10.000 g durante 30 minutos e recolhido o sobrenadante que contém as frações de substâncias húmicas correspondentes aos ácidos húmicos e aos ácidos fúlvicos. Para a separação por precipitação do AH, a um volume de SH (AF+AH) obtida no passo anterior, lhe foi ajustado o pH até 2.0 mediante gotejamento de uma dissolução de HCl (6 mol L⁻¹) e mantido em repouso durante 16 horas, após este período o material foi centrifugado a 5.000 g por 10 min e o sobrenadante (AF) foi sifonado e estocado para posterior purificação, este processo foi repetido por três vezes. Para remover os sólidos solúveis em suspensão, os AH foram redissolvidos em uma dissolução de KOH (0,1 mol. L⁻¹) e adicionado KCl até atingir-se uma concentração de 0,3 mol. L⁻¹ de K⁺, e em seguida centrifugado a 4.000 g durante 15 min.

Posteriormente, a purificação dos AH foi realizada mediante adição de uma dissolução de HF (0,3 mol. L⁻¹) + HCl (0,1 mol. L⁻¹) e agitação por 24 horas a 5.000 g, este processo foi repetido até atingir um conteúdo de cinzas menor que 1% (Schnitzer, 1982). Em seguida, os AH foram dialisados utilizando água deionizada usando membrana SPECTRA/POR[®] 7 dialysis tubing, 1 kD, até a condutividade eléctrica da água deionizada não apresentar valores superiores a 1 µS. Após este processo, os AH foram congelados em freezer a -80 °C e posteriormente liofilizados.

Para a purificação do ácido fúlvico, o sobrenadante provenientes da extração da fração de ácidos húmicos foram submetidos à filtração e posteriormente passados pela coluna de resina não iônica XAD-7, que adsorve o ácido fúlvico. O conteúdo retido na resina foi posteriormente eluído com uma solução NaOH 0,1 mol.L⁻¹, seguida da adição de mais um volume da coluna com a solução alcalina. Lavou-se com 3 volumes de água deionizada e o eluído foi submetido a uma resina de troca catiônica fortemente ácida, Amberlyst 15, na forma protonada. A solução resultante foi armazenada em freezer -80 °C e posteriormente liofilizada.

c) Caracterização espectroscópica por ressonância magnética nuclear isótopo do ^{13}C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (RMN ^{13}C PC RAM)

As substâncias húmicas foram caracterizadas pela espectroscopia por ressonância magnética nuclear do isótopo do ^{13}C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP MAS ^{13}C -NMR), realizada no aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ^{13}C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, as amostras dos materiais humificados foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO_2) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8 ± 1 kHz. Os espectros foram obtidos pela coleta de 2048 data points para o mesmo número de scans a um tempo de aquisição de 34 ms e com recycle delay de 5s. O tempo de contato para a sequência em rampa de 1H ramp foi de 2 ms. A coleta e elaboração espectral foram realizadas utilizando o Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (DLI) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz.

As regiões dos espectros foram integradas para a obtenção da quantidade relativa de estruturas, assim as regiões foram divididas em: alquil – C (CALq-H,R): 0-46 ppm; metoxilas e N–alquil C (CALq-O,N): 46–59 ppm; O–alquil C (CALq-O): 59–91 ppm; di–O–alquil C (carbono anoméricos) (CALq-di-O): 91–110 ppm; carbono aromático (CAr-H,R): 110–142 ppm; O–aromático C (CAr-O): 142–156 ppm; carboxila C (CCOO-H,R): 156–186 ppm e carbonilas C (CC=O): 186-230 ppm.

A aromaticidade foi calculada segundo a fórmula: $(\text{CAr-H,R}) + (\text{CAr-O}) * 100 / \text{área total}$, assim a alifaticidade foi calculada como: $100 - \text{Aromaticidade} (\%)$. O índice de hidrofobicidade (HB/HI) foi calculado como segue: $(0 \text{ ppm}-46 \text{ ppm}) + (110 \text{ ppm}-156 \text{ ppm}) / (46 \text{ ppm}-110 \text{ ppm}) + (156 \text{ ppm}-186 \text{ ppm})$. Para o índice de polaridade foi utilizada a formula a seguir: $(\text{CCOO-H,R}) + (\text{CC=O}) + (\text{CALq-O,N}) / (\text{CAr-H,R}) + (\text{CALq-H,R})$. O trabalho com os espectros foi realizado utilizando o Software ACD/Labs v.12.01.

d) Caracterização espectroscópica mediante reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

Os espectros foram obtidos mediante registro na região de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} , coletando em cada medição 32 digitalizações. Para isto foi utilizado um espectrômetro FTIR VERTEX 70/70v (Bruker Corporation, Alemanha) acoplado a um dispositivo de reflexão total atenuada (ATR) de platina diamante, consistente em um disco de diamante que funciona como elemento de reflexão interna. Os materiais liofilizados foram colocados no cristal ATR para o registro do espectro. Como espectro branco foi utilizado o registro espectral do ar antes de cada análise. Os espectros foram coletados em uma sala com temperatura próxima de 20°C . A obtenção e registro dos espectros foi realizada mediante software OPUS-Bruker. Os tamanhos hidrodinâmicos e o potencial zeta (ζ -potencial) foram determinados usando uma nanopartícula SZ-100 (HORIBA, Japão). Para avaliar o efeito do pH nos tamanhos hidrodinâmicos e ζ -potencial dos ácidos húmicos, as amostras foram preparadas em água e ajustadas para diferentes valores de pH (2,0 - 9,0), com uma concentração de ácido húmico de 2 mg.mL $^{-1}$. Os valores de pH foram ajustados usando soluções de HCl e NaOH (0,01 M).

e) Caracterização espectroscópica na região do ultravioleta visível (UV-Vis)

Uma massa de 5 mg das substâncias húmicas foi dissolvida em 10 mL de uma solução de NaHCO_3 (0,05 mol L $^{-1}$). Os espectros foram obtidos em um aparelho Shimadzu UV-1800

UV/visible Scanning Spectrophotometer com medições dos valores de absorbância nas regiões de 465 nm e 665 nm, para determinar a relação E465/E665 (E4/E6).

f) Análise da composição elementar (CHNO)

A análise do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas amostras foi realizada por um FlashSmart CHNO. As amostras liofilizadas foram primeiramente trituradas. Aproximadamente 1mg de amostra foi preparado para cada uma das medições e foi repetido duas vezes para cada réplica. O teor de oxigênio foi determinado por diferença.

g) Determinação do teor de nutrientes

As amostras liofilizadas de substâncias húmicas foram homogeneizadas em moinho e as subamostras foram submetidas a uma mistura de: HNO₃ (6,5 mL) e H₂O₂ (2 mL) e digeridas em forno de micro-ondas (Milestone-Ethos). A concentração dos minerais nos tecidos vegetais foi determinada por espectrometria ICP-OES (Thermo Scientific; série iCAB 6000).

3.4.2 Condições experimentais para os ensaios com aplicação de substâncias húmicas

a) Experimento 1 – Dose vs resposta de ácido fúlvico extraído de vermicomposto aplicado via radicular

O experimento foi conduzido no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizado, em Seropédica-RJ. A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade nippombare, cultivado em câmara de crescimento nas seguintes condições: ciclo luminoso de 14/10 h (luz/escuro), fluxo de fótons de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 70% de umidade relativa e temperatura de 26 °C. As sementes de arroz foram desinfestadas previamente com hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas em água. Em seguida, foram transferidas a potes com gaze que continham somente água destilada. Dois dias após a germinação das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland (HOAGLAND E ARNON, 1950) modificada a 1/8 da força iônica total. Após quatro dias foi trocada a solução de Hoagland para 1/4 da força iônica total. Três dias após a última troca de solução, as plantas foram transplantadas para potes de 0,7 L contendo solução de Hoagland a 1/4 força iônica total, sendo renovada a cada três dias até o momento da coleta. Todas as soluções preparadas tinham como fonte de nitrogênio N-NO₃⁻ a 2mM e pH ajustado a 5,6.

Doze dias após a germinação (DAG) ocorreu a aplicação dos tratamentos, repetida aos vinte e dois DAG durante a troca de solução. O experimento teve um total de sete tratamentos, sendo doses crescentes de AFVC: 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg L⁻¹, com vinte repetições e seis momentos de coleta. Ocorreram coletas a cada 24 horas após o início dos testes, durante seis dias.

b) Experimento 2 – Dose vs resposta de ácido fúlvico extraído de vermicomposto aplicado via foliar

O experimento foi conduzido no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizado, em Seropédica-RJ. A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade nippombare, cultivado em câmara de crescimento nas seguintes condições: ciclo luminoso de 14/10 h (luz/escuro), fluxo de fótons de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 70% de umidade relativa e temperatura de 26 °C. As sementes de arroz foram desinfestadas previamente com hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas em água.

Em seguida, foram transferidas a potes com gaze que continham somente água destilada. Dois dias após a germinação das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland (HOAGLAND E ARNON, 1950) modificada a 1/8 da força iônica total. Após quatro dias foi trocada a solução de Hoagland para 1/4 da força iônica total. Três dias após a última troca de solução, as plantas foram transplantadas para potes de 0,7 L contendo solução de Hoagland a 1/4 força iônica total. Três dias após o transplantio houve a troca de solução para 1/2 força iônica total, sendo renovada a cada três dias até o momento da coleta. Todas as soluções preparadas tinham como fonte de nitrogênio $N-NO_3^-$ a 2mM e pH ajustado a 5,6.

Dezenove DAG ocorreu a aplicação dos tratamentos, repetida aos vinte e dois DAG durante a troca de solução. Foi aplicado um volume diretamente nas folhas até atingir o ponto de gotejo, sendo de 8 mL (primeira aplicação) e 10 mL (segunda aplicação) por unidade experimental. O experimento teve um total de seis tratamentos, sendo doses crescentes de AFVC: 0, 20, 40, 60, 80 e 100 mg L⁻¹, com quarenta repetições. A coleta aconteceu às 72 horas após a segunda aplicação, sendo 25 DAG.

c) Experimento 3 – Mecanismos envolvidos na bioatividade de substâncias húmicas em plantas

As sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.) da variedade Ashley foram germinadas em água com 1mM de CaSO₄, no escuro, sobre perlita e papel filtro umedecido em câmara de germinação. Uma semana após a germinação, as plantas foram transferidas para recipientes de 7 L em solução hidropônica. A solução nutritiva utilizada foi: 0,63 mM de K₂SO₄; 0,5 mM de KH₂PO₄; 0,5 mM de CaSO₄; 0,30 mM de MgSO₄; 0,25 mM de KNO₃; 0,05 mM de KCl e 0,87 mM de Mg(NO₃)₂; 40 uM de H₃BO₃; 4 uM de MnSO₄; 2 uM de CuSO₄; 4 uM de ZnSO₄ e 1,4 uM de Na₂MoO₄. A solução nutritiva continha 40 µM de ferro como EDDHA quelato (80% de isômero orto-orto). Nenhuma precipitação de espécies inorgânicas de Fe foi observada ao longo do experimento. O pH das soluções nutritivas foi mantido em 6,0 e não se alterou significativamente durante o experimento. Todos os experimentos foram realizados em câmara de crescimento a 28/21 °C, umidade relativa de 70-75% e fotoperíodo, dia/noite, de 15/9 h (irradiância: 250 µmol m⁻² s⁻¹). Após 10 dias de crescimento das plantas, foram aplicados seis tratamentos por aplicação via radicular: tratamento controle, que recebeu apenas a solução nutritiva, AHVC 50 mg L⁻¹, AHVC 100 mg L⁻¹, AFVC 50 mg L⁻¹, AFVC 100 mg L⁻¹, AHCHCO 50 mg L⁻¹ e AHCHCO 100 mg L⁻¹. As plantas foram coletadas aos 22 DAG, correspondente a 120 horas após a aplicação dos tratamentos. Uma parte do material vegetal foi pesada, para massa fresca da parte aérea e massa fresca da raiz, e seca (60 °C) para determinação da massa seca da parte aérea e massa seca da raiz, e outra parte foi congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para posterior análise. Todas as determinações foram realizadas com cinco repetições.

d) Análises estatísticas

Os delineamentos experimentais adotados foram inteiramente casualizados. As análises estatísticas foram realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5 e no software estatístico R. Os testes de médias serão feitos por tukey (p<0,05), e os gráficos foram elaborados no programa Sigmaplot 12.0 e Microsoft Excel 365. O trabalho com os espectros será realizado utilizando o Software ACD/Labs v.12.01.

3.4.3 Avaliações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas

a) Determinação da biomassa fresca e seca

Para avaliação da massa fresca foram separadas folhas, caules e o sistema radicular de cada planta e pesadas utilizando balança digital de precisão. Em seguida, as amostras foram armazenadas em envelopes de papel e transferidas para estufa secadora, permanecendo assim por 72 horas à 60 °C. Passado esse período, foram pesadas as massas secas do sistema radicular e das partes aéreas utilizando balança digital de precisão.

b) Análise de desenvolvimento do sistema radicular

A avaliação do desenvolvimento das raízes das plantas mediante os diferentes parâmetros foi realizada de acordo com Tavares (2014). Resumidamente, o sistema radicular das plântulas de arroz foi quantificado mediante distribuição uniforme em uma camada de água em bandeja transparente de acrílico (30 cm x 20 cm) para a digitalização em resolução de 600 dpi. Foi utilizado um sistema de digitalização Epson Expression 10000XL com uma unidade de luz adicional (ULA) onde as imagens das raízes foram convertidas para um formato em tons de cinza de oito bits. Os limites das imagens foram definidos e então importados para o software WinRHIZO, 2012b (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.) para análise dos caracteres da raiz e sua quantificação. As imagens foram analisadas usando um grid de calibração com uma escala de referência, e foram alteradas as configurações de entrada para raízes pálidas em um fundo preto (WinRhizo Arabidopsis 2012b). Em seguida os dados foram gerados através do software XLRhizo (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.).

Foram analisados e quantificados diferentes parâmetros radiculares: número de raízes e de bifurcações, comprimento médio (mm), área de superfície (mm²), diâmetro médio (mm) e volume (mm³). Também será definido e medido o número de raízes mediante classificação em classes quanto ao diâmetro: finas (> 1,5 mm), médias (1,5 - 3,5 mm) e grossas (> 3,5 mm).

c) Análise da composição elementar (CHNO) em raízes e parte aérea das plantas

A análise do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas amostras de raiz e parte aérea foi realizada por um FlashSmart CHNS. As amostras secas foram primeiramente trituradas. Aproximadamente 1mg de amostra foi preparado para cada uma das medições e foi repetido duas vezes para cada repetição. O teor de oxigênio foi determinado por diferença (base livre de cinzas).

d) Determinação dos nutrientes minerais em tecidos vegetais por ICP-OES

A parte aérea e as raízes secas foram homogeneizadas em moinho e as subamostras foram submetidas à uma mistura de: HNO₃ (6,5 mL) e H₂O₂ (2 mL) e digeridas em forno de micro-ondas (Milestone-Ethos). A concentração dos minerais nos tecidos vegetais foi determinada por espectrometria ICP-OES (Thermo Scientific; série iCAB 6000).

e) Análise das concentrações de ABA, IAA, Ácido Salicílico, Ácido Jasmônico em tecidos vegetais

A determinação da concentração de hormônio nos tecidos vegetais foi realizada pela aplicação da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência-eletrospray-espectrometria de massa precisa de alta resolução (HPLC-ESI-HRMS). Obtivemos o ácido indol-3-acético (AIA)

e o ácido cis-trans-abscísico (ABA) e (-)-ácido jasmônico (AJ) e da OlChem Ltd (Olomouc, República Tcheca) e ácido salicílico (AS) da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). Os padrões internos marcados com deutério Ácido $^2\text{H}_5$ -Indole-3-Acético (D-IAA), Ácido $^2\text{H}_6$ (+)-cis,trans-Abscísico (D-ABA), e ácido $^2\text{H}_4$ -Salicílico (D-AS) também foram obtidos da OlChem Ltd, e ácido $^2\text{H}_5$ -Jasmônico (D-AJ) da CDN Isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Canadá).

Aplicamos a seguinte metodologia para a extração e purificação dos hormônios. As amostras de plantas foram primeiramente moídas em um almofariz com nitrogênio líquido. Uma amostra de 0,1g de tecido vegetal congelado moído foi homogeneizado com 1 mL de metanol:água:HCOOH pré-resfriado (-20°C) (90:9:1, v/v/v, com Nadietilditiocarbamato 2,5 mM) e 10 μL de uma solução estoque de 1000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de padrões internos marcados com deutério em metanol. As amostras foram primeiro agitadas em um agitador Multi Reax (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanha) à temperatura ambiente por 60 minutos a 2.000 rpm. Em seguida, os sólidos foram separados por centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos usando uma Biofuge pico Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e reextraídos com 0,5 mL de mistura de extração fresca por agitação por 20 minutos e subsequente centrifugação. Usamos aproximadamente 1 mL do sobrenadante reunido para a análise. Foi separado e evaporado em evaporador RapidVap a 40°C . Finalmente, o resíduo foi redissolvido em 250 μL de metanol/0,133% ácido acético (40:60, v/v) e centrifugado a 20.000 RCF por 10 min antes da injeção no sistema HPLC-ESI-HRMS.

A detecção e quantificação final dos hormônios foi realizada utilizando um dispositivo Dionex Ultimate 3000 UHPLC acoplado a um Exploris 120 Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), equipado com uma fonte de íons OptaMax NG, um filtro de massa quadrupolo, um C-Trap, um Ion-Routing Multipole e um High Field Orbitrap Mass Analyzer. Foi utilizada uma coluna de fase reversa (Synergi 4 mm Hydro-RP 80A, 150 x 2 mm; Phenomenex, Torrance, CA). Um gradiente linear de metanol (A), água (B) e 2% de ácido acético em água (C) foi usado: 38% A por 3 min, 38% a 96% A em 12 min, 96% A por 2 min e 96% a 38% A em 1 min, seguido por um tempo de estabilização de 4 min. A porcentagem de C permanece constante em 4%. A vazão foi de 0,30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o volume de injeção foi de 20 μL e as temperaturas da coluna e da amostra foram de 35 e 15 $^\circ\text{C}$, respectivamente. Os parâmetros de trabalho da fonte de ionização foram otimizados e são relatados na Tabela 10 (APÊNDICES, pág. 173 desta Tese).

A detecção e quantificação de IAA, ABA, AS e JA foram realizadas usando varredura de íon de produto no modo de íons negativos, empregando curvas de calibração multinível com os padrões internos. A resolução foi definida em 30.000 FWHM, resolução Q1 (m/z) em 3, alvo AGC padrão, modo de tempo máximo de injeção Automático e lente RF em 70%. A Energia Absoluta de Colisão (CE) depende da molécula. Uma tolerância de massa de 5 ppm foi aceita. Para cada hormônio, três fragmentos de íons foram analisados. O fragmento de íon com maior intensidade (fragmento 1) foi utilizado para quantificação, e os outros dois (fragmento 2 e 3) foram utilizados para confirmação da identidade dos alvos. No caso dos padrões internos, apenas o fragmento de íon de maior intensidade foi analisado. O controle do instrumento e o processamento dos dados foram realizados pelo software TraceFinder 5.1 EFS. Massas precisas dos fitohormônios e padrões internos, e seus principais fragmentos, são relatados na Tabela 11 (APÊNDICES).

f) Determinação das concentrações de citocinina em tecidos vegetais

A maioria das formas de bases livres e ribosídeos de citocininas foram analisadas em tecidos vegetais: trans- e cis-zeatina (tZ e cZ), di-hidrozeatina (DHZ), trans- e cis-zeatina ribosídeo (tZR e cZR), dihidrozeatina ribosídeo (DHZR), isopenteniladenina (iP), isopenteniladenosina (iPR). Quanto ao protocolo hormonal descrito acima, os padrões internos marcados com deutério $^2\text{H}_5$ -trans-zeatina (D-tZ), $^2\text{H}_5$ -trans-zeatina ribosídeo (D-tZR), $^2\text{H}_6$ -isopenteniladenina (D-iP), $^2\text{H}_6$ -isopenteniladenosina (D-iPR), foram usados. Todos os padrões foram adquiridos da OIChemim Ltd.

Mais uma vez, aplicamos a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência- eletrospray-espectrometria de massa precisa de alta resolução (HPLC-ESI-HRMS). Sua extração e purificação foram feitas utilizando o protocolo descrito por Dobrev e Kaminek (2002) com algumas variações. Uma amostra de 0,1 g de material vegetal congelado (previamente triturado em almofariz com N₂ líquido), foi homogeneizado com 1,75 mL de metanol-água-ácido fórmico (15:4:1, v/v/v) pré-resfriado (-20°C), e com 20 µL de solução estoque de 100 ng/mL de cada padrão marcado com deutério (em metanol). Uma extração noturna a -20°C foi realizada, após a qual os sólidos foram separados (13.000 g, 10 min, 4°C). Em seguida, foram reextraídos com 1,25 mL de extrator por agitação por 20 min em agitador Multi Reax (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanha) e novamente centrifugados. Os sobrenadantes foram passados por um cartucho Sep-Pak C18 (ref. WAT054945, Waters Co.) pré-condicionado com 2 ml de metanol e 1,5 ml de meio de extração. Mais 1 mL da mistura de extração foi passado pelo cartucho Sep-Pak C18. O material eluído (aprox. 4mL) foi evaporado até quase secar usando um RapidVap Evaporator (Labconco Co., Kansas City, MO), e o resíduo foi redissolvido em 1,5 ml de ácido fórmico 1M e aplicado a uma coluna Oasis MCX (ref. 186000254, Waters Co., Milford, MA) pré-condicionado com 2 ml de metanol e 1,5 ml de ácido fórmico 1M. A coluna foi lavada sucessivamente com 1,5 ml de ácido fórmico 1M, 1,5 ml de metanol e 1,5 ml de 0,35M NH₄OH, e as formas de base livre de citocinina juntamente com os ribosídeos foram eluídas com 1,5 ml de 0,35M NH₄OH em 60% de metanol (v/v). O eluído foi evaporado até a secar no RapidVap Evaporator e redissolvido com 200 µl de metanol e 200 µl de ácido fórmico a 0,04% e centrifugado a 20.000 RCF por 10 min antes da injeção no sistema HPLC-ESI-HRMS.

A quantificação de todas as formas de citocininas foi realizada utilizando um dispositivo Dionex Ultimate 3000 UHPLC acoplado a um Exploris 120 Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), equipado com uma fonte de íons OptaMax NG, um filtro de massa quadrupolo, um C-Trap, um Ion-Routing Multipole e um High Field Orbitrap Mass Analyzer. Foi utilizada uma coluna de fase reversa (Tracer Excel 120 ODSA 3 µm, 200x4,6 mm, Teknokroma, Barcelona, Espanha). Foi utilizado um gradiente linear de metanol (A), água (B) e 0,4% de ácido fórmico em água (C): tempo 0 min 45% A, 45% a 95% A em 14 min, 95% A por 0,5 min e 95% a 45% A em 0,5 min, seguido por um tempo de estabilização de 6 min. A porcentagem de C permanece constante em 5%. A vazão foi de 0,40 mL min⁻¹, o volume de injeção foi de 20 µL e as temperaturas da coluna e da amostra foram de 30 e 15 °C, respectivamente. Os parâmetros de trabalho da fonte de ionização foram otimizados e são relatados na Tabela 12 (APÊNDICES).

A detecção e quantificação de citocininas foram realizadas usando varredura de íon de produto no modo de íons positivos, empregando curvas de calibração multinível com os padrões internos. A resolução foi definida em 60.000 FWHM, resolução Q1 (m/z) em 3, alvo AGC padrão, modo de tempo máximo de injeção Automático e lente RF em 70%. A Energia Absoluta de Colisão (CE) depende da molécula. Uma tolerância de massa de 5 ppm foi aceita. Para cada hormônio, três fragmentos de íons foram analisados. O fragmento de íon com maior intensidade (fragmento 1) foi utilizado para quantificação, e os outros dois (fragmento 2 e 3) foram

utilizados para confirmação da identidade dos alvos. No caso dos padrões internos, apenas o fragmento de íon de maior intensidade foi analisado. O controle do instrumento e o processamento dos dados foram realizados pelo software TraceFinder 5.1 EFS. Massas precisas dos fitohormônios e padrões internos, CE e seus fragmentos principais, são relatados na Tabela 13 (APÊNDICES).

g) Análise quantitativa em tempo real (qRT-PCR) de transcritos de RNA

O RNA total foi extraído de amostras pesadas (entre 50 e 90 mg). Amostras inteiras de raízes foram previamente trituradas em N₂ líquido. A extração foi conduzida pela adição de uma mistura de 350 µl de tampão de lise guanidínio-tocianato e 3,5 µl de β- mercaptoetanol do NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey- Nagel). Este kit incluiu um processo de digestão de DNA com DNase. Finalmente, o RNA extraído foi lavado com membranas de sílica seca fornecidas pelo kit. A integridade e concentração de RNA foram quantificadas pelo kit Experion RNA STdSens Analysis baseado em fluorescência. Fragmentos de cDNA complementares foram sintetizados a partir do RNA total usando o iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories) com alíquotas de 2mg de RNA. Para análise de RT-qPCR, o seguinte protocolo foi aplicado: 5 min a 25°C, 30 min a 42°C e, finalmente, por 5 min a 85°C. Foram utilizados 50 ng de cDNA e SYBR Green supermix contendo hot-start iTaq DNA polimerase e a reação foi realizada em um iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories). Os primers e suas correspondentes sequências, utilizados neste estudo, estão indicados abaixo.

Tabela 1. Sequências de nucleotídeos (5' a 3') usadas para amplificar os scripts de cDNA na análise quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Par de Primer	Sequências de nucleotídeos (5' a 3')	Forward / Reverse
CsHA 9	AAA CCA GAA GTG CTG GAG	Forward
CsHA 9	CTC AGC ACC CTC ACT AGT AA	Reverse
CsHA 3	CTA CAG CTT GGT AAC ATA CAT TC	Forward
CsHA 3	GTT GTA GTC CAT GTA ATG TCC TC	Reverse
CsAKT	GCA TAC CCA CAA ACA CAG	Forward
CsAKT	CCC AAA TCC TGT ATC GAC GG	Reverse
CsSKOR	GGA GGT CGC CTT TGC ATC TT	Forward
CsSKOR	GAA TCG CCC CTT GAA ACT GC	Reverse
CsIRT 1	TTC GCA GCA GGT ATC ATT CTC G	Forward
CsIRT 1	CAC CAC TCA CTA CAG GCA ACT C	Reverse
CsFRO 2	AGC GGC GGC AGT GGA ATC	Forward
CsFRO 2	GTT TGG AGG AGG TGG AGG AAG G	Reverse
CsNRT 2.5	ACT ATG GGC TTT GTG GTT GGT TC	Forward
CsNRT 2.5	CCT GTC ATC CCC GAT ATT ACT CC	Reverse
CsNRT 1.2A	ATG CAG TAC AAG TAC AGA CC	Forward
CsNRT 1.2A	CCC ATT TAA TCC CAT GCC	Reverse
CsNRT 1.9	TTT ACT ACA AGG AGT TCC CTG A	Forward
CsNRT 1.9	CGA TAC CAA GAA ATA GAA GTA ATC CA	Reverse
CsSultr 2.2	TGT AGC CAG GTT CAT AGG GAG A	Forward
CsSultr 2.2	GGC CTA CCG CAA TAG CTT CT	Reverse
CsSultr 1.2	TGA TGC GCT CTG TTT GGA GT	Forward
CsSultr 1.2	ACT GCT TCC GTA AGG CCA AT	Reverse

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Caracterização químico-espectroscópica das frações húmicas

a) Composição elementar e relação E4/E6 (UV-vis) do AHVC, AHFVC e AHCHECO

A composição elementar dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de vermicomposto e do ácido húmico extraído de leonardita apresentou diferenças (Tabela 2). O conteúdo de carbono e hidrogênio é maior no AHVC quando comparado ao AHCHECO e AFVC, seguindo a ordem AHVC > AHCHECO > AFVC. Por outro lado, a quantidade de nitrogênio é maior no AFVC do que nas outras substâncias húmicas, sendo AFVC > AHVC > AHCHECO. A concentração de oxigênio foi semelhante no AFVC e AHCHECO, sendo estas quantidades superiores ao observado em AHVC. O AHCHECO é menos nitrogenado e o AHVC é menos oxigenado, sendo potencialmente mais difíceis de assimilar e menos disponíveis quando comparados ao AFVC.

A razão atômica mostra um valor elevado da relação C/N em ácidos húmicos obtidos de leonardita (AHCHECO), a menor razão C/N aparece no AFVC. A relação O/C atômica mostra que o AHVC apresentou os menores valores, enquanto o AFVC e AHCHECO apresentaram valores semelhantes. As três frações húmicas não apresentaram diferenças consideráveis na razão H/C. Estes resultados mostram que os ácidos húmicos são materiais mais estáveis e provavelmente mais recalcitrantes do que o AFVC, principalmente o AHCHECO, possuindo razão C/N igual à 45,45. García et al. (2016a) relataram que a composição elementar e as relações atômicas exercem influência sobre as propriedades e bioatividade das substâncias húmicas, associando uma maior relação C/N a compostos de menor labilidade.

O AFVC apresentou o maior valor de razão E4/E6 em comparação com os ácidos húmicos, sendo esta razão levemente maior no AHVC do que no AHCHECO. Quanto menor a proporção E4/E6 das substâncias húmicas, maior o grau de condensação de componentes húmicos aromáticos e maior o peso molecular (HADDAD et al., 2015). Este resultado corrobora com a afirmação de que o AFVC é de mais fácil assimilação e de maior disponibilidade do que as frações de ácidos húmicos. Assim como neste estudo, Srilatha et al. (2013) e Tahiri et al. (2016) também relataram uma proporção E4/E6 ligeiramente maior em ácido fúlvico do que em ácido húmico.

Tabela 2. Composição elementar, relações atômicas e relação E4/E6 (UV-vis) de AHVC, AFVC e AHCHECO.

Amostras	C	H	N	O	C/N	H/C	O/C	E4/E6
	%							
AHVC	49,98	4,75	2,16	39,41	23,14	0,09	0,78	3,97
AFVC	38,82	2,86	5,84	56,14	6,64	0,07	1,44	4,58
AHCHECO	40	3,07	0,88	56,05	45,45	0,07	1,40	3,81

b) Caracterização mediante espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (IVTF)

A Figura 8 mostra espectros obtidos mediante reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier do ácido húmico de vermicomposto, ácido fúlvico de vermicomposto e ácido húmico de leonardita. As três frações húmicas apresentaram bandas de absorção nas posições entre 3265.09 cm⁻¹, 3267.01 cm⁻¹ e 3393.22 cm⁻¹ para os AH, AF de

vermicomposto e AH de leonardita respectivamente, que são atribuídas a estiramentos de hidroxilas (O-H) pertencentes a carboxilas, álcoois, fenóis e/ou estiramentos N-H pertencentes à amino ou amida. As bandas entre 2980-2800 cm^{-1} pertencem a vibrações de estiramentos de grupos alifáticos C-H, assimétricos e simétricos de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ e estão presentes em 2921.80 cm^{-1} , 2939.16 cm^{-1} e 2923.73 cm^{-1} nos AH e AF de vermicomposto e nos AH de leonardita respectivamente. Apenas nos AH extraídos de vermicomposto, foi detectada uma banda de absorção em 1704.86 cm^{-1} , correspondente com vibrações de estiramentos de grupos C=O (carboxilas, carbonilas e cetonas). As bandas presentes em 1596.86 cm^{-1} , 1587.22 cm^{-1} e 1564.08 cm^{-1} nas frações AH, AF de vermicomposto e AH de leonardita respectivamente, correspondem a estiramentos C=C (aromático, estruturas lignínicas), deformações N-H e estiramento C-N (amidas II). Nos AH de vermicomposto, a banda de absorção presente em 1460 cm^{-1} , indica a presença de estiramentos assimétricos CH_2 , estiramentos simétricos de COO^- (carboxilatos), estiramentos C-O e deformação O-H (fenóis) e estiramentos C-H (CH_3), assim como bandas em 1213.08 cm^{-1} e 1124.26 cm^{-1} que correspondem a estiramento C-O de ésteres, éteres e álcoois secundários. Os AH de vermicomposto e AH de leonardita apresentam bandas em 1380.86 cm^{-1} e 1369.29 cm^{-1} , indicando a presença de deformações angulares de grupamentos $-\text{CH}_3$. Nas três frações húmicas, estiveram presentes bandas nas posições de 1027.93 cm^{-1} , 1064.58 cm^{-1} e 1085.69 cm^{-1} /1006.72 cm^{-1} em AH e AF de VC, assim como AH de leonardita respectivamente, indicando presença de estiramentos de C-O, correspondentes a carboidratos (KANG et al., 2011; GÓMEZ-ORDÓÑEZ & RUPÉREZ 2011).

A Figura 8, partes B1 e B2, mostra os scores e loadings respectivamente nas análises de PCA-IVTf (100% da variância total explicada). Na PC-1 nos scores (92% da variância total explicada) confirmaram as diferenças entre as frações húmicas estudadas. A valores negativos foi separada a fração de AHVC, enquanto a valores positivos foram separadas em quadrantes diferentes, os AH de leonardita e AF de VC. Os loadings demonstram a separação de AH e AF de VC ocorre pela presença mais intensa de bandas associadas a carbonos insaturados, provavelmente de natureza aromática, enquanto, na PC-2 dos loadings, a valores positivos se reafirma que os AH possuem bandas correspondentes a grupamento aromáticos mais predominantes que a presentes nos AF.

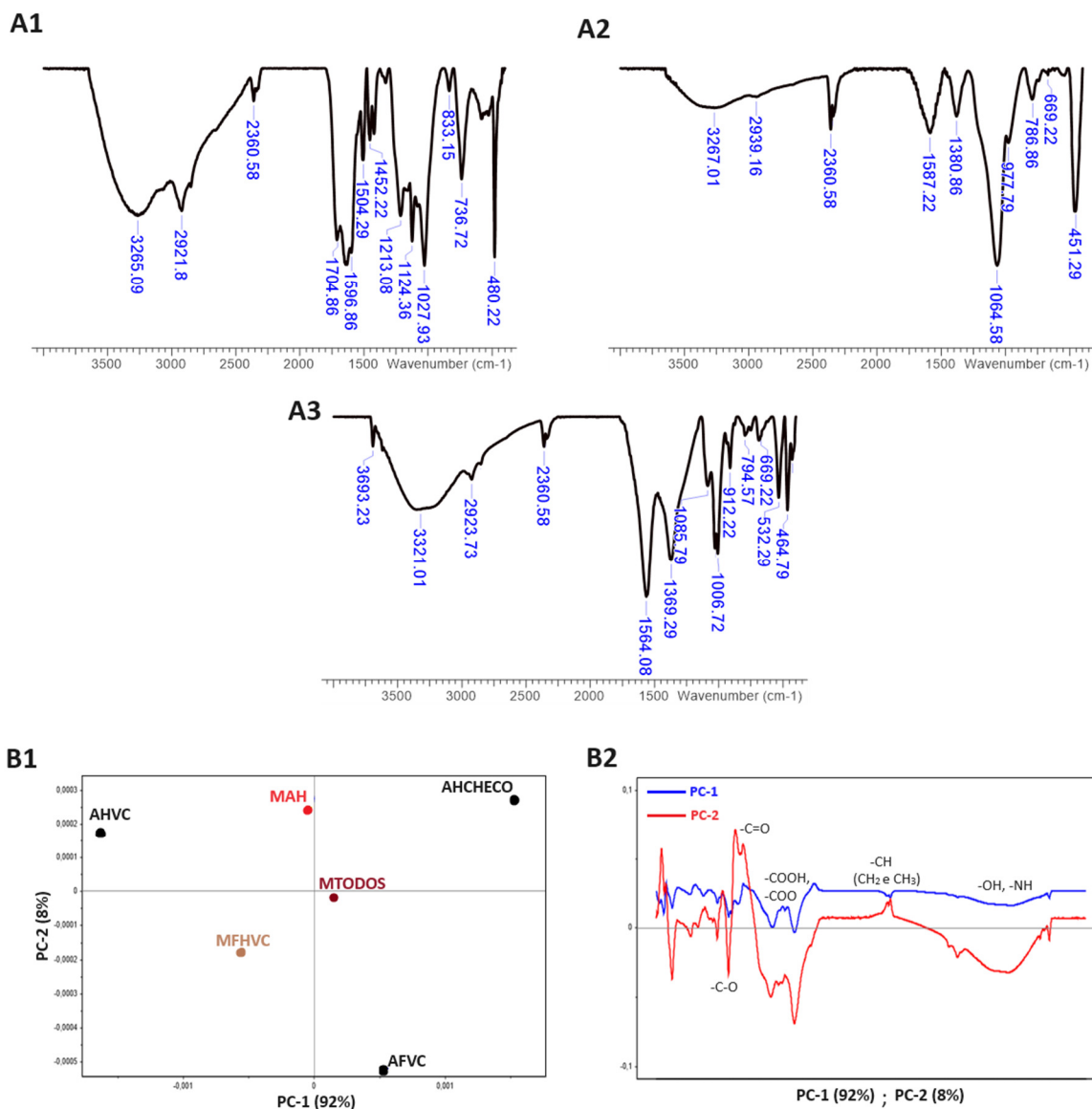


Figura 8. Espectros IVTR do ácido húmico de vermicomposto (A1), ácido fúlvico de vermicomposto (A2) e ácido húmico de leonardita (A3). Análise de componentes principais PCA-IVTR, scores (B1) e loadings (B2) realizado com os espectros puros.

c) Ressonância magnética nuclear do isótopo de carbono de massa 13 com rotação no ângulo mágico e polarização cruzada (¹³C RMN RAM PC)

A Figura 9 mostra os resultados obtidos pela espectroscopia por ressonância magnética nuclear do isótopo do ¹³C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico do ácido húmico de vermicomposto, ácido fúlvico de vermicomposto e ácido húmico de leonardita. Nas três frações húmicas houve presença de picos que indicam fragmentos semelhantes na composição molecular destes compostos. Os picos na região entre 0 até 45 ppm, indicam a presença de estruturas alifáticas não substituídas do tipo CALifáticos-(H,R). Na região entre 45 até 60 ppm, aparecem picos responsáveis pela presença nos de estruturas alifáticas funcionalizadas do tipo CALifáticos-(O,N). Já na região de 60 até 90 ppm, foram identificados picos de estruturas alifáticas funcionalizadas do tipo CALifáticos-O, assim como os picos presentes na região de 90 até 110 ppm, reafirmam que nas frações húmicas há presença de estruturas alifáticas funcionalizadas do tipo CALifáticos-di-O. Nos espectros, os picos presentes na região de 110 até 140 ppm, indicam a presença de estruturas aromáticas não funcionalizadas do tipo

CAromáticos – (H,R), assim como as estruturas aromáticas funcionalizadas do tipo CAromáticos– (O,N), identificadas pela presença dos picos entre a região de 140 até 160 ppm. Nas três frações húmicas foram identificados picos na região de 160 até 185 ppm, indicando a presença de carbonos carboxílicos, ésteres e amidas (CCOOH-H,R,N), assim como os picos identificados na região de 185 até 230 ppm: Indicam a presença nos AH de estruturas carbonos carbonílicos, de aldeídos e cetonas (CC=O) (GARCÍA et al., 2019).

A Figura 9, partes B1 e B2, mostra os scores e os loadings da análise de PCA-¹³C NMR realizada a partir do carregamento dos espectros puros (100% da variância total explicada). Na PC-1 (88% da variância total explicada), foi possível separar as frações húmicas de acordo com a sua fonte de origem, isto é, a valores negativos foram agrupados os AH e AF de VC, enquanto a valores positivos foram agrupados os AH de leonardita. Os loadings na PC-1 comprovam que a diferença entre as frações húmicas das diferentes fontes de origem consiste na maior presença de estruturas aromáticas nos AH de leonardita.

As figuras C1, C2, C3 e C4 mostram as quantidades de fragmentos e as propriedades químicas extraídas dos espectros. A figura C1 mostra maior presença de estruturas pouco funcionalizadas do tipo CArifáticos–(O,N) e CAromáticos – (H,R) nos AH de leonardita quando comparado com as frações húmicas de VC, estes últimos, ricos em estruturas com alto grau de funcionalização química, aromática e alifática.

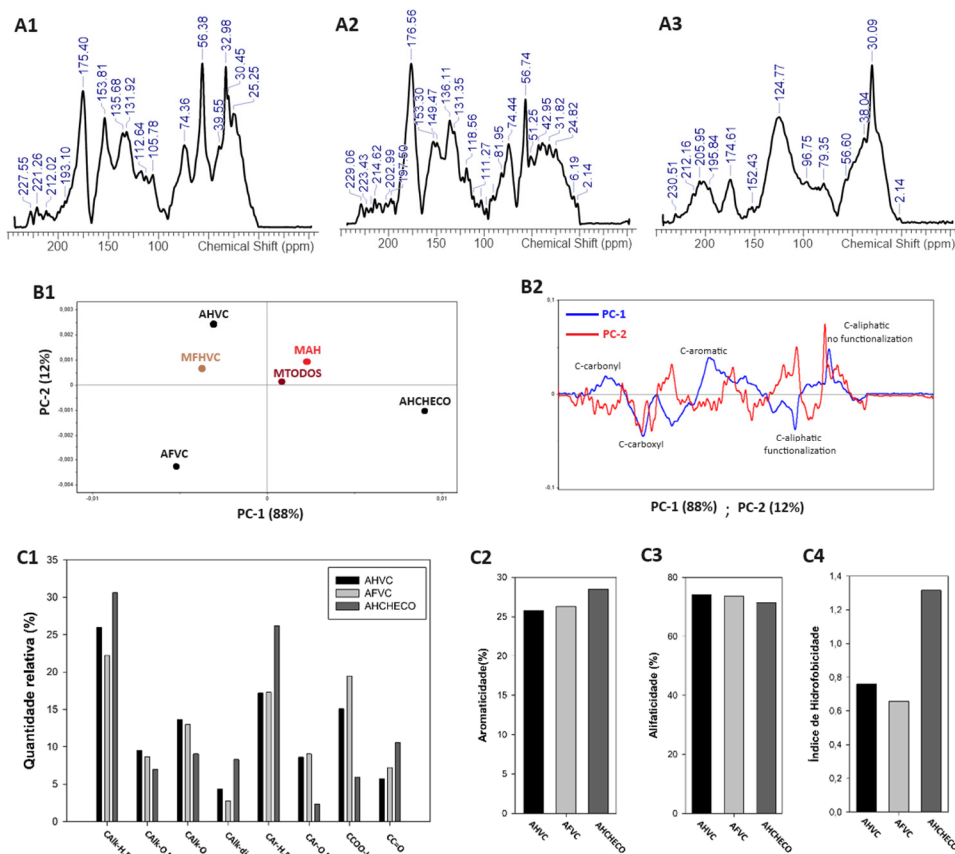


Figura 9. Espectros RMN ¹³C PC RAM do ácido húmico de vermicomposto (A1), ácido fúlvico de vermicomposto (A2) e ácido húmico de leonardita (A3). Análise de componentes principais PCA-IVTR, scores (B1) e loadings (B2) realizado com os espectros puros. Quantidade relativa dos tipos de carbono (C1), aromaticidade (C2), alifaticidade (C3) e índice de hidrofobicidade (C4).

d) Caracterização química e nutricional do AHVC, AFVC e AHCHECO

A Tabela 3 mostra que as frações húmicas possuem diferentes quantidades de macronutrientes, como K, P, Ca, Mg e S. Em relação ao potássio, o AHVC apresentou a menor quantidade deste elemento, enquanto AFVC mostrou quantidade 5,22 vezes maior. O AHCHECO mostrou quantidade intermediária de potássio em comparação com as demais substâncias húmicas, ainda assim, 3,65 vezes maior do que o observado no AHVC. As quantidades de fósforo nas frações húmicas extraídas de vermicomposto (AHVC e AFVC) foram muito maiores do que as encontradas no ácido húmico extraído de leonardita (AHCHECO), sendo 32,53 vezes maior no AHVC e 22,24 vezes maior no AFVC. Os valores de cálcio apresentaram comportamento oposto ao de fósforo, uma vez que o AHCHECO mostrou o maiores valores deste elemento, 20,48 vezes maior do que a quantidade de cálcio presente no AHVC e 50,32 vezes maior do que o observado no AFVC. Assim como para o cálcio, o maiores valores de magnésio foram encontrados no AHCHECO: 13,75 vezes mais do que no AHVC e 17,40 vezes maior do que o observado em AFVC. As quantidades de enxofre foram maiores nas frações húmicas de vermicomposto quando comparado ao AHCHECO, sendo 3,05 vezes maior no AHVC e 2,34 vezes maior no AFVC.

Quantidades de micronutrientes também foram detectadas nos diferentes tipos de frações húmicas. O Fe mostrou estar em maior quantidade no AHCHECO, com valor 8,42 vezes maior do que o detectado em AHVC, e 112,92 vezes maior do que em AFVC. Por mais que o AHCHECO tenha apresentado valores bem superiores, o AHVC também mostrou quantidade de ferro consideravelmente maior do que o encontrado em AFVC (13,55 vezes mais). A quantidade de zinco não mostrou grandes diferenças de acordo com o tipo de substância húmica, sendo maior para o AHVC, porém menos de 2 vezes superior aos teores em AFVC e AHCHECO, os quais não apresentaram grandes diferenças entre si. O Cobre foi detectado e quantificado apenas no AHVC, indicando que as demais frações húmicas não possuem níveis expressivos deste elemento. O manganês e o molibdênio não foram detectados em nenhuma fração húmica. Por fim, apenas o AFVC mostrou quantidades de boro detectáveis na sua composição.

De maneira geral, o AHVC apresentou as maiores quantidades de P, S, Zn e Cu, sendo o último detectado apenas nesta fração húmica. O AFVC apresentou os maiores valores de K e B, cujo qual foi detectado apenas neste composto. O AHCHECO mostrou as maiores concentrações de Ca, Mg e Fe. Estes resultados mostram que não há um padrão bem definido entre a composição de macro e micro nutrientes entre diferentes substâncias húmicas, sendo aqui influenciados tanto pelo material de origem de qual os compostos foram extraídos quanto pelo tipo de fração húmica avaliada.

Tabela 3. Composição de macro e micronutrientes presentes nas diferentes frações húmicas.

	AHVC	AFVC	AHCHECO
		g.kg⁻¹	
K	25,3	132,2	92,4
P	2,638	1,804	0,081095
Ca	0,425	0,173	8,705
Mg	0,081	0,064	1,114
S	8,824	6,743	2,8875
Fe	1,125	0,083	9,373

Continua...

Continuação da Tabela 3.

	AHVC	AFVC	AHCHECO
		g.kg⁻¹	
Zn	0,065	0,038	0,039105
Cu	0,069	nd	nd
Mn	nd	nd	nd
Mo	nd	nd	nd
B	nd	0,061	nd

* nd = A leitura do elemento, na solução obtida após digestão e diluição, ficou abaixo do limite de detecção ou de quantificação do equipamento.

3.5.2 Experimento 1 - Dose vs resposta de ácido fúlvico extraído de vermicomposto aplicado via radicular

a) Influência de ácido fúlvico de vermicomposto na morfologia radicular

Os dados experimentais de comprimento total radicular (Figura 10A), área total da raiz (Figura 10B), volume total radicular (Figura 10C) e número total de raízes (Figura 10D) em função de doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) aplicadas via radicular e medidos nos intervalos de 24 h a 144 h após o fornecimento de AFVC foram inicialmente submetidos a uma análise de regressão quadrática a cada momento. A Figura 10 mostra que após 24 horas de início dos testes as doses 80 e 100 mg L⁻¹ resultaram em plantas com sistema radicular menos desenvolvido do que os de plantas controle. Todos os parâmetros morfológicos radiculares foram estimulados em menor intensidade até as primeiras 48 horas após a aplicação radicular de AFVC em diferentes concentrações, sendo as menores doses as que mais aumentaram o comprimento, área, volume e quantidade de raízes neste momento. Às 72 e 96 horas após início dos tratamentos as respostas ficaram mais definidas, a partir destes momentos as concentrações de 40 e 60 mg L⁻¹ foram as que mais estimularam o desenvolvimento radicular de maneira geral, sendo que concentrações maiores do que estas (80 e 100 mg L⁻¹ responsáveis por menor desenvolvimento das raízes. Estes resultados mostram que as plantas apresentam sensibilidade inicial a aplicação via radicular de AFVC, sendo notado até mesmo redução do desenvolvimento pela aplicação da substância húmica por algum tipo de estresse, porém, com o passar das horas ocorrem estímulos responsáveis pelo desenvolvimento radicular.

Os efeitos sobre a morfologia e arquitetura radicular pela aplicação de substâncias húmicas em plantas são os mais relatados na literatura e estão entre os principais fatores que influenciam a absorção de água e nutrientes pelas plantas, estimulando o desenvolvimento (CANELLAS et al., 2015; GARCÍA et al., 2016; OLAETXEA et al., 2018; DE HITA et al., 2020; CASTRO et al., 2021). Alguns trabalhos mostram que a aplicação radicular de ácido fúlvico aumentou o número e o alongamento radicular de plantas de milho, além de aumentar a quantidade e comprimento das raízes laterais de Arabidopsis e tomate (DOBBSS et al. 2007; EYHERAGUIBEL et al. 2008). De acordo com Dobbss et al. (2010) a melhor resposta sobre o crescimento e desenvolvimento radicular é geralmente obtido sob aplicação de doses baixas ou intermediárias de substâncias húmicas, sendo até mesmo observado um efeito inibitório quando aplicadas concentrações mais elevadas, corroborando com os resultados do presente estudo.

Em trabalho com delineamento semelhante realizado por Tavares et al. (2020), porém utilizando diferentes doses de ácido húmico extraído de vermicomposto (AHVC), os autores observaram que as doses de 80 e 110 mgL⁻¹ foram as que mais estimularam o desenvolvimento radicular de plantas de arroz, indicando que as doses de melhor resposta para aplicação radicular de AHVC são maiores do que as doses de maior resposta para aplicação radicular de AFVC. Além disso, Tavares et al. (2020) observaram que os efeitos no sistema radicular começam a

aparecer de forma mais definida após 96 e 120 horas de início da aplicação do AHVC. Estes resultados mostram que o AFVC apresenta sua dose de melhor resposta em concentrações menores e de maneira mais rápida do que o AHVC. Diversos autores relatam que as características estruturais das substâncias húmicas são responsáveis por diferentes comportamentos na rizosfera e na planta (CANELLAS et al., 2012; GARCÍA et al., 2014; GARCÍA et al. 2019; CASTRO et al., 2021), indicando que as estruturas que resultaram em uma menor recalitrância e maior labilidade do AFVC presente neste estudo, quando comparado ao AHVC do trabalho realizado por Tavares et al. (2020), podem ser responsáveis pelas diferenças nas doses e tempos de melhor resposta.

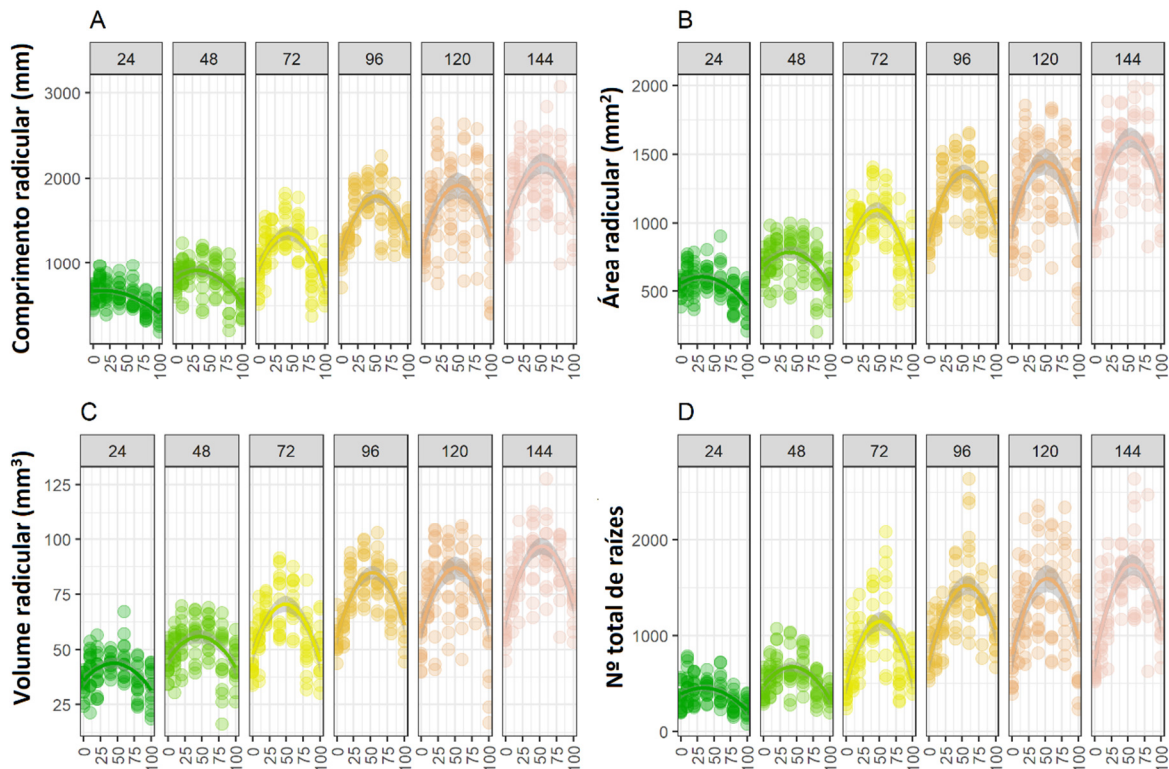


Figura 10. Gráfico de dispersão dos dados observados e curva estimada pelo modelo de regressão linear quadrática com faixas de confiança para a variável comprimento total da raiz (a), área total da raiz (b), volume radicular (c) e número total de raízes (d) em função das doses de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC), medidas em intervalos de 24 h a 144 h após o fornecimento, n=20.

Houve diferenças na área radicular pela aplicação dos tratamentos das 24 h às 144 h de avaliação do ensaio (Figura 11), e um modelo polinomial de segunda ordem produziu um ajuste satisfatório para os dados experimentais. A concentração de 100 mg L⁻¹ resultou em plantas com a menor área radicular em todas as classes de diâmetro, até mesmo do que as plantas controle, nos primeiros momentos de coleta. A dose de 80 mg L⁻¹ de AFVC também resultou em área radicular de raízes finas menor do que observado em plantas controle nos momentos iniciais. As doses de 40 e 60 mg L⁻¹ foram as que mais estimularam a área radicular, independente da classe de diâmetro (Figura 11).

Em estudo realizado por Conselvan et al. (2017), os autores observaram que mudas de milho tiveram a área de raízes finas significativamente afetadas pela aplicação de AHVC após 48 horas. Uma maior área de superfície radicular é benéfica para a absorção total de água e nutrientes (HERDER et al., 2010; FERREIRA, 2017). Canellas et al. (2010) trataram mudas de

milho com diferentes concentrações ou tamanho molecular das frações de ácidos húmicos e observaram uma maior área de superfície radicular.

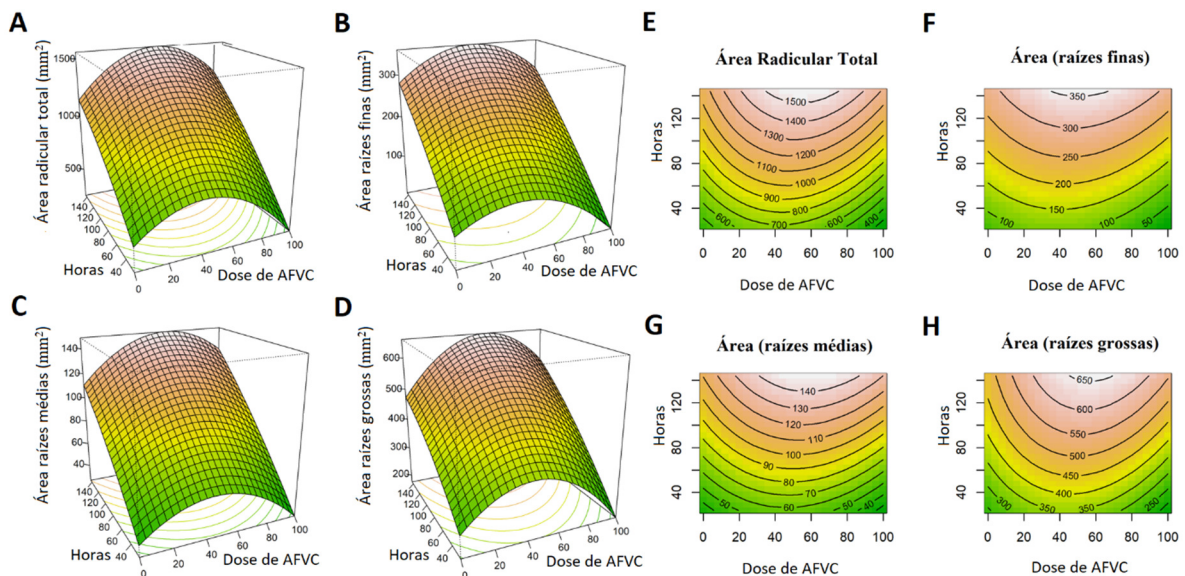


Figura 11. Superfície de resposta e gráfico de contorno, respectivamente. Área de superfície radicular total (A, E), classes de raízes finas (B, F), médias (C, G) e grossas (D, H), de plantas de arroz sob doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) medidos em intervalos de 24 h a 144 h após a aplicação.

O volume total das raízes também apresentou maior resposta ao estímulo desencadeado pelas doses de 40 e 60 mg de AFVC L⁻¹ ao longo do tempo. Assim como para a área radicular, a dose de 100 mg L⁻¹ de AFVC resultou em plantas com volume radicular menor do que o de plantas controle nos momentos iniciais em todas as classes de diâmetro e, para as raízes finas, o volume também foi menor na dose de 80 mg⁻¹ L quando comparado ao controle nos momentos iniciais (Figura 12).

O volume dentro da classe das raízes grossas também apresentou esse aumento quadrático, representando a classe que mais contribuiu para o volume total das raízes. Mesmo que as raízes de todas as classes de diâmetro tenham mostrado resposta à aplicação radicular de AFVC, o volume de raízes finas foi o menos responsivo, sendo observado estabilidade após 120 e 144 horas de tratamento. Assim como para a área radicular, após 72 e 96 horas de início dos testes, os efeitos são mais intensos (Figura 12).

Castro et al. (2022) observaram que a aplicação de ácido húmico de vermicomposto via radicular em plantas de arroz cultivadas em condições normais e sob estresse hídrico, resultou em efeitos semelhantes, havendo aumento da área e volume radicular, além de alterar os teores de metabólitos solúveis nas raízes e estimular a produção de biomassa radicular.

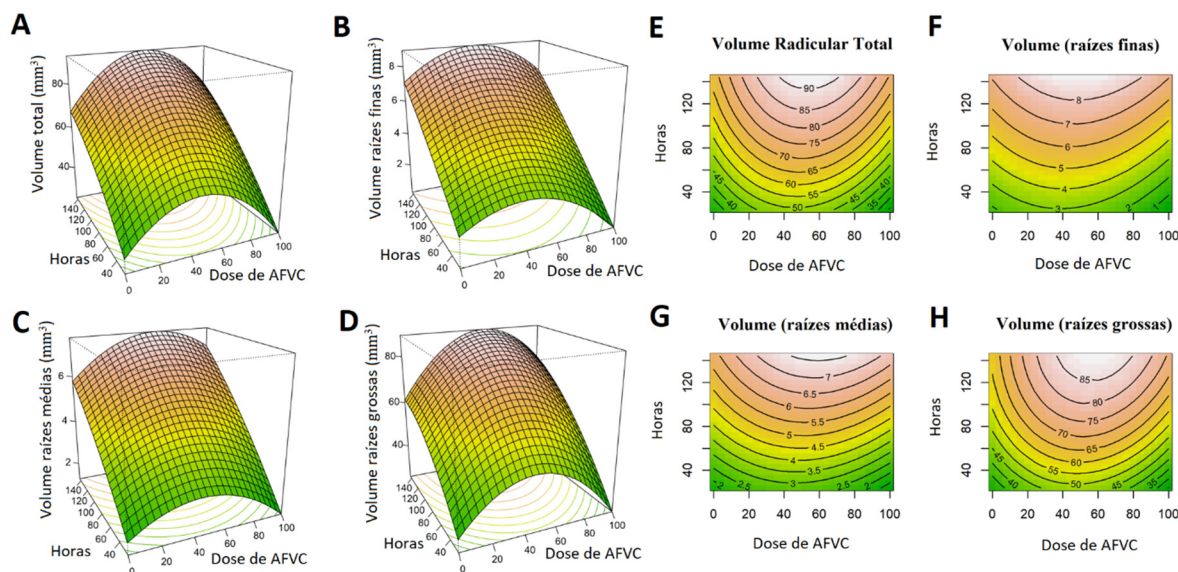


Figura 12. Superfície de resposta e gráfico de contorno, respectivamente. Volume total de raízes (A, E), classes de raízes finas (B, F), médias (C, G) e grossas (D, H), de plantas de arroz sob doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) medidos em intervalos de 24 h a 144 h após a aplicação.

O número de raízes foi o parâmetro morfológico estimulado em maior intensidade pela aplicação de AFVC, sendo a dose de 60 mg L^{-1} a que teve maior efeito. A dose de 100 mg L^{-1} de AFVC resultou em menor número de raízes do que o observado em plantas controle nos momentos iniciais, com exceção do número de raízes médias, que não diferenciou de plantas controle. O número de raízes grossas foi o que mais aumentou pela aplicação da dose de 60 mg L^{-1} de AFVC, sendo estimulado antes do que aumento da quantidade de raízes de menor diâmetro. O número de raízes finas foi o que mais contribuiu para a quantidade total de raízes, sendo bem superior aos demais (Figura 13).

García et al. (2016b) relataram um aumento na multiplicação de raízes laterais de plantas de arroz que foram relacionadas a estruturas de substâncias húmicas menos complexas e mais funcionalizada, associada a grupos carboxílicos C_{COOH} e alifaticidade, corroborando para o observado neste estudo, uma vez que o AFVC apresenta estas características e estimulou intensamente a emissão de raízes. Os resultados deste trabalho estão de acordo com os relatados na literatura, em que substâncias húmicas extraídas de diferentes fontes aumentam a emissão de raízes laterais em diversas culturas (DOBBSS et al., 2007; CANELLAS et al., 2012; MORA et al., 2012; GARCÍA et al., 2016; TAVARES et al. 2019; CASTRO et al., 2021).

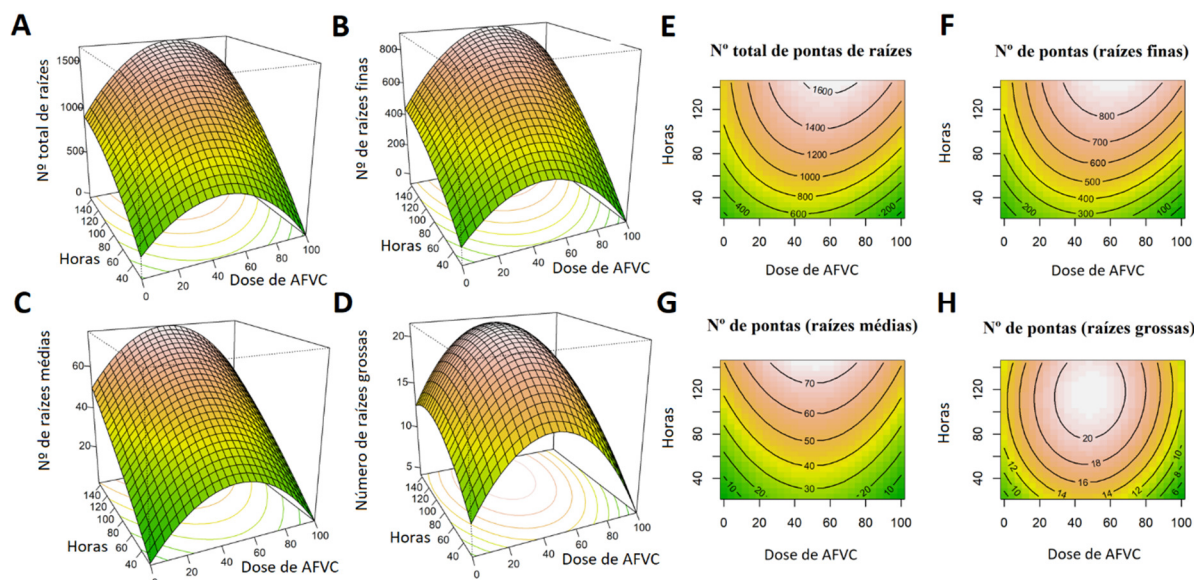


Figura 13. Superfície de resposta e gráfico de contorno, respectivamente. Número total de pontas de raízes (A, E), classes de raízes superfinas (B, F), finas (C, G) e grossas (D, H), de plantas de arroz sob doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) medidos em intervalos de 24 h a 144 h após a aplicação.

O comprimento radicular foi estimulado em maior intensidade pelas doses de 40 e 60 mg L⁻¹ de AFVC, sendo que a dose de 100 mg de AFVC L⁻¹ resultou em plantas com raízes menos compridas do que o de plantas controle, nas primeiras 24 horas. Assim como para os parâmetros anteriores, às 72 e 96 horas os estímulos ocorrem de maneira mais intensa e definida (Figura 14).

Em outro estudo foi observado, após 48 horas, aumento do comprimento radicular em mudas de milho tratadas com diferentes concentrações de substâncias húmicas (CONSELVAN et al., 2017). Castro et al. (2022) relataram aumento do alongamento e da emissão de raízes de plantas de arroz pela aplicação de AHVC, em um efeito semelhante ao que o déficit hídrico causa nas raízes. As plantas desenvolvem estratégias para estimular a captação de água e nutrientes em profundidade, por meio do aumento na emissão de raízes e do alongamento radicular (HENRY, 2013; FERREIRA, 2017).

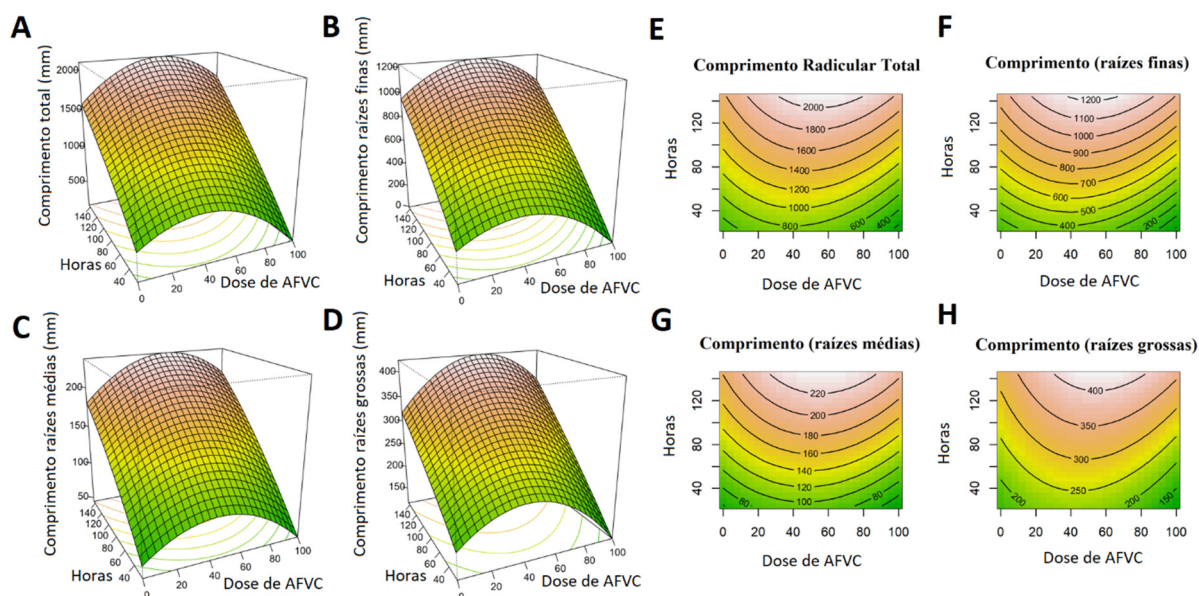


Figura 14. Superfície de resposta e gráfico de contorno, respectivamente. Comprimento total das raízes (A, E), classes de raízes superfinas (B, F), finas (C, G) e grossas (D, H), de plantas de arroz sob doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) medidos em intervalos de 24 h a 144 h após a aplicação.

Um modelo polinomial de segunda ordem produziu uma regressão adequada para os dados de bifurcação e diâmetro médio da raiz. O AFVC promoveu com maior intensidade a bifurcação do sistema radicular das mudas de arroz nas doses de 40 e 60 mg L⁻¹. A concentração de 80 e 100 mg L⁻¹ resultou em menor número de bifurcações do que em plantas controle, na primeiras 24 horas. Em outro estudo com mudas de arroz, observou-se que o número de bifurcações pela aplicação de AHVC apresentou resposta após 24 horas de aplicação, sendo as doses de 80 e 110 mg L⁻¹ as que mais estimularam este parâmetro neste momento, no entanto, com o decorrer das 144 horas de ensaio, doses superiores de AHVC mostraram maior aumento no número de bifurcações (TAVARES et al., 2020) (Figura 15A e 15C).

Em relação ao diâmetro médio radicular, após 24 horas de aplicação das diferentes doses de AFVC, quanto maior a concentração da substância húmica maior foi o diâmetro. Porém, com o decorrer do tempo, o diâmetro médio radicular foi reduzindo até não haver mais diferenças entre os tratamentos. Tavares et al. (2020) observaram que após 24 horas de aplicação de diferentes doses de AHVC via radicular em plantas de arroz, a concentração de 80 mg L⁻¹ foi a que mais estimulou o aumento do diâmetro radicular, porém, assim como no presente estudo, com o decorrer do tempo houve progressiva redução do diâmetro médio radicular até a última coleta (Figura 15B e 15D).

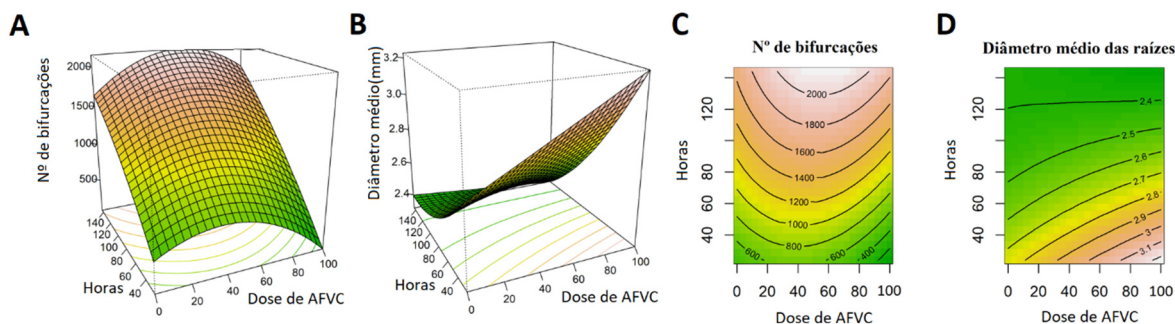


Figura 15. Superfície de resposta e gráfico de contorno, respectivamente. Número de bifurcações (A, C) e diâmetro médio das raízes (B, D) de plantas de arroz sob doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC) medidos em intervalos de 24 h a 144 h após a aplicação.

As propriedades que as substâncias húmicas apresentam são dependentes de suas estruturas e possuem influência direta na atividade biológica que exercem em plantas (BERBARA & GARCÍA, 2014). Em trabalho realizado por García et al. (2016a, 2016b) em plantas de arroz, os autores observaram, entre outros fatores, que as estruturas de AH contendo predomínio de cadeias alifáticas não funcionalizadas, carbonilas e carboxilas, estão correlacionadas com o número e alongamento de raízes de menor diâmetro, enquanto estruturas aromáticas e cadeias alifáticas funcionalizadas associaram-se ao alongamento de raízes de maior diâmetro. Esses autores também observaram, de maneira geral, estímulo à emissão de novas raízes pelas SH em que predominavam compostos alifáticos e oxigenados, e estímulo ao alongamento radicular pelo caráter mais aromático dessas substâncias.

A hidrofobicidade e a hidrofiliabilidade são propriedades que possivelmente estão relacionadas à bioatividade do SH por meio de suas características estruturais. O índice de hidrofobicidade e os fragmentos húmicos polares mostraram uma correlação direta com o crescimento radicular e a atividade do tipo auxina de AH em plantas de milho (DOBBSS et al. 2010; JINDO et al. 2012; CANELLAS et al. 2012, 2015) e em plantas de arroz (GARCÍA et al., 2019; TAVARES et al., 2020; CASTRO et al., 2021).

O presente estudo da dose de melhor resposta de AFVC ao longo do tempo em plantas por aplicação via radicular se trata de uma abordagem inédita. A propriedade de labilidade presente no AFVC em estudo, resultante do seu balanço estrutural, com alto predomínio de C_{COOH} e baixo índice de hidrofobicidade, mostrou contribuir para o estímulo no desenvolvimento radicular.

3.5.3 Experimento 2 – dose vs resposta de ácido fúlvico extraído de vermicomposto aplicado via foliar

a) Efeito da aplicação foliar de AFVC na morfologia radicular

A Figura 16 mostra o efeito da aplicação foliar de doses crescentes de AFVC na morfologia radicular. Em relação ao controle, a área radicular aumentou significativamente pela aplicação nas doses de 60, 80 e 100 mg L⁻¹, sendo maior o estímulo na dose de 80 mg L⁻¹ (aumento de 12%), porém não diferiram estatisticamente entre si. As doses de 20 e 40 mg L⁻¹ não diferiram significativamente do controle (Figura 16A). Todas as concentração de AFVC aplicadas resultaram em aumento do volume radicular, porém a concentração de 100 mg L⁻¹ foi a que mais estimulou, com aumento de 9% em comparação ao controle. As doses de 20, 60 e 80 mg L⁻¹ não diferiram significativamente da dose de maior resposta (Figura 16B). A Figura 16C mostra que aplicação foliar de AFVC em todas as concentrações resultou em plantas com

raízes de menor diâmetro. As plantas tratadas com AFVC na dose de 100 mg L⁻¹ não apresentaram diâmetro médio significativamente inferior ao controle. As doses de 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ resultaram em raízes com diâmetro estatisticamente menor do que as plantas dos outros dois tratamentos. A dose de 80 mg L⁻¹ resultou em maior redução do diâmetro médio radicular, sendo de 10% menor do que observado em plantas controle. Ferreira (2017) afirma que raízes com maior área superficial e de menor diâmetro favorecem a absorção de água e nutrientes pelas plantas, contribuindo para o desenvolvimento geral das culturas.

O comprimento radicular foi estimulado em maior intensidade nas plantas tratadas com 80 mg L⁻¹ de AFVC, havendo aumento de 12%, seguido pela dose de 60 e 40 mg L⁻¹, todas resultando em plantas com raízes significativamente mais compridas do que as de plantas controle. Os tratamentos com as doses de 20 e 100 mg L⁻¹ de AFVC não diferiram significativamente do controle (Figura 16D). A aplicação foliar de AFVC80 resultou na maior quantidade de bifurcações radiculares (14% a mais do que em plantas controle), porém a dose de 60 mg L⁻¹ não diferiu significativamente da dose de maior estímulo. As raízes de plantas controle e tratadas com AFVC nas concentrações de 20, 40 e 100 mg L⁻¹ tiveram o menor número de bifurcações, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 16E). As raízes de plantas tratadas com AFVC80 emitiram a maior quantidade total de raízes, com aumento de 14% em relação ao controle. Assim como para o número de bifurcações, a dose de 60 mg L⁻¹ não diferiu significativamente da dose de maior resposta. As plantas controle e que receberam AFVC na concentração de 20 e 100 mg L⁻¹ foram as que tiveram a menor quantidade total de raízes, não diferindo significativamente entre si (Figura 16F).

As doses de 60 e 80 mg L⁻¹ foram as que estimularam significativamente a emissão de raízes finas, aumentando em 9 e 14%, respectivamente, sem diferenças estatísticas entre si. As plantas controle e as tratadas com AFVC nas doses de 20 e 100 mg L⁻¹ foram que tiveram o menor número de raízes finas, sendo significativamente semelhantes (Figura 16G). A Figura 16H mostra o número de raízes médias, que foi significativamente mais responsivo à aplicação de AFVC na concentração de 20 mg L⁻¹ (10% maior do que o controle). As plantas controle e as plantas sob aplicação de AFVC nas doses de 60 e 100 mg L⁻¹ não tiveram número de raízes médias significativamente diferente do que observado em plantas sob aplicação de AFVC20. As doses de 40 e 80 mg L⁻¹ de AFVC resultaram em plantas com menor número de raízes médias, não diferindo entre si e nem das plantas controle. O número de raízes grossas foi maior em plantas tratadas com AFVC via foliar na concentração de 100 mg L⁻¹, aumentando esta quantidade em 18%. As plantas controle tiveram o menor número de raízes grossas, e o tratamento com AFVC40 não diferiu significativamente do controle.

Em termos gerais, podemos mais uma vez perceber que o estímulo ao crescimento das raízes acontece quando são utilizadas quantidades reduzidas ou moderadas substâncias húmicas, que em concentrações elevadas podem até mesmo ocasionar em um efeito inibitório, assim como relatado por Dobbs et al. (2007). Os resultados obtidos no experimento anterior mostraram que aplicação radicular de doses crescentes de AFVC resultaram em aumento do diâmetro das raízes em todas as doses, no entanto, a aplicação foliar resultou em redução deste diâmetro, mostrando que de acordo com a forma de aplicação de AFVC o estímulo sobre o engrossamento ou afinamento das raízes será diferente. Ainda em comparação com o experimento em que houve aplicação de AFVC via radicular, a dose que mais estimulou o desenvolvimento do sistema radicular por aplicação foliar foi superior (80 mg L⁻¹) à observada para aplicação direta nas raízes (40 e 60 mg L⁻¹).

Existem poucos relatos na literatura sobre o estímulo no desenvolvimento radicular pela aplicação via foliar de substâncias húmicas, principalmente de ácidos fúlvicos. Nossos resultados mostram que alguns estímulos na arquitetura radicular ocorrem de maneira diferenciada em consequência dos efeitos do AFVC de acordo com a via de aplicação, sendo

necessários mais estudos sobre os estímulos e modos de ação pela pulverização foliar deste composto.

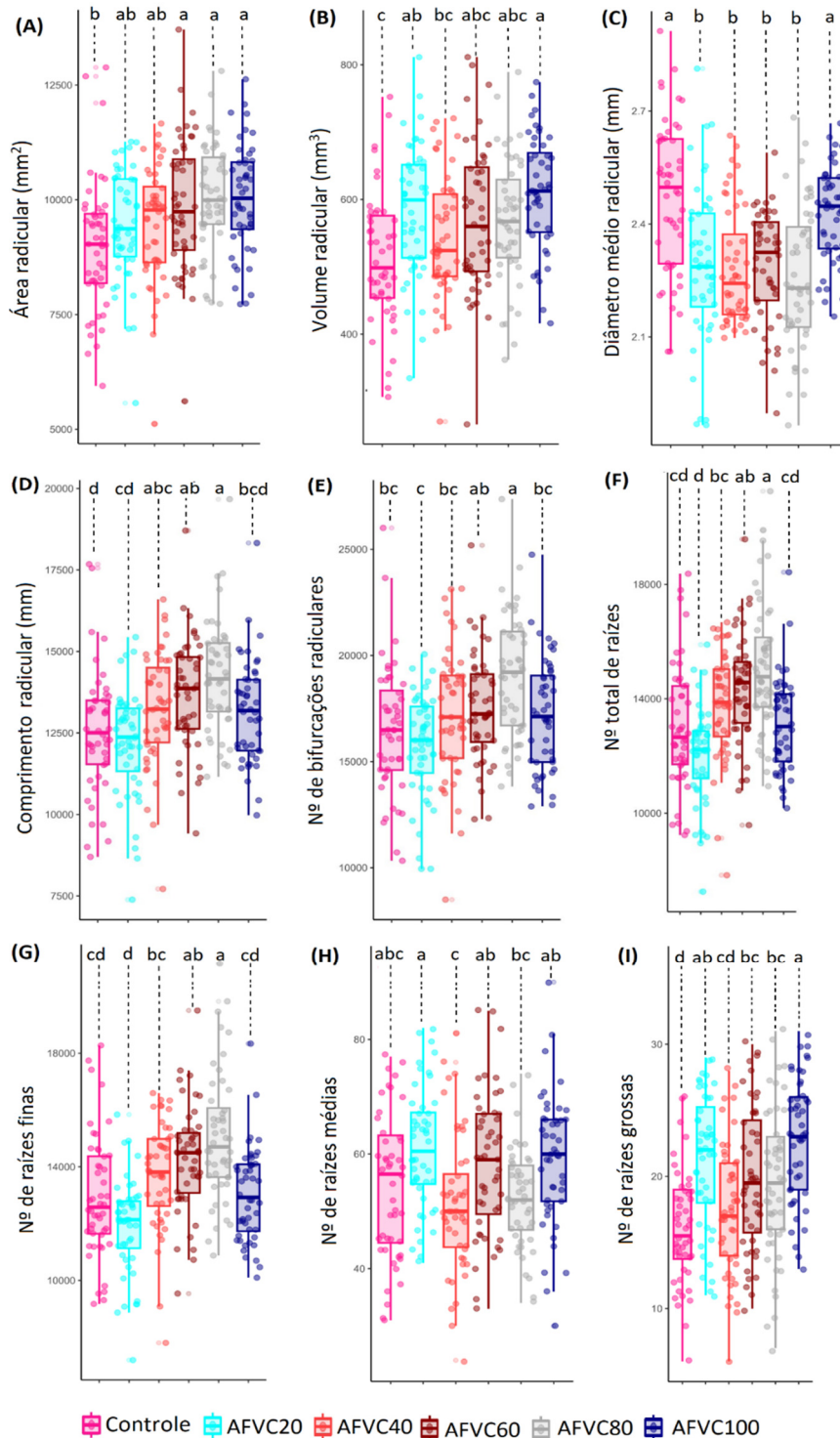


Figura 16. Quantificação dos parâmetros morfológicos das raízes de plantas de arroz tratadas pela aplicação foliar de doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto. Área radicular (A), volume radicular (B), diâmetro médio radicular (C), comprimento radicular (D), número de bifurcações radiculares (E), número total de raízes (F), número de raízes finas (G), número de raízes médias (H) e número de raízes grossas (I), n=40.

b) Acúmulo de biomassa fresca e seca em plantas sob aplicação foliar de AFVC

A Figura 17 mostra o acúmulo de biomassa fresca em raízes, bainhas e folhas de plantas de arroz pela aplicação foliar de doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto. A massa fresca radicular apresentou incremento significativo pela aplicação de AFVC em todas as concentrações testadas, quando comparado ao controle. Entre as doses aplicadas, a de 80 mg L⁻¹ de AFVC foi a que mais estimulou a produção de biomassa fresca das raízes, apresentando um aumento em 11%, seguida pela concentração de 100 mg L⁻¹, que não diferiu significativamente da dose de maior estímulo e nem das doses de 40 e 60 mg L⁻¹. A dose de AFVC que resultou no menor incremento de biomassa nas raízes foi a de 20 mg L⁻¹, aumentando apenas em 1% a massa fresca das raízes quando comparadas ao controle, não diferindo significativamente das doses intermediárias (40 e 60 mg L⁻¹) (Figura 17A). Os maiores valores de massa fresca das bainhas de plantas de arroz também foram observados pela aplicação de AFVC a 80 mg L⁻¹, sendo a única que mostrou diferenças significativas em comparação com o tratamento controle, apresentando aumento de 9%. As doses de 20, 60 e 100 mg L⁻¹ resultaram em aumento de biomassa, porém com menor intensidade, não diferindo dos demais tratamentos. O tratamento controle e as plantas submetidas a aplicação com AFVC a 40 mg L⁻¹ foram as que tiveram menor produção de biomassa fresca das bainhas, sendo de 1% o aumento na dose de 40 mg L⁻¹ de AFVC em comparação com as plantas controle (Figura 17B). A Figura 17C mostra, assim como para as raízes e bainhas, que a concentração de 80 mg L⁻¹ foi a que mais estimulou a produção de biomassa foliar, sendo significativamente superior ao controle e ao estímulo observado pelas doses de 20, 40 e 60 mg L⁻¹. A dose de 80 mg L⁻¹ de AFVC foi responsável por um aumento de 21% no acúmulo de biomassa fresca das folhas. A dose de 100 mg L⁻¹ resultou em produção de biomassa menor do que o observado pela aplicação da dose de 80 mg L⁻¹, porém sem diferir significativamente. A dose que menos estimulou a produção de massa fresca das folhas foi a de 20 mg L⁻¹, porém, ainda assim, apresentou biomassa 10% maior.

O acúmulo de biomassa fresca em todos os órgãos da planta foi estimulado em maior intensidade pela dose de 80 mg L⁻¹ de AFVC aplicado via foliar. Suh et al. (2014) relataram que a aplicação foliar de ácido fúlvico melhorou o crescimento de plantas de tomate com um aumento significativo na altura das plantas e no peso fresco e seco, e aumentando o rendimento na produção.

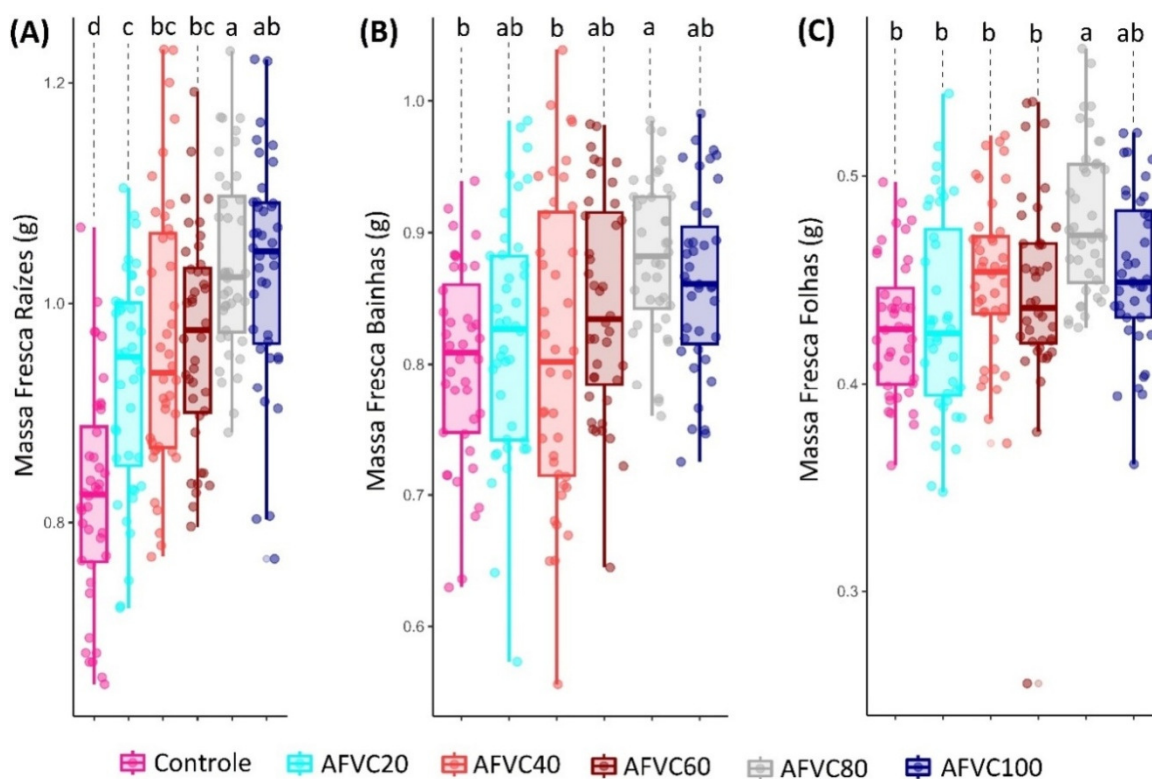


Figura 17. Produção de biomassa fresca das raízes (A), bainhas (B) e folhas (C) e de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) pela aplicação foliar de doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto. Conjunto de dados de um tratamento com a mesmas letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=40$.

A Figura 18 mostra o acúmulo de biomassa seca em raízes, bainhas e folhas de plantas de arroz devido a aplicação foliar de doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto. Houve incremento significativo na massa seca radicular pela aplicação de AFVC em todas as doses testadas, quando comparadas ao controle. Entre as doses avaliadas, a de 80 mg L^{-1} de AFVC foi a que mais estimulou a produção de biomassa seca das raízes, com aumento de 18% em relação ao controle, seguida pela concentração de 100 mg L^{-1} , que não diferiu significativamente da dose de maior resposta e nem das doses de $20, 40$ e 60 mg L^{-1} (Figura 18A). O maior acúmulo de massa seca das bainhas de plantas de arroz foi observado pela aplicação de AFVC a 80 e 100 mg L^{-1} , sendo significativamente superior ao controle e às outras doses de AFVC, que não diferiram entre si. A dose de 80 mg L^{-1} resultou no maior aumento de massa seca das bainhas, sendo de 15% em comparação com o controle. As doses de $20, 40$ e 60 mg L^{-1} não resultaram em plantas com biomassa das bainhas significativamente diferentes ao controle (Figura 18B). A Figura 18C mostra que todas as concentrações de AFVC resultaram em aumento na produção de biomassa seca das folhas, em relação ao controle, porém a dose de 20 mg L^{-1} não diferiu significativamente das plantas não tratadas com AFVC. Independente da dose de AFVC, houve aumento da seca foliar em relação ao controle, sendo a concentração de 80 mg L^{-1} a que mais estimulou o acúmulo de biomassa (14%), seguida pela dose de 100 mg L^{-1} , não diferindo significativamente entre si. As doses intermediárias (40 e 60 mg L^{-1}) não diferiram das concentrações de 20 e 100 mg L^{-1} . A dose de 20 mg L^{-1} não diferiu significativamente das plantas controle.

Assim como para os resultados de produção de biomassa fresca, o acúmulo de massa seca em todos os órgãos da planta foi estimulado em maior intensidade pela aplicação foliar de AFVC na dose de 80 mg L^{-1} . Em estudo realizado com feva, em que houve a aplicação foliar

de ácido fúlvico em quatro concentrações diferentes, foi observado aumento no peso total fresco, seco e da área foliar (ABDEL-BAKY et al. 2019).

Olaetxea et al. (2017) afirmam que deve se considerar que as substâncias húmicas atuam majoritariamente no órgão vegetal onde são aplicadas. Os dados de produção de massa fresca corroboram com esta afirmação, uma vez que aplicação foliar de AFVC na melhor dose resultou em aumento de 11% da biomassa fresca das raízes e de 21% da biomassa fresca das folhas, mostrando um maior estímulo no acúmulo envolvendo a parte aérea. Porém, para a produção de biomassa seca o comportamento foi diferente, aumentando a massa seca das raízes em 18% e a das folhas em 14%. Os resultados indicam que a aplicação foliar de AFVC favoreceu a manutenção dos níveis de água nas folhas, contribuindo para um balanço do potencial hídrico foliar, além de estimular a concentração de solutos nas raízes. Taiz et al. (2017) afirmam que o baixo potencial hídrico na folha pode ocasionar em transtornos fisiológicos e bioquímicos em plantas em nível primário e secundário, como desidratação celular são redução da expansão celular e foliar, diminuição das atividades celulares e metabólicas, fechamento estomático, inibição fotossintética, desestabilização de membranas e proteínas e produção de EROs.

Sendo assim, estes resultados sugerem que houve estímulo à absorção e translocação de água e solutos pela planta, correlacionado com o estímulo sobre o desenvolvimento radicular pela aplicação foliar de ácido fúlvico de vermicomposto, resultando em aumento da biomassa fresca e seca de raízes, bainhas e folhas.

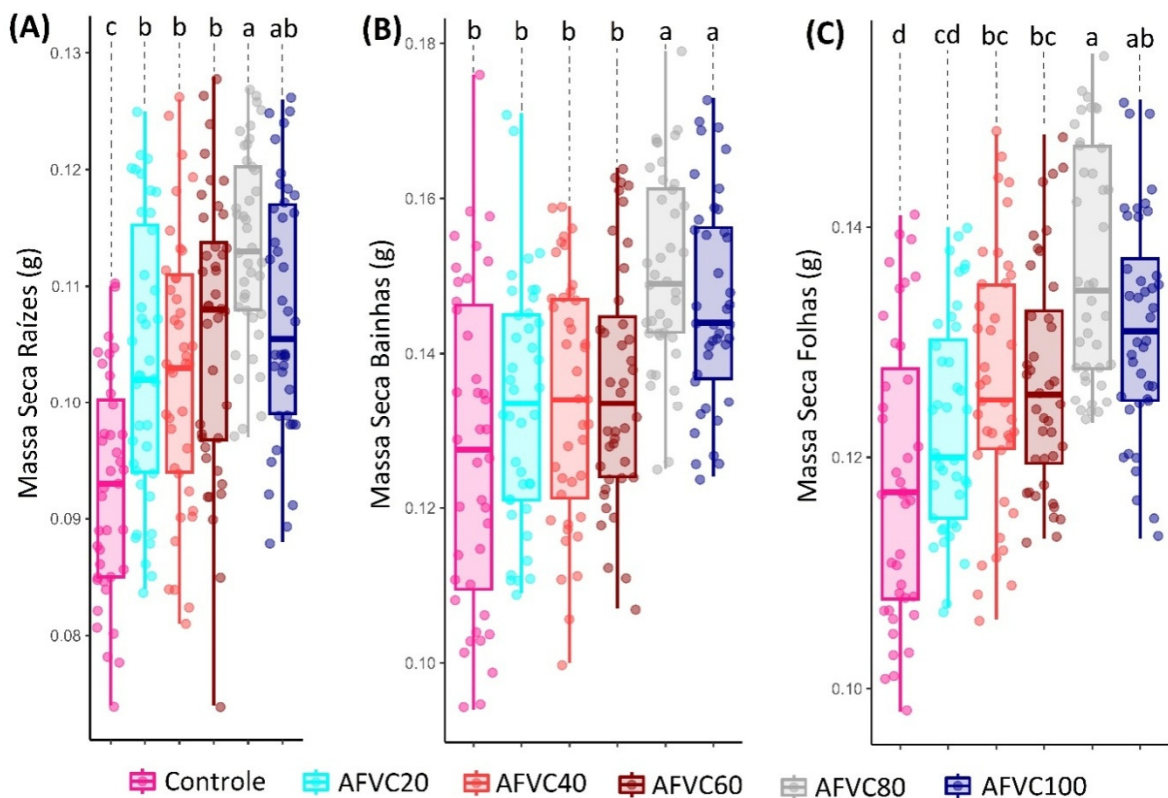


Figura 18. Produção de biomassa seca das raízes (A), bainhas (B) e folhas (C) de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) pela aplicação foliar de doses crescentes de ácido fúlvico de vermicomposto. C. Conjunto de dados de um tratamento com a mesmas letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=40$.

3.5.4 Experimento 3 – mecanismos envolvidos na bioatividade de substâncias húmicas

a) Efeito da aplicação de ácido húmico e fúlvico de vermicomposto e de ácido húmico de leonardita na expressão relativa de diferentes genes de raízes de pepino

A expressão relativa de diferentes genes em raízes de plantas de pepino que codificam para proteínas responsáveis pela absorção e fluxo de transportes de diferentes íons em relação ao controle, quando aplicado ácido húmico de vermicomposto à 50 mg L⁻¹, é mostrada na Figura 19. Às 120 horas após aplicação de AHVC via radicular apenas o gene *CsSultr1.2*, responsável pelo transporte de alta afinidade de enxofre e com sua expressão associada a eventos de estresse (ZANGH et al., 2021), mostrou expressão superior ao controle, porém sem superioridade significativa. Os genes *CsHA3* e *CsHA9*, que codificam para duas isoformas de H⁺-ATPase transmembranar, envolvidas na absorção de nutrientes, transporte de íons e a adaptação a estresses abióticos (JANICKA-RUSSAK et al., 2012), foram os mais reprimidos em relação ao controle às 120 horas após aplicação, porém sem diferir estatisticamente.

Os genes restantes não apresentaram expressão ou repressão com diferenças consideráveis em relação ao controle, estando todos envolvidos no transporte e fluxo de nutrientes pela planta. No que diz respeito à absorção de nitrogênio, os genes *CsNRT1.2A* e *CsNRT1.9* codificam para transportadores que operam em um sistema de baixa afinidade para NO₃⁻ (ANWAR et al., 2019), já o gene *CsNRT2.5* codifica para um transportador de alta afinidade por NO₃⁻ (LI et al., 2018). Sobre os genes que codificam para proteínas envolvidas no transporte e fluxo de potássio, o *CsAKT1* é responsável por um canal de baixa afinidade envolvido na absorção de K⁺ de forma ativa, já o *CsSKOR* codifica para um canal de potássio tipo shaker no arroz, relacionado ao carregamento de K⁺ no xilema e que também pode facilitar a passagem de cálcio (GAYMARD et al., 1998; PENG et al., 2022). Diferentemente do gene que codifica para o transportador de alta afinidade de enxofre, o gene *CsSultr 2.2*, envolvido no transporte baixa afinidade de enxofre (ZANGH et al., 2022), não apresentou diferenças com o controle pela aplicação de AHVC via radicular. Por fim, também foram avaliados a expressão relativa dos genes associados a absorção e translocação de ferro, sendo o *CsFRO2* responsável por codificar para enzima Fe⁺³-quelato redutase, que reduz Fe⁺³ a Fe⁺², enquanto o *CsIRT1* é responsável pelo transportador do ferro reduzido, que também pode transportar Zn, Mn, Co e Ni (WATERS et al., 2007; MORRISSEY & GUERINOT, 2009) (Figura 19).

Estes resultados mostram que neste momento de avaliação apenas o gene *CsSultr1.2* apresenta expressão superior ao controle, podendo indicar que à sinalização de algum evento estressante, como relatado por alguns autores na literatura pela aplicação de AHVC via radicular (GARCÍA et al., 2016; CASTRO et al., 2021, 2022).

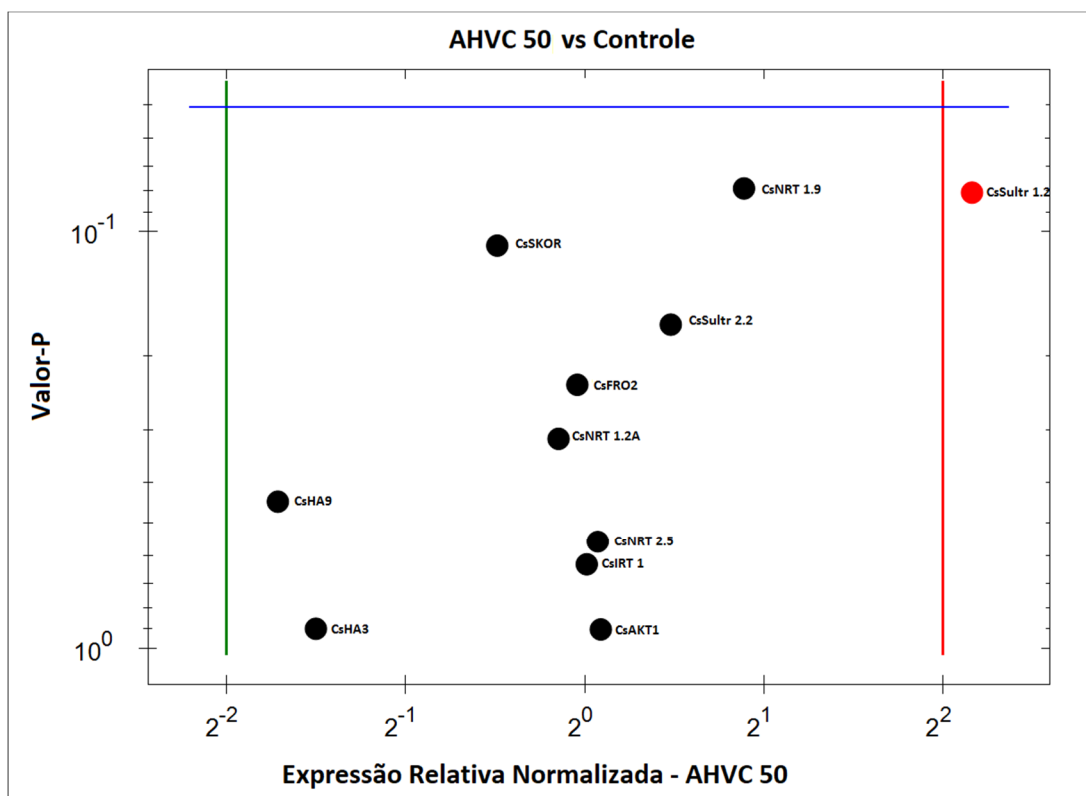


Figura 19. Expressão relativa normalizada de diferentes genes em raízes de plantas de pepino submetidas à aplicação de ácido húmico extraído de vermicomposto à 50mg L⁻¹, em relação ao controle, n=4.

A Figura 20 mostra a expressão relativa de diferentes genes em raízes de plantas de pepino que codificam para proteínas responsáveis pelo transporte de diferentes íons em relação ao controle, quando aplicado AFVC na concentração de 50 mg L⁻¹. Às 120 horas após aplicação de AFVC via radicular o gene *CsNRT1.9* foi o que apresentou maior expressão entre todos, seguido pelos genes *CsNRT1.2A*, *CsSultr1.2* e *CsIRT1*, respectivamente, todos com expressão significativamente superior ao de plantas controle. Estes resultados mostram que até este momento havia sinalização para codificação de transportadores de nitrogênio de baixa afinidade, ferro e de alta afinidade de enxofre, que também está associado a eventos de estresse, sendo a expressão do gene *CsIRT1* um efeito observado também pela aplicação de AHVC.

Quaggiotti et al. (2004) mostraram que o metabolismo do nitrogênio é influenciado pela atividade das substâncias húmicas. Em culturas de milho, as SH de menor massa molecular promovem a captação e a incorporação do nitrogênio na forma de nitrato (N-NO₃⁻), desencadeando a ativação de genes responsáveis pela codificação de transportadores de nitrato nas raízes (*ZmNrt2.1* e *ZmNrt1.1*) e de diferentes isoformas de H⁺-ATPase (*Mha1* e *Mha2*). ().

Estudos revelaram que as substâncias húmicas desempenham um papel regulatório nos genes relacionados ao sistema de transporte e assimilação do enxofre. A aplicação de AH por via radicular estimulou a expressão dos transportadores de membrana plasmática *BnSultr1.1* e *BnSultr1.2*, resultando em um incremento de 30,8% no teor de enxofre nas folhas e de 13,7% nas raízes. (JANNIN et al.; 2012).

Aguirre et al. (2009), em trabalho realizado com cultura de pepino, mostraram que os ácidos húmicos extraídos de leonardita têm a capacidade de elevar a expressão da Fe³⁺- quelato redutase (*CsFRO1*) e do transportador de ferro de alta afinidade (*CSIRT1*), ao mesmo tempo que promovem o aumento da atividade da Fe³⁺- quelato redutase e da H⁺-ATPase.

A aplicação de AFVC à 50 mg L⁻¹ via radicular resultou na supressão dos genes *CsHA3*, *CsHA9*, *CsAKT1* e *CsNRT2.5*, sendo que os dois últimos não apresentaram diferenças significativas com o controle. Os genes que codificam para isoformas de H⁺-ATPases (*CsHA3* e *CsHA9*) apresentaram repressão da expressão gênica significativamente inferior ao de plantas controle. É interessante ressaltar que a aplicação de AHVC, assim como a aplicação de AFVC, resultou em uma maior repressão dos genes (*CsHA3* e *CsHA9*) dentre todos os avaliados, porém sem diferir estatisticamente do controle. A expressão relativa dos genes *CsSKOR*, *CsSultr2.2* e *CsFRO2* não foi alterada.

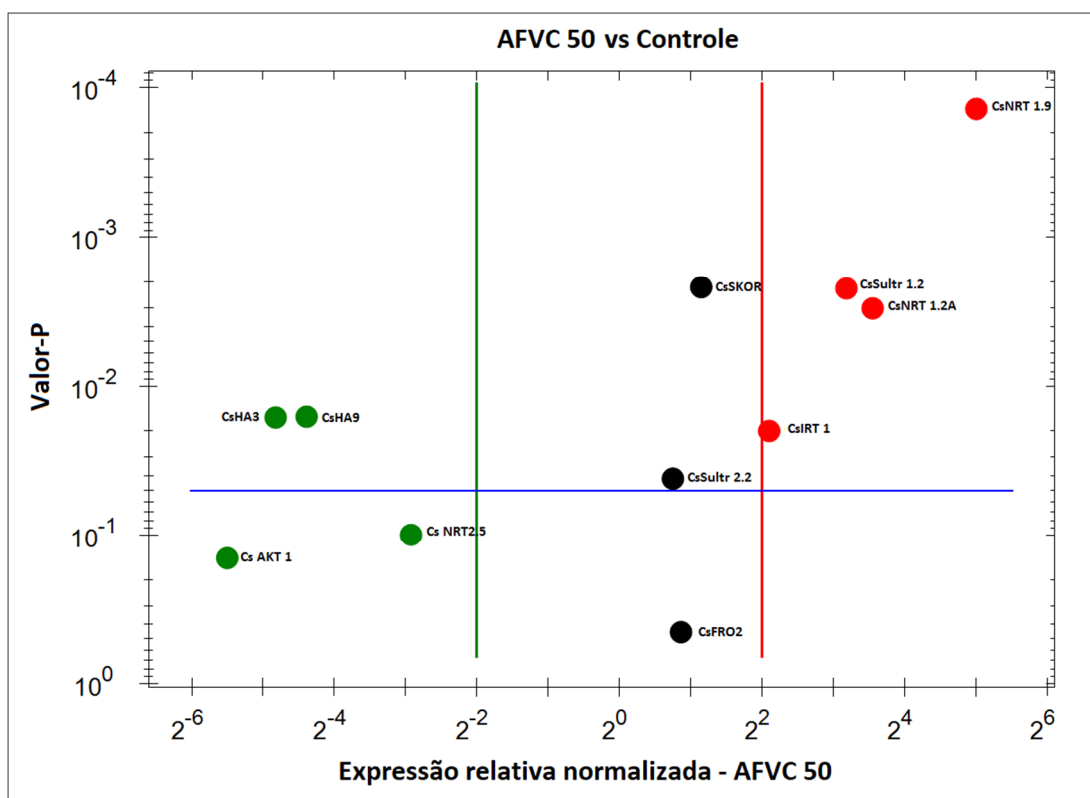


Figura 20. Expressão relativa normalizada de diferentes genes em raízes de plantas de pepino submetidas à aplicação de ácido fúlvico extraído de vermicomposto à 50 mg L⁻¹, em relação ao controle, n=4.

A Figura 21 apresenta os efeitos da aplicação radicular de AHCHECO na expressão relativa de vários genes nas raízes das plantas de pepino, os quais codificam proteínas responsáveis pelo transporte de diversos íons, em comparação com o controle. Observou-se que, 120 horas após a aplicação de AHCHECO via radicular, apenas os genes que codificam para transportadores de alta afinidade de NO₃⁻ (*CsNRT1.9* e *Cs.NRT1.2A*) apresentaram expressão significativamente maior do que em raízes de plantas controle.

Em estudo conduzido por Tavares et al. (2016), os autores observaram que os ácidos húmicos extraídos de vermicomposto causaram alterações nos parâmetros cinéticos de absorção do nitrogênio na forma de N-NO₃⁻. Conforme relatado nesse estudo, os ácidos húmicos induziram a expressão dos transportadores de alta e baixa afinidade de NO₃⁻ (*OsNRT2.1-2.2* e *OsNRT1.1*), bem como de diversas isoformas da H⁺-ATPase presentes na membrana plasmática das raízes (*OsAI-A8*).

Os efeitos na redução da expressão gênica, neste momento de avaliação, foram bem semelhantes aos observados pela aplicação de AFVC, havendo supressão estatisticamente significativa dos genes *CsHA3*, *CsHA9*, *CsAKT1* e *CsNRT2.5*. Com isto, observamos que todas

as substâncias húmicas aplicadas via radicular resultaram em redução na expressão dos genes associados às H⁺-ATPases após 120 horas de início dos tratamentos, porém com intensidades diferentes. Os genes *CsSKOR*, *CsIRT1*, *CsFRO2*, *CsSultr1.2* e *CsSutr2.2* não tiveram sua expressão alterada pela aplicação de AHCHECO.

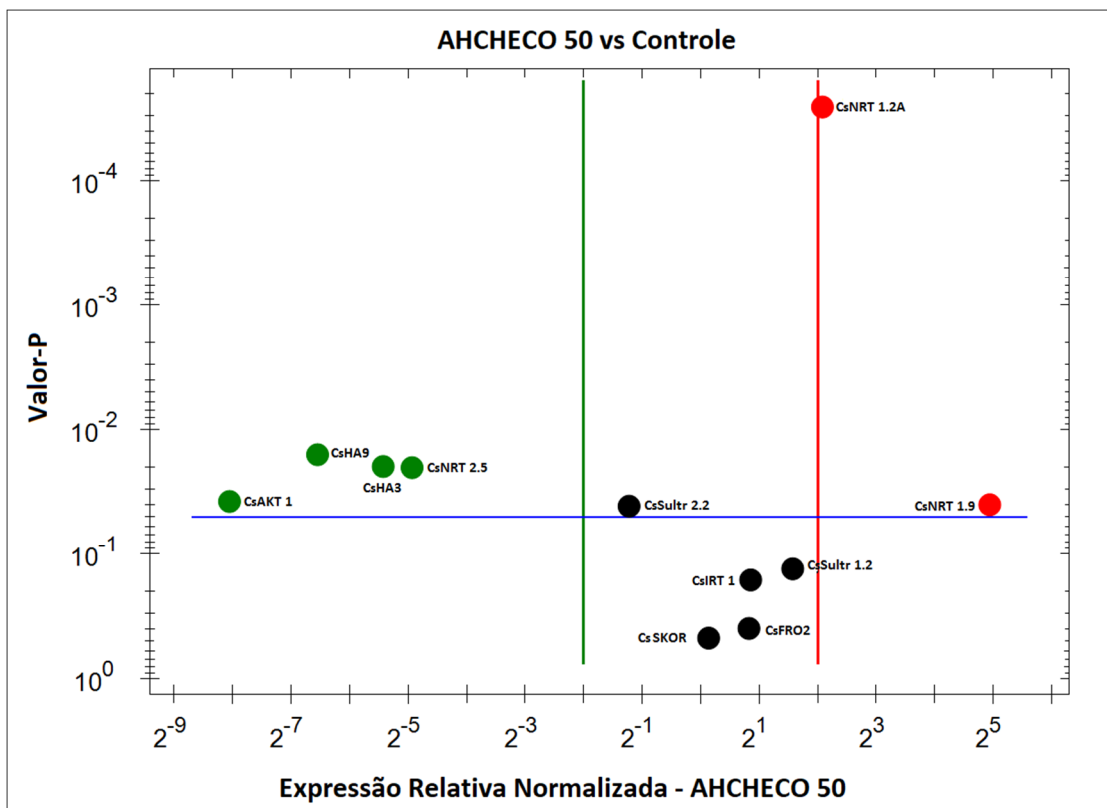


Figura 21. Expressão relativa normalizada de diferentes genes em raízes de plantas de pepino submetidas à aplicação de ácido húmico extraído de leonardita à 50 mg L⁻¹, em relação ao controle n = 4.

As SH estimulam a absorção e assimilação de nutrientes pelas plantas por efeitos tanto diretos quanto indiretos, sendo a assimilação de nutrientes influenciada pela capacidade dos compostos húmicos de regular a expressão de genes que codificam transportadores de macro e micronutrientes (QUAGGIOTTI et al., 2004; AGUIRRE et al., 2009; JANNIN et al., 2012; MORA et al., 2014; TAVARES et al., 2016).

Jannin et al. (2012) documentaram ações do ácido húmico derivado de turfa em *Brassica napus* a nível genético. As modificações na expressão gênica foram detalhadamente caracterizadas e relacionadas aos eventos fisiológicos. É notável que quatro vias metabólicas específicas foram particularmente impactadas, tanto na parte aérea quanto nas raízes, em decorrência do tratamento com ácido húmico: o metabolismo celular geral (compreendendo 10,6% do total de genes com expressão diferencial), o metabolismo de nitrogênio e enxofre (representando 6,6% do total de genes com expressão diferencial), o metabolismo de carbono e a fotossíntese (abrangendo 6,1% do total), além dos genes relacionados às respostas ao estresse (constituindo também 6,1% do total).

De maneira geral, os estudos envolvendo a expressão de genes pela aplicação radicular de SH são avaliados nas horas iniciais (24 e 48 horas) após início dos tratamentos. Porém, nosso trabalho avaliou a expressão relativa dos genes às 120 horas após início dos testes (momento da coleta), com o objetivo de verificar a existência e tipos de regulação gênica que ocorrem após os estágios iniciais de sinalização desencadeadas pelas SH. Este fato justifica certas

diferenças na expressão gênica pela aplicação de compostos húmicos aqui observada, em relação a outros estudos relatados na literatura.

Por exemplo, alguns estudos mostram que nos momentos iniciais após a aplicação de substâncias húmicas via radicular há estímulo na expressão de genes codificantes para bombas de prótons da membrana plasmática (H^+ -ATPase), assim como aumento de sua atividade (QUAGGIOTTI et al., 2004; CANNELLAS et al., 2015; TAVARES et al., 2016). A aplicação de substâncias húmicas via radicular é responsável por uma modulação positiva da atividade e da expressão das H^+ -ATPase, estimulando o bombeamento de H^+ para o apoplasto, sendo uma das respostas principais para o desenvolvimento radicular de plantas. Esse processo resulta na hiperpolarização da membrana e no aumento do influxo de íons Ca^{2+} para o citosol, desempenhando o papel de segundo mensageiro que desencadeia uma resposta em cascata (CANNELLAS et al., 2002). Porém, os resultados do nosso trabalho mostram que os genes relacionados às H^+ -ATPases foram os que apresentaram maior supressão gênica, podendo ser um indicativo de que após o estímulo inicial sobre as bombas de prótons desencadeado pelas substâncias húmicas, resultando em aumento da expressão e atividade de outros transportadores de íons, há uma tendência para um fase de homeostase gênica, indicada pela supressão dos genes que codificam para as H^+ -ATPases às 120 horas após aplicação dos tratamentos.

No presente estudo, foi possível observar alterações na regulação gênica, porém, de maneira diferenciada de acordo com a substância húmica aplicada. Podemos afirmar que o material de origem e o tipo de fração húmica influenciam nos tempos e intensidades de expressão e supressão gênica. De maneira geral, às 120 horas após aplicação dos tratamentos, o AFVC apresentou maior quantidades de genes diferencialmente expressos em relação ao controle, enquanto o AHVC resultou nas menores quantidades, não havendo diferenças significativas com o controle e indicando que os estímulos sobre a rede genética ocorreram primeiro, tendendo mais rapidamente a um estado de equilíbrio na expressão dos genes.

No que diz respeito à regulação transcricional das redes genéticas, como discutido anteriormente, existem pesquisas evidenciando que a aplicação de substâncias húmicas têm efeito sobre a atividade de fatores de transcrição específicos associados à absorção pelas raízes e ao subsequente metabolismo de vários nutrientes. Isso, por sua vez, pode levar a benefícios significativos no metabolismo das plantas e no crescimento das suas raízes (AGUIRRE et al., 2009; TREVISAN et al., 2010; AZCONA et al., 2011).

b) Concentrações de AIA, ABA, ácido salicílico, ácido jasmônico e citocininas em tecidos vegetais de plantas de pepino submetidas a aplicação radicular de SH

A Figura 22 mostra os teores de ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e citocininas em raízes e folhas de plantas de pepino submetidas à aplicação via radicular de AHVC, AFVC e AHCHECO, na concentração de 50 mg L⁻¹. O teor de AIA nas raízes foi significativamente menor pela aplicação de todos os tipos de substâncias húmicas, em comparação ao controle, não diferindo estatisticamente entre si. Já o teor de AIA nas folhas foi significativamente menor do que o observado em plantas controle pela aplicação de AHVC, enquanto a aplicação do AFVC e AHCHECO não resultaram em diferenças significativas com o controle e nem entre si (Figura 22A).

Mora et al. (2010) afirmam que estímulos na expressão de genes, no metabolismo e desenvolvimento de plantas são associados a efeitos complementares na concentração hormônios vegetais nas raízes e na parte aérea das plantas. Dentre as concentrações endógenas de reguladores de crescimento vegetal que podem ser alteradas nas raízes devido à influência das substâncias húmicas, destaca-se uma relação significativa com as auxinas e suas características ou atividades biológicas nas raízes. Essa relação é respaldada por uma extensa base de evidências provenientes de numerosas pesquisas (ZANDONADI et al., 2007;

TREVISAN et al., 2010; CANELLAS et al., 2011; MORA et al., 2014; OLAETXEA et al., 2017,2019). Os efeitos primordiais desencadeados pelas substâncias húmicas, por meio da influência do Ácido Indolacético (AIA), estão associados à morfologia das raízes e à promoção da proliferação lateral das mesmas (CANELLAS et al., 2002; MORA et al., 2010; MUSCOLO et al., 2013).

A heterogeneidade e a complexidade estrutural das substâncias húmicas têm dado suporte à hipótese de que essas substâncias podem conter grupos ou estruturas químicas similares àquelas encontradas nas auxinas. Esses componentes têm a capacidade de interagir com os receptores hormonais nas plantas, desencadeando uma cascata de eventos que resulta no aumento da ativação da enzima H^+ -ATPase. Esse processo, por sua vez, estimula os mecanismos relacionados ao crescimento das raízes laterais em plantas de milho (CANELLAS et al., 2002). MUSCOLO et al. (2013) observaram que a presença de estruturas semelhantes às auxinas dentro da composição das substâncias húmicas não é o único fator capaz de explicar os efeitos que essas substâncias exercem nas plantas. A capacidade das substâncias húmicas (SH) de agir de maneira semelhante à auxina tem sido associada à sua habilidade de interagir com as membranas em culturas de células de cenoura (*Daucus carota*). Nesse contexto, a presença de grupos carboxílicos nas SH de baixo peso molecular tem sido identificada como um fator que favorece essa interação (MUSCOLO et al., 2007).

A Figura 22B mostra que os teores de ABA foi significativamente menor em raízes de plantas tratadas com todos os tipos de substâncias húmicas após 120 horas de início dos testes, quando comparado com o controle. O AHCHECO resultou nos menores teores de ABA nas raízes, sendo estatisticamente menor do que o observado em raízes tratadas com AHVC e AFVC. Nas folhas, a aplicação de AFVC não resultou em diferença significativa do teor de ABA em relação ao controle, enquanto o AHVC foi responsável pelo menor teor observado, diferindo significativamente do controle e do AFVC. O AHCHECO mostrou teor de ABA nas folhas com valores intermediários, não apresentando diferenças estatísticas com os demais tratamentos.

Mora et al. (2012, 2014) observaram que a aplicação de ácido húmico obtido a partir de leonardita estimula a síntese ABA por meio de vias que dependem do AIA, do óxido nítrico (ON) e do etileno. Olaetxea et al. (2015, 2017, 2019) demonstraram que os efeitos positivos do ácido húmico extraído de leonardita no crescimento da parte aérea das plantas estão relacionados a interações físicas entre o ácido húmico e as raízes, que provocam um estado fisiológico semelhante ao estresse devido a alterações na condutividade hidráulica radicular. Essas mudanças parecem ser reguladas pelo aumento na síntese de ABA e AIA-ON.

O teor de ácido jasmônico nas raízes foi significativamente reduzido após 120 horas da aplicação das substâncias húmicas, em comparação com as raízes controle, não mostrando diferença estatística entre si. A resposta nas folhas foi semelhante ao observado em raízes, os teores de AJ também foram significativamente menor em folhas nos tratamentos com substância húmica em relação ao controle, independente do tipo, não resultando em teores com diferenças significativas entre si (Figura 22C).

De Hita et al. (2020) realizaram estudo em que houve aplicação radicular de ácido húmico extraído de leonardita em plantas de pepino, os autores observaram que às 24 e 72 horas após aplicação, houve regulação hormonal que resultou em aumento nos teores de ácido jasmônico nas raízes de plantas tratadas com a substância húmica naquele momento.

Os teores de AIA, ABA e AJ em raízes de plantas de pepino tratadas com AHVC, AFVC e AHCHECO via radicular foram significativamente menores do que os observados em raízes de plantas controle, tal como os teores nas folhas, que foram menor ou igual ao controle. Assim como para os estudos envolvendo expressão gênica, grande parte dos estudos envolvendo o efeito de aplicação radicular de substâncias húmicas sobre a regulação hormonal realizam avaliações em momentos iniciais, até 72 horas, havendo aumento nos teores de AIA, ABA e

AJA em relação ao controle (MORA et al. 2014; OLAETXEA et al., 2019; DE HITA et al., 2020). Nossos resultados mostram que 120 horas após aplicação de diferentes tipos de substâncias húmicas, o estímulo sobre o balanço hormonal da planta resultou em teores de AIA, ABA e AJ menores do que de plantas controle. Por mais que hajam semelhanças entre os efeitos sobre as quantidades de AIA, ABA e AJ em folhas e raízes de plantas tratadas com substâncias húmicas, que apresentam distintas propriedades físico-químicas, também foram observadas diferenças, como discutidas anteriormente.

A Figura 22D mostra que todas as substâncias húmicas resultaram em teor de ácido salicílico nas raízes, às 120 horas, significativamente menor do que o observado em plantas controle, sendo a aplicação de AHCHECO responsável pela maior redução no teor de AS nas raízes, estatisticamente inferior ao observado pela aplicação de AHVC e AFVC. Nas folhas, foi possível observar redução no teor de AS pela aplicação de todos os tipos de composto humificados, porém sem diferenças significativas.

De Hita et al. (2020) também observaram que a aplicação de ácido húmico extraído de leonardita em plantas de pepino via radicular resultou em redução ou manutenção do teor de AS às 24 e 72 horas. Nossos resultados mostram que às 120 horas após aplicação dos tratamentos o teor de AS na raiz continua menor do que o observado em plantas sem aplicação de SH.

A aplicação de ácidos húmicos, independente do material de origem, foi responsável por teor de citocininas nas raízes significativamente menor do que o encontrado em plantas controle e nas tratadas com AFVC. As raízes que não receberam substâncias húmicas e as tratadas com AFVC não apresentaram teor de citocininas significativamente diferente entre si. Nas folhas, o teor de citocininas foi significativamente superior pela aplicação de ácidos húmicos, independente da fonte, quando comparado com o observado em plantas controle e nas tratadas com AFVC, que não diferiram com significância entre si (Figura 22E).

Mora et al. (2010) observaram que a aplicação de ácido húmico (AH) obtido de leonardita via radicular em plantas de pepino resultou em um aumento dos teores de citocininas e poliaminas nas folhas, porém, houve uma redução desses compostos nas raízes, até as 72 horas após aplicação. Além disso, observaram que essa aplicação regulou a absorção de diversos nutrientes pelas plantas.

Os resultados obtidos por Mora et al. (2010) em relação a aplicação de ácidos húmicos são semelhantes aos encontrados neste trabalho, mesmo que a determinação dos teores tenha sido realizada em tempos diferentes. Assim como no trabalho discutido, observamos que a aplicação de ácido húmico, tanto o AHVC quanto o AHCHECO, resultaram em redução dos teores de citocinina nas raízes e aumento nas folhas. Porém, a aplicação de AFVC não alterou o teores de citocinina nas folhas e raízes, em relação ao controle, podendo indicar que o ácido fúlvico atue ao longo do tempo na regulação dos níveis de citocinina por vias diferentes das exercidas pelos ácidos húmicos.

Os estímulos sobre a regulação hormonal desencadeados pela aplicação das diferentes substâncias húmicas apresentou alguns padrões, porém a peculiaridades pada cada SH, de acordo com a sua fonte e tipo de SH, resultando em características físico-químicas e comportamentos diferentes.

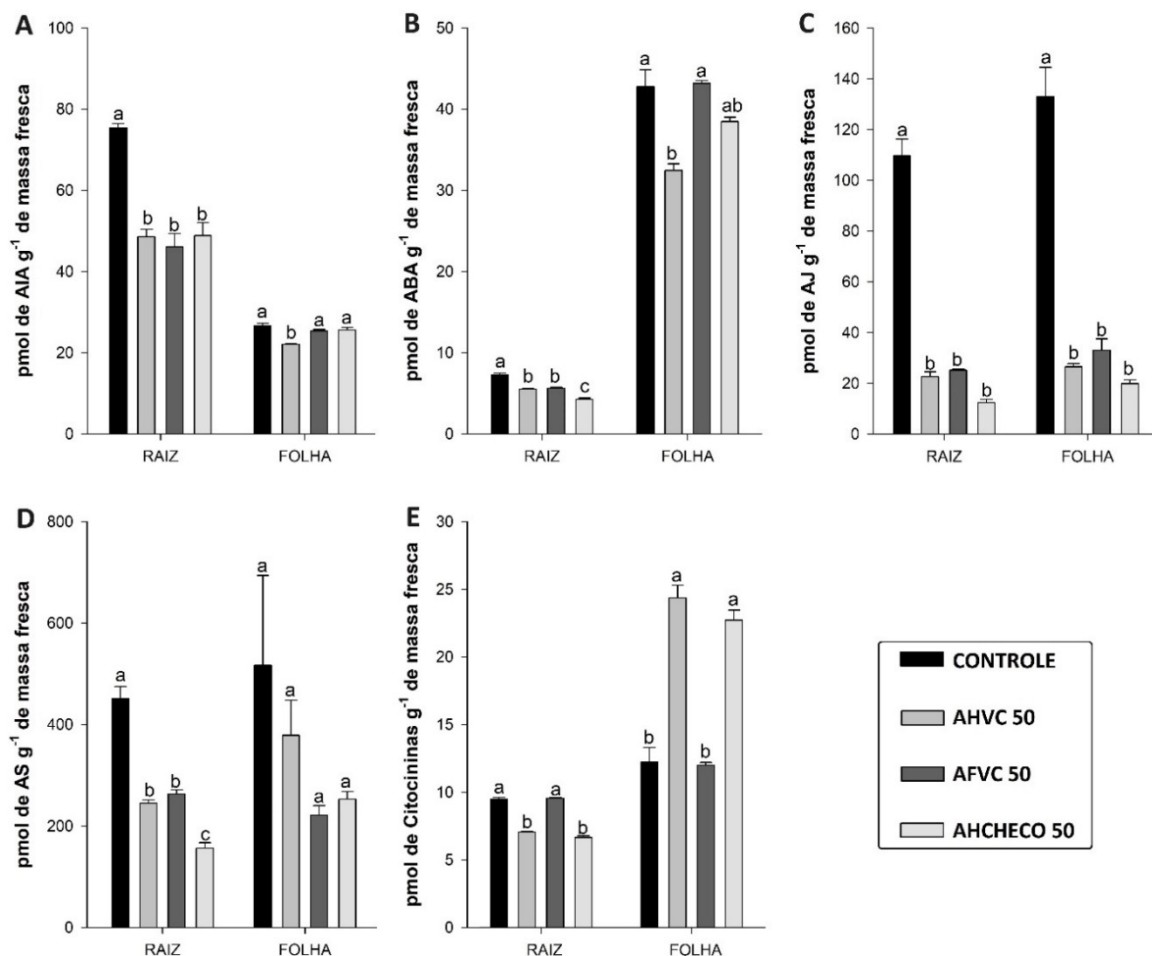


Figura 22. Concentração de ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e de citocininas, em raízes e folhas de plantas de pepino sob aplicação via radicular de diferentes substâncias húmicas à 50 ppm. Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=4$.

c) Composição elementar de tecidos radiculares e foliares de plantas de pepino após aplicação radicular de diferentes substâncias húmicas

A Tabela 4 mostra a composição elementar de raízes e folhas de plantas de pepino submetidas a aplicação radicular de AHVC, AFVC e AHCHECO à 50 ppm. A aplicação de todos os tipos de substâncias húmicas resultou em aumento significativo na quantidade de carbono radicular, sendo que o teor em raízes tratadas com AHCHECO ainda significativamente superior aos de outras SH. Nas raízes, apenas a aplicação de AFVC resultou em teor de C estatisticamente superior aos demais tratamentos.

Em relação ao teor de hidrogênio, assim como para o percentual de C, a aplicação de AHVC, AFVC e AHCHECO resultou em aumento significativo nas raízes quando comparado com o controle, sendo que as tratadas com AHCHECO mostraram quantidade de C estatisticamente superior ao estímulo resultante do AHVC. Nas folhas, apenas a aplicação de AFVC resultou em quantidade de carbono significativamente superior ao controle.

O teor de nitrogênio nas raízes não sofreu alterações significativas devido à aplicação de substâncias húmicas via radicular. A quantidade de N nas folhas aumentou significativamente somente pela aplicação de AFVC. O teor de oxigênio na raízes reduziu significativamente independentemente do tipo de substância húmica aplicada em comparação com o controle, porém, o AHCHECO resultou em quantidade de O significativamente inferior

aos observado pela aplicação de AHVC e AFVC. Nas folhas apenas a aplicação de AFVC resultou alterações significativas com o controle, reduzindo o teor de oxigênio neste órgão.

Os resultados mostram claramente que há diferenças nos efeitos sobre a composição elementar de raízes e folhas de plantas, sendo de um tipo para ácidos húmicos e de outro para ácido fúlvico. De maneira geral, os estímulos nas quantidades de C, H, N e O das raízes foram semelhantes, havendo aumento ou redução conjunta pelo efeito das substâncias húmicas, porém com intensidades diferentes, sendo o AHCHECO o que resultou nas alterações mais abruptas, como discutido anteriormente. No entanto, nas folhas, as quantidades de C, H, N e O sofreram alterações significativas apenas pela aplicação de AFVC, havendo aumento na quantidade de C, H e N, e redução do teor de O.

Tabela 4. Composição elementar de raízes e folhas de plantas de pepino submetidas a aplicação radicular de AHVC, AFVC e AHCHECO à 50 ppm.

		Controle	AHVC 50	AFVC 50	AHCHECO 50
		%			
C	Raiz	36,07 c	38,25 b	38,51 b	39,61 a
	Folha	39,36 b	38,57 b	60,54 a	37,07 b
H	Raiz	4,63 c	5,22 b	5,27 ab	5,39 a
	Folha	5,75 b	5,49 b	8,70 a	5,43 b
N	Raiz	5,55 a	5,57 a	5,46 a	5,47 a
	Folha	5,68 b	5,24 b	8,86 a	5,30 b
O	Raiz	53,75 a	50,96 b	50,76 b	49,53 c
	Folha	49,21 a	50,70 a	21,89 b	52,20 a

* valores na mesma linha com letras semelhantes não diferiram significativamente por tukey $p < 0,05$; $n=4$.

d) Concentrações de íons nas raízes e folhas de pepino

A Tabela 5 apresenta o teor de elementos em raízes e folhas de pepinos tratados com AHVC, AFVC e AHCHECO à 50 e 100 mg L⁻¹. O teor de K nas raízes foi significativamente maior que o controle apenas em plantas tratadas com AFVC 50, porém AHVC 50 e AHCHECO 50 não diferiram estatisticamente dela. Nas folhas, por mais que a maior quantidade fosse observada pela aplicação de AFVC50, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. O teor de P nas raízes aumentou significativamente pela aplicação de AHVC 50 e AFVC 50 em comparação com o controle. Nas folhas, assim como para o K, a aplicação de AFVC resultou no maior teor de P, porém não foi detectada diferença estatística entre os tratamentos. Em relação aos níveis de cálcio nas raízes, foram observadas alterações significativas pela aplicação da AHVC 100 e AHVC 100, que resultaram em redução de Ca neste órgão vegetal. A quantidade de Ca nas folhas não sofreu alterações significativas. Os teores de Mg e S, tanto em raízes como em folhas, não sofreram alterações significativas pela aplicação das diferentes fontes e doses de substâncias húmicas.

Os teores de macronutrientes analisados (K, P, C, Ca, Mg e S) aumentaram com maior intensidade nas plantas tratadas com substâncias húmicas na concentração de 50 mg L⁻¹. Os bioestimulantes aplicados a 100 mg L⁻¹ resultaram na manutenção ou redução dos teores de macronutrientes, dependendo da fonte aplicada e do macronutriente avaliado. De modo geral, o tratamento com AFVC 50 foi o que mais favoreceu o acúmulo de macronutrientes, tanto nas folhas quanto nas raízes.

O impacto das substâncias húmicas na promoção da absorção de íons pelas plantas ocorre devido a uma combinação de efeitos diretos no metabolismo das plantas e alterações na rizosfera. Embora os mecanismos subjacentes que estimulam a absorção de nutrientes nas plantas tratadas com SH ainda não estejam completamente compreendidos, os benefícios desses

compostos na nutrição das plantas são notáveis (VARANINI & PINTON, 2006; JANNIN et al.; 2012; MORA et al., 2014; TAVARES et al., 2016). Entre os efeitos positivos das SH na absorção mineral das plantas, destaca-se a capacidade de aumentar a atividade da enzima H⁺-ATPase na membrana plasmática das raízes, o que, por sua vez, estimula a captação de certos macro e micronutrientes (ZANIN et al., 2019; TAVARES et al., 2019).

O acúmulo de ferro nas raízes diminuiu em todos os tratamentos contendo substâncias húmicas, quando comparado ao controle, havendo redução significativa por efeito do AHVC 100, AFVC 100 e AHCHECO 100. Por sua vez, o acúmulo de Fe nas folhas não foi significativamente alterado com a aplicação dos bioestimulantes. Os teores de Zn e Mn, tanto nas raízes quanto nas folhas, não mostraram alterações significativas em plantas tratadas com SH, quando comparado com o controle. O teor de cobre nas raízes reduziu significativamente pela aplicação de AHVC 100 e AFVC 100, em relação ao controle. Já nas folhas não houveram alterações significativas nas quantidades de Cu. O teor de boro nas raízes reduziu significativamente por meio da aplicação de AHVC 100 e AHCHECO 100, em relação ao controle. Não houve diferenças significativas nos teores de B das folhas. Os teores de molibdênio da raízes e folhas diferiram significativamente entre os tratamentos.

De maneira geral, assim como para os teores de macronutrientes, o micronutrientes analisados (Fe, Zn, Mn, Cu, B e Mo) mostraram um balanço em suas quantidades em folhas e raízes de plantas de pepino mais favorecido pela aplicação de substâncias húmicas na concentração de 50 mg L⁻¹.

Diversos estudos documentam que as substâncias húmicas e suas frações, provenientes de diversas fontes, têm a capacidade de aprimorar a absorção e a assimilação tanto de micronutrientes (como boro, cobre, ferro, molibdênio, manganês, zinco e cobalto) quanto de macronutrientes (Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Cálcio, Magnésio e Enxofre) (NIKBAKHT et al., 2008; VERLINDEN et al., 2010; JANNIN et al.; 2012; TAVARES et al., 2016).

A quantidade de silício nas raízes mostrou aumento significativo apenas pela aplicação de AFVC 50, enquanto os teores de Si nas folhas aumentaram significativamente em plantas tratadas com AFVC 50 e AFVC 100. Os teores de sódio e alumínio não sofreram alterações significativas com o controle, devido a aplicação de diferentes tipos e doses de substâncias húmicas.

O silício exerce efeitos positivos em plantas por meio de maior resistência à seca, salinidade, além de contribuir para a melhora no estado nutricional, transpiração e, possivelmente, em alguns aspectos da eficiência fotossintética das plantas (MENECALE et al., 2015). O aumento no teor de Si em raízes e folhas de plantas tratadas com AFVC 50 pode ser um indício que este tipo de substância húmica esteja associado a um estímulo ao estresse, de maneira mais intensa ou em momento diferente, em comparação com as demais substâncias húmicas. De modo geral, o AFVC 50 foi o tratamento que mais estimulou o acúmulo de nutrientes em raízes e folhas de plantas de pepino. Diversos autores relataram sinalizações, desencadeadas pela aplicação de substâncias húmicas via radicular, semelhantes às observadas por respostas ao estresse vegetal, alterando condutividade hidráulica radicular (ASLI & NEUMANN, 2010), o sistema oxidativo (GARCÍA et al., 2014) e o desempenho fotossintético (CASTRO et al., 2021, 2022).

Os ácidos fúlvicos têm maior acidez total, maior número de grupos carboxila e maiores capacidades de adsorção e troca catiônica do que os ácidos húmicos, podendo desempenhar papéis como quelantes naturais na mobilização e transporte de nutrientes (BOCANEGRA et al., 2006).

Tabela 5. Concentração de nutrientes em raízes e folhas de plantas de pepino tratadas com AHVC, AFVC e AHCHECO à 50 e 100 mg L⁻¹.

		Controle	AHVC 50	AHVC 100	AFVC 50	AFVC 100	AHCHECO 50	AHCHECO 100
		ug g ⁻¹ de massa seca						
K	Raiz	202,36 b	364,52 ab	250,52 b	547,66 a	297,72 b	348,56 ab	253,94 b
	Folha	3096,9 ab	2777,1 b	2360,3 b	4625,0 a	3440,3 ab	3590,5 ab	2975,7 ab
P	Raiz	152,15 c	213,62 ab	160,57 c	256,92 a	187,93 bc	179,74 bc	158,57 c
	Folha	1176,47 a	1138,01 a	1190,57 a	1522,84 a	1289,01 a	1308,94 a	1032,02 a
Ca	Raiz	133,60 a	132,01 a	76,77 b	145,22 a	110,77 ab	117,14 ab	84,70 b
	Folha	1098,0 ab	1543,0 ab	1039,9 b	1902,8 a	1203,4 ab	1451,4 ab	1099,7 ab
Mg	Raiz	47,43 abc	51,52 abc	28,14 c	66,71 a	50,55 abc	53,47 ab	40,73 bc
	Folha	444,12 ab	608,11 ab	357,35 b	713,30 a	488,93 ab	599,38 ab	489,33 ab
S	Raiz	33,79 ab	51,17 ab	24,29 b	46,75 ab	41,96 ab	56,74 a	34,81 ab
	Folha	375,48 ab	454,09 ab	357,89 b	551,43 a	382,75 ab	426,03 ab	361,20 b
Fe	Raiz	12,00 a	11,34 ab	5,32 d	9,17 abc	7,50 bcd	9,96 abc	6,67 cd
	Folha	6,71 a	10,91 a	7,87 a	8,29 a	7,65 a	10,63 a	9,21 a
Zn	Raiz	4,64 ab	4,19 b	3,18 b	7,91 ab	3,40 b	9,69 a	4,71 ab
	Folha	8,78 a	8,95 a	8,85 a	11,12 a	7,65 a	10,31 a	8,61 a
Mn	Raiz	2,88 abc	4,32 ab	1,75 c	2,80 abc	2,33 bc	4,64 a	2,45 bc
	Folha	3,52 a	4,71 a	3,77 a	4,99 a	4,71 a	5,61 a	3,96 a
Cu	Raiz	0,796 a	0,627 abc	0,473 bc	0,776 a	0,371 c	0,671 ab	0,522 abc
	Folha	0,742 a	0,929 a	0,756 a	0,979 a	0,700 a	0,884 a	0,695 a
B	Raiz	0,4683 a	0,2968 bc	0,1953 c	0,3676 ab	0,2781 bc	0,4134 ab	0,3621 ab
	Folha	1,2708 a	1,5383 a	1,2355 a	1,6580 a	1,3271 a	1,4524 a	1,1504 a
Mo	Raiz	0,0600 a	0,0444 ab	0,0366 b	0,0416 ab	0,0462 ab	0,0438 ab	0,0249 b
	Folha	0,3318 ab	0,3883 ab	0,3587 ab	0,4456 a	0,3339 ab	0,3465 ab	0,2458 b
Si	Raiz	1,2584 bc	1,0837 bc	0,9706 c	2,2359 a	1,5088 bc	1,7175 ab	1,0841 bc
	Folha	4,1420 b	6,2781 b	5,5145 b	12,356 a	10,497 a	5,5956 b	3,5306 b
Na	Raiz	47,43 a	47,38 a	36,65 a	51,86 a	38,92 a	51,13 a	44,70 a
	Folha	80,93 a	95,82 a	74,88 a	97,41 a	92,18 a	83,82 a	90,28 a
Al	Raiz	7,14 ab	7,19 ab	5,76 b	7,41 ab	6,71 ab	8,81 a	8,11 a
	Folha	5,75 a	6,29 a	7,11 a	6,93 a	7,34 a	6,69 a	7,54 a

* valores na mesma linha com letras semelhantes não diferiram significativamente por tukey p<0,05; n=4.

e) Estímulo no desenvolvimento radicular

A aplicação de AHVC, AFVC e AHCHECO por via radicular modificou a morfologia das raízes de plantas de pepino (Figura 23). A área radicular não foi significativamente alterada pela aplicação de nenhum tratamento em relação ao controle, porém foi possível observar um aumento maior da área pela aplicação das substâncias húmicas à 100 mg L⁻¹ do que na dose inferior (Figura 23A). Todos os tratamentos com substâncias húmicas resultaram em redução do volume radicular em relação ao controle, porém sem diferença significativa, com exceção do AHVC100, que apresentou valores semelhantes ao controle (Figura 23B). O comprimento radicular foi estimulado por todos os tratamentos com substâncias húmicas, independente da concentração, porém, a aplicação de AFVC50 e AHCHECO50 foram os únicos que estimularam significativamente o alongamento radicular em relação ao controle (Figura 23C). O número bifurcações nas raízes também foi estimulado pela aplicação de substâncias húmicas quando comparado ao controle, porém sem diferenças estatísticas, sendo que a aplicação AHVC100 foi o tratamento que mais aumentou o número de bifurcações radiculares, enquanto a aplicação AFVC50 foi a que menos estimulou (Figura 23D).

O diâmetro médio das raízes reduziu devido à aplicação de tratamentos com substâncias húmicas independentemente do tipo e dose, mas o único que resultou em redução significativa quando comparado ao controle foi a aplicação de AFVC50 (Figura 23E). A Figura 23F mostra que a quantidade total de raízes foi estimulada mais intensamente pela aplicação de substâncias húmicas na concentração de 50 mg L⁻¹, sem diferença significativa, sendo o AFVC50 o que mais aumentou o número de raízes. Por sua vez, os tratamentos AHVC100 e AHCHCO100 resultam em redução, estatisticamente não diferente, do número de raízes em relação à testemunha. A aplicação de AFVC 50 foi a que mais estimulou o aumento na quantidade de raízes finas, médias e grossas, em comparação com o controle. No entanto, apenas a quantidade de raízes médias mostrou superioridade estatisticamente significativa quando comparado ao controle (Figura 23G-I).

Os efeitos sobre a morfologia e arquitetura radicular pela aplicação de substâncias húmicas em plantas são os mais relatados na literatura, principalmente pelos estímulos sobre a quantidade, comprimento e espessamento das raízes, alterando assim o volume e área de superfície radicular (CANELLAS et al., 2015; GARCÍA et al., 2016; GARCÍA et al., 2019; TAVARES et al., 2020; CASTRO et al., 2021), influenciando na absorção de água e nutrientes pelas plantas (JANNIN et al., 2012; OLAETXEA et al., 2015; TAVARES et al., 2019). De acordo com Dobbs et al. (2007), é evidente que, de forma geral, o impulso no crescimento e desenvolvimento das raízes resulta da administração de doses baixas ou moderadas de SH, podendo-se até notar um efeito inibidor em concentrações elevadas, assim como observado no presente estudo.

Asli & Neumann (2010) propuseram que as SH exercem seus estímulos nas plantas por meio de interações com as raízes, o que é chamado de estresse coloidal, levando a modificações na taxa de transpiração e na condutividade hidráulica. A aplicação radicular de AH via raízes demonstrou a capacidade de aumentar a expressão de genes, a atividade das enzimas do sistema oxidativo e os níveis de EROs em plantas, podendo ser resultado do “estresse” causado pela interação das substâncias húmicas com o sistema radicular (GARCÍA et al., 2014, 2019; OLAETXEA et al., 201).

Ojwang e Cook (2013) indicam que a interação entre substâncias húmicas e raízes pode modificar a uniformidade da membrana radicular, tornando-a potencialmente permeável a fragmentos húmicos de menor tamanho. Diversos pesquisadores destacaram a existência de uma relação entre as estruturas e propriedades presentes nas SH e a natureza e intensidade do estímulo provocado no sistema radicular de diferentes culturas (CANELLAS et al., 2012; AGUIAR et al., 2013; GARCÍA et al., 2016, 2019; CASTRO et al., 2021). Muscolo et al. (2007) constataram que uma fração húmica de peso molecular reduzido, caracterizada por uma maior quantidade de grupos carboxila e menor hidrofobicidade, demonstrou uma interação mais intensa com as membranas celulares de plantas de cenoura (*Daucus carota* L.).

García et al. (2016a,b) e Castro et al. (2021) observaram incremento na emissão de raízes laterais em plantas de arroz, o que foi associado a características de substâncias húmicas menos complexas e mais funcionalizadas, incluindo a presença de grupos carboxílicos e menor hidrofobicidade. Essas constatações sustentam as observações deste estudo, uma vez que o AFVC apresenta essas mesmas características e promoveu de maneira mais intensa a emissão de raízes na dose de 50 mg L⁻¹.

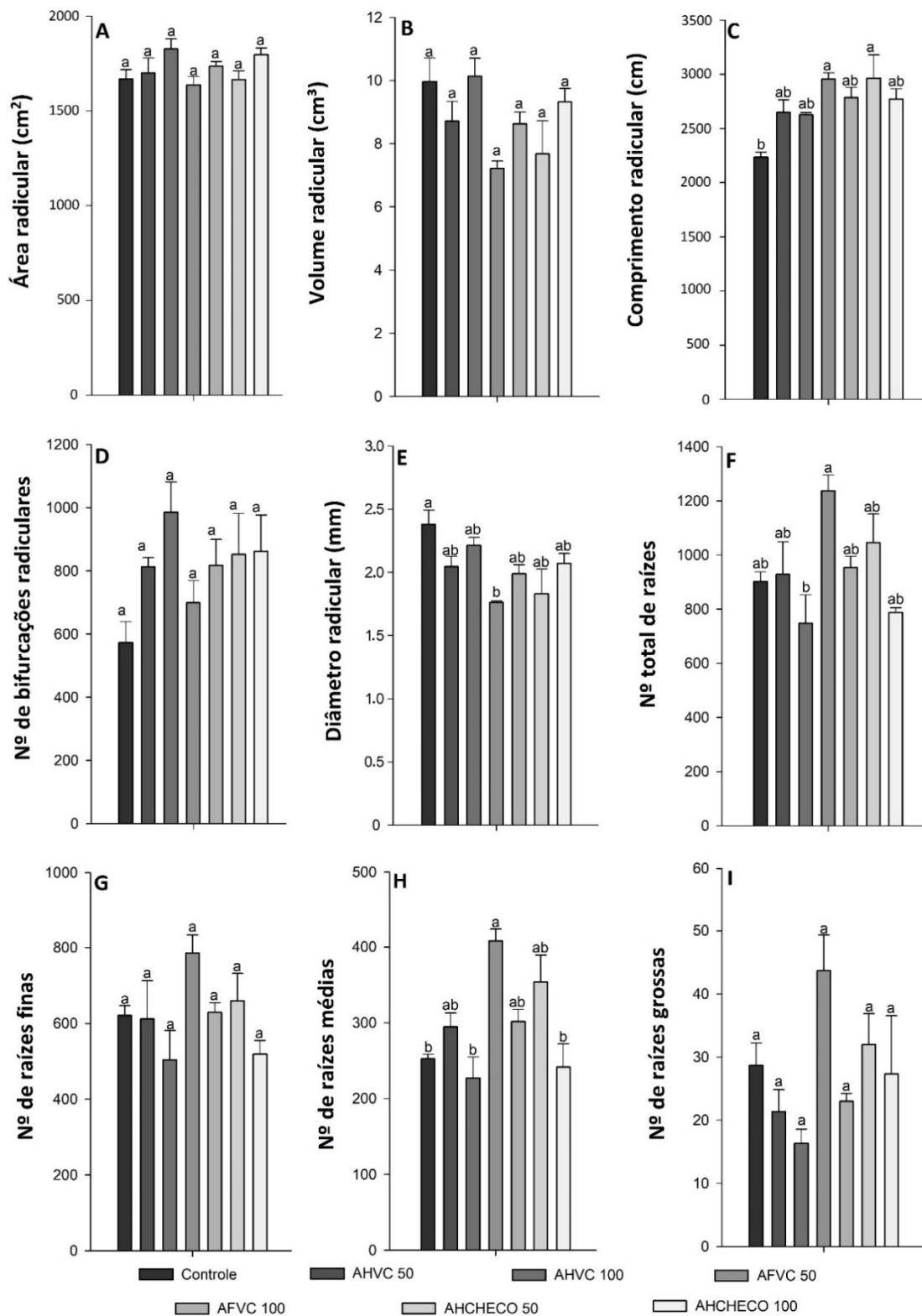


Figura 23. Estímulos radiculares em plantas de pepino submetidas a aplicação via radicular de AHVC, AFVC e AHCHECO à 50 e 100 mg L⁻¹. Área radicular (A), volume radicular (B), comprimento radicular (C), número de bifurcações radiculares (D), diâmetro radicular (E), número total de raízes (F), número de raízes finas (G), número de raízes médias (H) e número de raízes grossas (I), n=3.

f) Efeito da aplicação de diferentes fontes e doses de substâncias húmicas na produção de biomassa fresca e seca de plantas

As três substâncias húmicas (AHVC, AFVC e AHCHECO) estimularam de forma diferente o acúmulo de biomassa fresca e seca nas folhas e raízes de plantas de pepino, de acordo com a concentração do bioestimulante (50 e 100 mg L⁻¹) (Figura 24). A Figura 24A mostra a produção de biomassa fresca em folhas de pepino, que foi significativamente superior ao controle devido à aplicação de AHVC 50, AFVC 50 e AHCHECO 50, sendo maior o acúmulo de biomassa foliar pela aplicação de AHCHECO 50, no entanto sem diferirem estatisticamente entre si. O tratamento com AFVC 100 resultou em massa fresca das folhas significativamente igual ao observado pela aplicação das três SH à 50 mg L⁻¹, porém também não diferiu significativamente do controle. Os tratamentos utilizando as outras substâncias húmicas à 100 mg L⁻¹ (AHVC 100 e AHCHECO 100) também não resultaram em biomassa fresca das folhas estatisticamente diferente ao observado em plantas controle. A produção de massa fresca radicular foi significativamente maior, quando comparado com o controle, em plantas tratadas com AHVC 50, AFVC 50 e AHCHECO 50, sendo que plantas tratadas com AFVC 100 não apresentaram diferença significativa com as plantas submetidas à aplicação de qualquer SH na dose de 50 mg L⁻¹. A aplicação de AHVC 100, AFVC 100 e AHCHECO 100 não resultou em plantas com produção de biomassa radicular significativamente diferente do que o observado em plantas controle (Figura 24B).

A Figura 24C mostra a produção de biomassa seca de folhas de plantas pepino devido à aplicação de diferentes concentrações e tipos de substâncias húmicas. Conforme observado no acúmulo de biomassa seca das folhas, a aplicação de AHVC 50 e AFVC 50 resultou em estímulo significativamente superior ao controle. As folhas de plantas tratadas com AHVC 100, AFVC 100 e AHCHECO 50 não mostraram valores de biomassa seca estatisticamente diferentes dos tratamentos de maior estímulo, assim como não diferiram significativamente do controle. A massa seca das folhas de plantas submetidas à aplicação de AHCHECO 100 também não mostrou diferenças em nível significativo com o controle. A produção de biomassa seca das raízes, apresentada na Figura 24D, foi significativamente superior ao controle pela aplicação de AHVC 50, AFVC 50 e AFVC 100, sendo maior devido à aplicação de AFVC 50. Os tratamentos restantes não resultaram em massa seca radicular significativamente diferente do controle.

É possível observar que os estímulos na produção de biomassa fresca e seca ocorreram de maneira diferenciada de acordo com o tipo de substância húmica e dose aplicada. No geral, quando comparadas as doses entre a mesma SH, observamos que o AHVC 50, AFVC 50 e AHCHECO 50 resultaram em maior produção de biomassa fresca e seca de folhas e raízes, quando comparado ao controle e as plantas tratadas com SH à 100 mg L⁻¹. O acúmulo de massa fresca, tanto foliar quanto radicular, foi mais estimulado pelo AFVC 50 e AHCHECO 50, enquanto a biomassa seca radicular foi maior pela aplicação de AHVC 50 e AFVC 50.

No estudo de Asli e Neumann (2010), foi estabelecida uma conexão entre a inibição do crescimento da parte aérea, induzida por concentrações elevadas de ácidos húmicos, e a ação primordial dessas substâncias na superfície radicular. A aplicação de alta concentração de ácidos húmicos resultou em uma espécie de obstrução dos poros nas células da parede da raiz, levando a reduções na condutividade hidráulica radicular e no crescimento da parte aérea das plantas.

O aumento da biomassa fresca e seca de plantas tratadas com diferentes substâncias húmicas via radicular foi observado por vários autores nos últimos anos, que atribuíram esse acúmulo de biomassa à regulação gênica e hormonal, estímulo na absorção de nutrientes, alterações no sistema oxidativo, alterações fotossintéticas e desenvolvimento radicular (MORA

et al., 2014; GARCÍA et al., 2016; OLAETXEA et al., 2017; TAVARES et al., 2019; DE HITTA et al., 2020; CASTRO et al., 2021).

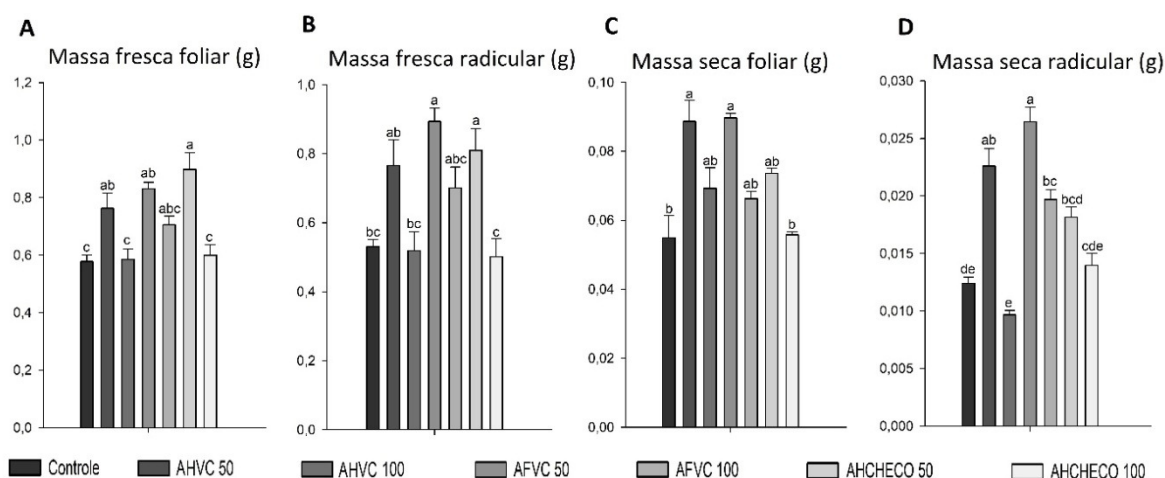


Figura 24. Acúmulo de biomassa fresca das folhas (A) e das raízes (B) e de biomassa seca de folhas (C) e de raízes (D) em plantas de pepino sob aplicação via radicular de AHVC, AFVC e AHCHECO à 50 e 100 mg L⁻¹. Barras com a mesmas letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p<0,05), n=5.

3.6 CONCLUSÕES

O AFVC possui a menor razão C/N, menor condensação aromática, maiores quantidades de estruturas do tipo carboxila e menor hidrofobicidade, portanto, se trata de uma fração húmica com propriedades químicas de maior labilidade. O AHCHECO mostrou a maior razão C/N, maior condensação aromática, maiores quantidades de estruturas aromáticas não funcionalizadas e maior hidrofobicidade, sendo a fração húmica com propriedades químicas de maior recalcitrância.

A aplicação radicular de AFVC mostrou maior estímulo sobre o desenvolvimento das raízes nas doses de 40 e 60 mg L⁻¹ e às 72-96 horas após o início dos tratamentos. A aplicação foliar de AFVC na dose de 80 mg L⁻¹ foi a que mais contribuiu para o desenvolvimento radicular e para a produção de biomassa fresca e seca das plantas. Em ambos os experimentos as maiores doses inibiram o desenvolvimento e crescimento das plantas.

O AHVC, AFVC e AHCHECO estimularam o crescimento vegetal por meio de estímulos, intensidades e momentos diferentes. A aplicação radicular de AFVC 50 resultou em plantas com melhor desenvolvimento radicular e maior acúmulo de biomassa, por meio de regulação gênica e hormonal, além de estímulos na absorção de nutrientes.

Às 120 horas após aplicação das substâncias húmicas via radicular à 50 mg L⁻¹ em plantas de pepino, os genes *CsNRT1.9*, *CsSultr1.2*, *CsNRT1.2A* e *CsIRT1* e as quantidades de ácido salicílico e citocininas nos tecidos vegetais permanecem em níveis semelhantes ao observado por outros autores às 24 e 72 horas após aplicação.

4. CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO, DOSE VS RESPOSTA E BIOATIVIDADE DO EXTRATO DE *KAPPAPHYCUS ALVAREZII*

4.1 RESUMO

A maioria dos produtos derivados de extratos de algas marinhas encontra aplicação no setor agrícola e na horticultura, devido aos benefícios que proporcionam às plantas. Os extratos de macroalgas, com destaque para o de *Kappaphycus alvarezii*, têm sido amplamente empregados na fabricação de fertilizantes e bioestimulantes. Esses efeitos positivos dos extratos de *Kappaphycus alvarezii* (K-sap) parecem estar relacionados à sua composição química e estrutural. Cada vez mais é necessário a realização de pesquisas com o propósito de estabelecer uma ligação entre as características físico-químicas dos extratos de *Kappaphycus alvarezii* e a sua atividade benéfica nas plantas. Portanto, o objetivo deste capítulo consistiu em realizar a caracterização, tanto em termos composicionais quanto estruturais, além da caracterização nutricional, de diferentes frações da alga *Kappaphycus alvarezii*, incluindo o extrato aquoso e a biomassa sólida, sem adição de conservantes. Além disso, o estudo avaliou o efeito da aplicação dos extratos (tanto via foliar quanto radicular) no crescimento e desenvolvimento das plantas de arroz, investigando as vias de regulação gênica, metabólica e fisiológica que justificam o estímulo proporcionado ao crescimento vegetal. No experimento 1, foram estudadas as doses mais promissoras de K-sap aplicado via radicular no desenvolvimento de raízes (quantidade, comprimento, diâmetro, bifurcações, área e volume radicular), na produção de biomassa fresca e secas, e no acúmulo de K^+ e Na^+ . No experimento 2, foram estudadas as doses mais promissoras de K-sap aplicado via foliar no desenvolvimento radicular e acúmulo de biomassa fresca e seca de raízes, bainhas e folhas. No experimento 3, foram aplicados K-sapR2% (via radicular), K-sapF2% (via foliar) e K-sapF10% (via foliar) e avaliadas a expressão de genes de raízes e folhas envolvidos na absorção e assimilação de N e K^+ e relacionados ao sistema oxidativo, teores de metabólitos solúveis, acúmulo de nutrientes, desempenho fotossintético, desenvolvimento radicular e produção de massa fresca e seca. O extrato K-sapL obtido neste estudo, manteve componentes orgânicos ricos em lipídeos, proteínas e k-carragena, além de conter uma composição de macro e micronutrientes abundante em Ca, Mg, K e P, com uma relação C:N baixa. A sua composição orgânica e mineral torna-o um material com a capacidade de estimular o crescimento das plantas. A aplicação radicular do K-sap resultou em melhorias na nutrição das plantas, aumentando a concentração de K e N, sobretudo nas folhas. Isso ocorreu durante um estágio em que os genes envolvidos no transporte e assimilação de N ainda estavam ativos, contribuindo para uma melhoria significativa na eficiência fotossintética. Como resultado, houve um aumento na produção de biomassa, um maior crescimento das plantas em altura e um maior desenvolvimento do sistema radicular. Por outro lado, as aplicações foliares do K-sap levaram a um menor acúmulo de N e K, principalmente nas raízes e bainhas. No entanto, durante esse estágio, os transportadores de N e K foram estimulados, resultando em um aumento no conteúdo de $N-NO_3^-$ e N-amino livre. Embora a eficiência fotossintética tenha melhorado de forma menos expressiva, a aplicação foliar a uma concentração de 2% promoveu o crescimento das plantas, aumentando a produção de biomassa e estimulando o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular. O K-sap demonstra ser uma opção viável como bioestimulante, tanto para aplicação foliar quanto radicular, resultando em um aumento na biomassa seca em raízes, bainhas e folhas, bem como no desenvolvimento radicular aprimorado.

Palavras-chave: Extratos de alga. K-sap. Caracterização. Modo de ação. Bioatividade.

4.2 ABSTRACT

Most products derived from seaweed extracts find application in the agricultural and horticultural sectors, due to the benefits they provide to plants. Macroalgae extracts, especially *Kappaphycus alvarezii*, have been widely used in the manufacture of fertilizers and biostimulants. These positive effects of *Kappaphycus alvarezii* (K-sap) extracts appear to be related to their chemical and structural composition. It is increasingly necessary to carry out research with the purpose of establishing a link between the physicochemical characteristics of *Kappaphycus alvarezii* extracts and their beneficial activity in plants. Therefore, the objective of this chapter was to carry out the characterization, both in compositional and structural terms, in addition to atomic absorption, of different fractions of the alga *Kappaphycus alvarezii*, including the aqueous extract and solid biomass, without the addition of preservatives. Furthermore, the study evaluated the effect of applying extracts (both foliar and root) on the growth and development of rice plants, investigating the gene, metabolic and physiological regulation pathways that justify the stimulus provided to plant growth. In experiment 1, the most promising doses of K-sap applied via the roots were studied in root development (quantity, length, diameter, bifurcations, area and root volume), in the production of fresh and dry biomass, and in the accumulation of K^+ and Na^+ . In experiment 2, the most promising doses of K-sap applied via foliar use on root development and accumulation of fresh and dry biomass of roots, sheaths and leaves were studied. In experiment 3, K-sapR2% (root route), K-sapF2% (foliar route) and K-sapF10% (foliar route) were applied and the expression of root and leaf genes involved in the absorption and assimilation of N and K^+ and related to the oxidative system, soluble metabolite levels, nutrient accumulation, photosynthetic performance, root development and fresh and dry mass production. The K-sapL obtained in this study maintained organic components rich in lipids, proteins and k-carrageenan, in addition to containing a composition of macro and micronutrients abundant in Ca, Mg, K and P, with a low C:N ratio. Its organic and mineral composition makes it a material with the ability to stimulate plant growth. The root application of K-sap resulted in improvements in plant nutrition, increasing the concentration of K and N, especially in the leaves. This occurred during a stage when genes involved in N transport and assimilation were still active, contributing to a significant improvement in photosynthetic efficiency. As a result, there was an increase in biomass production, greater plant growth in height and greater development of the root system. On the other hand, foliar applications of K-sap led to a lower accumulation of N and K, mainly in the roots and sheaths. However, during this stage, N and K transporters were stimulated, resulting in an increase in free $N-NO_3^-$ and N-amino content. Although photosynthetic efficiency improved less significantly, foliar application at a concentration of 2% promoted plant growth, increasing biomass production and stimulating the growth and development of the root system. K-sap proves to be a viable option as a biostimulant, for both foliar and root application, resulting in an increase in dry biomass in roots, sheaths and leaves, as well as improved root development.

Key words: Algae extracts. K-sap. Characterization. Mode of action. Bioactivity.

4.3 INTRODUÇÃO

A produção de algas marinhas mediante a maricultura tem aumentado mais de 50% nos últimos anos e cresce em uma razão de 6,2% ao ano. Tal disponibilidade, em especial as de macroalgas, tem promovido o seu uso como fertilizantes, bioestimulantes, protetores de estresse em plantas e condicionadores de solo. Os extratos de macroalgas, especialmente *Kappaphycus alvarezii* vêm sendo amplamente utilizados na produção de fertilizantes e bioestimulantes, tanto em formulação líquida como sólida, uma vez que tem mostrado estímulos sobre a absorção de água e nutrientes pelas plantas (FAO, 2018; FAO, 2020; KHOLSSI et al., 2022).

De acordo com a FAO (2021), *Kappaphycus alvarezii* é uma das cinco espécies de algas mais cultivadas no mundo. Uma das razões para o cultivo de algas vermelhas (*Kappaphycus alvarezii*) em grande escala está relacionada com a facilidade de crescimento e seu elevado conteúdo de carboidratos, principalmente carragena, com quantidade entre 40 e 50% da sua massa seca (RUDKE et al., 2020). Em geral, a alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* possui uma composição além dos carboidratos, de 3,3% de proteínas, 3,3% de lipídeos, 3,0% de compostos aromáticos insolúveis, 15,6% de cinzas e 12,4% de sulfatos (SOLORZANO-CHAVEZ et al., 2019).

A alga *Kappaphycus alvarezii* possui potencialidades como bioestimulantes vegetais pois promovem o aumento dos rendimentos de diversos cultivos, seja em substituição dos fertilizantes sintéticos ou em suplementação a estes, isto porque, além da sua riqueza na composição, sua fabricação é considerada sustentável por ter uma pegada de baixo carbono (GHOSH et al., 2015). A ação bioestimulante dos extratos de *Kappaphycus alvarezii* em plantas se dá a partir de bases científicas consideradas determinantes para promover seus efeitos; uma delas relacionada com a aplicação exógena do extrato na sua forma pura, o que garante a preservação de compostos bioativos e, a segunda, relacionada as baixas concentrações aplicadas aos vegetais, o que promove potencialidades para sua utilização em uma ampla gama de espécies de plantas (VAGHELA et al., 2023).

Os efeitos benéficos dos extratos de *Kappaphycus alvarezii* parecem ser o resultado da sua riqueza composicional, sendo ricos em compostos bioativos como fenóis, flavonoides, esteroides, carboidratos, proteínas, lipídeos, carotenoides e antioxidantes, além de uma elevada quantidade de elementos minerais como K, P, Fe, Zn, entre outros (VAGHELA et al., 2022). A aplicação de extratos de *Kappaphycus alvarezii* em concentrações de 7.5%, contribuiu para a melhoria da produção em cultivos de batata, com aumento do rendimento e quantidade de tubérculos por planta (PRAMANICK et al., 2017). Em cana de açúcar, a aplicação de 1% de bioestimulantes a base de *Kappaphycus alvarezii* promoveu aumentos de até 26.16% dos rendimentos agrícolas, melhorando ainda a qualidade interna do suco (KARTHIKEYAN & SHANMUGAM, 2017). Expressivos aumentos no rendimento do cultivo da banana (56.58%), número de frutos por toneladas (até 29.68%) e qualidade interna dos frutos, tem sido relatada quando aplicados via foliar extratos de *Kappaphycus alvarezii* em concentrações de 5% (KARTHIKEYAN & SHANMUGAM., 2014). Em plantas de arroz, a produção de grãos também aumentou em até 11.80% quando aplicado o extrato de *Kappaphycus alvarezii* via foliar a concentrações de 15% (DEVI & MANI, 2015).

Em plantas de milho que receberam aplicações via foliar de extratos aquosos de *Kappaphycus alvarezii* diluído a 10%, houve um aumento do rendimento e dos parâmetros relacionados com número de grãos por espiga e comprimento da espiga, ao mesmo tempo em que houve uma diminuição de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumento da atividade enzimática de regulação redox nas plantas (TRIVEDI et al., 2021). Os estudos de sequenciamento em larga escala (RNAseq), realizados em ensaios com a aplicação de extratos aquosos de *Kappaphycus alvarezii* a 2,5% também em plantas de milho, mostrou que há um estímulo no crescimento do sistema radicular e do aumento na absorção de nutrientes, tais

efeitos mediante uma regulação de genes que codificam para sinalização hormonal, metabolismo no nitrogênio, regulação oxidativa e atividade peroxidase (KUMAR et al., 2020). Em plantas de trigo (*Triticum durum*) aplicações de *Kappaphycus alvarezii* promoveram estímulos do crescimento e desenvolvimento das plantas, diminuindo os danos na permeabilidade das membranas, reduzindo o extravasamento de eletrólitos, reduzindo as EROs e aumentando a atividade das enzimas superóxido dismutase, ao mesmo tempo, osmoprotetores como prolina, açúcares e fitohormônios são também regulados pelo extrato aplicado (PATEL et al., 2018).

A maior parte dos produtos obtidos a partir de extratos de algas marinhas é comercializada para uso na agricultura e horticultura devido aos seus efeitos positivos nas plantas e à capacidade de mitigar estresses causados por fatores tanto ambientais quanto biológicos (CRAIGIE, 2011; BHATTACHARYYA et al., 2015), mas muito poucos modos de ação foram elucidados. Seria altamente relevante investigar a natureza dos compostos de sinalização/ativação presentes em extratos de algas marinhas e, assim, compreender como esses elementos podem ter funções semelhantes ou análogas em plantas terrestres (HURTADO & CRITCHLEY, 2018).

Diante deste cenário, se fazem necessárias cada vez mais pesquisas que visem estabelecer uma relação entre a composição química-estrutural dos extratos de *Kappaphycus alvarezii* e sua bioatividade. São escassos os estudos sobre os modos de ação de extratos de *Kappaphycus alvarezii* em plantas, especialmente aqueles mecanismos utilizados pelos extratos de *Kappaphycus alvarezii* quando aplicados via foliar ou radicular.

Sendo assim, o objetivo deste capítulo foi caracterizar composicional e estruturalmente subfrações da alga *Kappaphycus alvarezii* (extrato aquoso e biomassa sólida) *in natura* (sem adição de conservantes) utilizando técnicas de análises composicional e espectroscópica e pela avaliação do efeito dos modos de aplicação (foliar e radicular) no crescimento e desenvolvimento de plantas de arroz por meio de vias de regulação gênica, metabólica e fisiológica que justifiquem a ação de estímulo no desenvolvimento de plantas de arroz.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Caracterização físico-química dos extratos aquosos de *Kappaphycus alvarezii* obtidos de diferentes maneiras

a) Material de partida e obtenção do extrato de *Kappaphycus alvarezii*

Uma massa de 20 Kg de alga fresca de *Kappaphycus alvarezii* crescida em condições naturais mediante prática de algicultura na baía de Iha Grande, Paraty RG, foi levada ao laboratório para processamento. A alga fresca foi obtida em parceria com o Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia Bioquímica - Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As características químicas composicionais da biomassa íntegra da alga *Kappaphycus alvarezii* são apresentadas na Tabela 14 (APÊNDICES). O extrato que foi objeto de estudo de caracterização e bioatividade em plantas foi obtido mediante extração sem adição de qualquer solução extratora. As amostras de alga foram congeladas em -20°C durante três dias, posteriormente foram descongeladas, havendo extravasamento da seiva, que em seguida foi filtrada em papel de filtro Whatman No.2. Este processo produziu o sobrenadante, que consiste na seiva de *Kappaphycus alvarezii* (K-sap) e rendeu uma biomassa sólida residual insolúvel (K-msr). Para fins de comparação da integridade composicional e estrutural, o processo de secagem, tanto do extrato K-sap como do sólido residual K-msr foi realizado mediante liofilização e mediante aplicação de temperatura em estufa. Para a liofilização, o K-sap e o K-msr foram armazenados em Ultra freezer CL200-86V ColdLab a -80 °C e levados a liofilizador L101 LioTop durante 72 horas. Para a secagem por aplicação de temperatura, o extrato K-sap e K-msr foram levados a estufa e mantidos durante 72 horas a 60 °C.

b) Caracterização espectroscópica por ressonância magnética nuclear do isótopo do ¹³C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (RMN ¹³C PC RAM)

As amostras foram caracterizadas pela espectroscopia por ressonância magnética nuclear do isótopo do ¹³C em polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP MAS ¹³C-NMR), realizada no aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ¹³C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, as amostras dos materiais humificados foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO₂) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8 ± 1 kHz. Os espectros foram obtidos pela coleta de 2048 data points para o mesmo número de scans a um tempo de aquisição de 34 ms e com recycle delay de 5s. O tempo de contato para a sequência em rampa de 1H ramp foi de 2 ms. A coleta e elaboração espectral foram realizadas utilizando o Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (DLI) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz.

As regiões dos espectros foram integradas para a obtenção da quantidade relativa de estruturas, assim as regiões foram divididas em: alquil - C (CALq-H,R): 0-46 ppm; metoxilas e N-alquil C (CALq-O,N): 46-59 ppm; O-alquil C (CALq-O): 59-91 ppm; di-O-alquil C (carbono anoméricos) (CALq-di-O): 91-110 ppm; carbono aromático (CAr-H,R): 110-142 ppm; O-aromático C (CAr-O): 142-156 ppm; carboxila C (CCOO-H,R): 156-186 ppm e carbonilas C (CC=O): 186-230 ppm.

A aromaticidade foi calculada segundo a fórmula: (CAr-H,R) + (CAr-O) *100/ área total, assim a alifaticidade foi calculada como: 100-Aromaticidade (%). O índice de hidrofobicidade (HB/HI) foi calculado como segue: (0 ppm-46 ppm) + (110 ppm-156 ppm) /

(46 ppm-110 ppm) + (156 ppm-186 ppm). Para o índice de polaridade foi utilizada a fórmula a seguir: $(\text{CCOO-H,R}) + (\text{CC=O}) + (\text{CAIq-O,N}) / (\text{CAr-H,R}) + (\text{CAIq-H,R})$. O trabalho com os espectros foi realizado utilizando o Software ACD/Labs v.10.1.1

c) Caracterização espectroscópica mediante reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

Os espectros foram obtidos mediante registro na região de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} , coletando em cada medição 32 digitalizações. Para isto foi utilizado um espectrômetro FTIR VERTEX 70/70v (Bruker Corporation, Alemanha) acoplado a um dispositivo de reflexão total atenuada (ATR) de platina diamante, consistente em um disco de diamante que funciona como elemento de reflexão interna. Os materiais liofilizados foram colocados no cristal ATR para o registro do espectro. Como espectro branco foi utilizado o registro espectral do ar antes de cada análise. Os espectros foram coletados em uma sala com temperatura próxima de 20°C. A obtenção e registro dos espectros foi realizada mediante software OPUS-Bruker. Os tamanhos hidrodinâmicos e o potencial zeta (ζ -potencial) foram determinados usando uma nanopartícula SZ-100 (HORIBA, Japão). Para avaliar o efeito do pH nos tamanhos hidrodinâmicos e ζ -potencial dos ácidos húmicos, as amostras foram preparadas em água e ajustadas para diferentes valores de pH (2,0 - 9,0), com uma concentração de ácido húmico de 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os valores de pH foram ajustados usando soluções de HCl e NaOH (0,01 M).

d) Análise da composição elementar (CHNO)

A análise do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas amostras foi realizada por um FlashSmart CHNO. As amostras liofilizadas foram primeiramente trituradas. Aproximadamente 1mg de amostra foi preparado para cada uma das medições e foi repetido duas vezes para cada réplica. O teor de oxigênio foi determinado por diferença.

e) Determinação dos teores de nutrientes nos diferentes extratos

Para a determinação dos teores dos elementos as amostras secas foram pesadas em triplicata e submetidas à digestão nítrica adotando-se o método 3050, postulado pela USEPA (1996). Para isso, foram pesados em balança digital de precisão 0,250g de cada amostra, sendo as mesmas colocadas em tubo de digestão tipo pyrex com funil de vidro sobre, para evitar perda de gases, sendo os tubos levados para bloco digestor sob temperatura de 95 ± 5 °C onde foram adicionados 5 ml de HNO_3 (VETEC 65%), permanecendo por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, foram adicionados mais 10 ml de HNO_3 (VETEC 65%) lavando-se as paredes do tubo de digestão, deixando-as por 2 horas no bloco digestor à 95 ± 5 °C. Após este tempo as amostras foram retiradas do bloco digestor e, quando frias, foram adicionados 8 ml de H_2O_2 (VETEC 30%), avolumando-se com água destilada e deionizada para 50 ml após o término da efervescência promovida pelo H_2O_2 , sendo os extratos filtrados em papel filtro (filtração lenta) e armazenados em frascos de polietileno devidamente identificados.

4.4.2 Condições experimentais para os ensaios com aplicação do K-sap

a) Experimento 1 – Dose vs resposta de K- sap aplicado via radicular

O experimento foi conduzido no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada em Seropédica-RJ. A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade nipponbare. O experimento foi realizado em casa de vegetação climatizada nas seguintes condições: 70% de umidade relativa e temperatura de 26 °C. As sementes de arroz foram desinfestadas previamente com hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, as sementes foram transferidas a potes com gaze que continham somente água destilada. Dois dias após a germinação das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland (HOAGLAND E ARNON,1950) modificada a 1/8 da força iônica total. Após quatro dias foi trocada a solução de Hoagland para 1/4 da força iônica total. Três dias após a última troca de solução, as plantas foram transplantadas para potes de 0,7L contendo solução de Hoagland a 1/4 força iônica total. Três dias após o transplantio houve a troca de solução para 1/2 força iônica total, sendo renovada a cada três dias até o momento da coleta. Todas as soluções preparadas tinham como fonte de nitrogênio $N-NO_3^-$ a 2mM e pH ajustado a 5,6.

Dezenove DAG ocorreu a aplicação dos tratamentos, repetida aos vinte e dois DAG durante a troca de solução. O experimento teve um total de seis tratamentos, sendo doses crescentes do K-sap, preparados e aplicados individualmente em conjunto com a solução nutritiva: 0% (tratamento controle, contendo apenas solução nutritiva) ($898 \mu s cm^{-1}$), 1% ($1529 \mu s cm^{-1}$), 2% ($2203 \mu s cm^{-1}$), 3% ($2670 \mu s cm^{-1}$), 5% ($3650 \mu s cm^{-1}$) e 10% ($7100 \mu s cm^{-1}$), com quarenta repetições. Vinte e cinco DAG ocorreu a coleta para posteriores análises.

b) Experimento 2 – Dose vs resposta de K- sap aplicado via foliar

O experimento foi conduzido no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizado, em Seropédica-RJ. A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade nippombare, em casa de vegetação climatizada nas seguintes condições: 70% de umidade relativa e temperatura de 26 °C. As sementes de arroz foram desinfestadas previamente com hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, foram transferidas a potes com gaze que continham somente água destilada. Dois dias após a germinação das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland (HOAGLAND E ARNON,1950) modificada a 1/8 da força iônica total. Após quatro dias foi trocada a solução de Hoagland para 1/4 da força iônica total. Três dias após a última troca de solução, as plantas foram transplantadas para potes de 0,7 L contendo solução de Hoagland a 1/4 força iônica total. Três dias após o transplantio houve a troca de solução para 1/2 força iônica total, sendo renovada a cada três dias até o momento da coleta. Todas as soluções preparadas tinham como fonte de nitrogênio $N-NO_3^-$ a 2mM e pH ajustado a 5,6.

A aplicação dos tratamentos ocorreu aos 19 e 22 DAG mediante pulverização do K-sap por via foliar. Foi aplicado um volume diretamente nas folhas até atingir o ponto de gotejo, sendo de 8 mL (primeira aplicação) e 10 mL (segunda aplicação) por unidade experimental. Foram adotadas seis diferentes concentrações de K-sap: 0% ($0.0 ms cm^{-1}$), 5% ($3.65 ms cm^{-1}$), 10% ($7.10 ms cm^{-1}$), 15% ($8.80 ms cm^{-1}$), 20% ($11.82 ms cm^{-1}$) e 25% ($14.48 ms cm^{-1}$). A primeira coleta ocorreu aos 22 DAG e a segunda coleta aos 25 DAG.

c) Experimento 3 – Mecanismos envolvidos na bioatividade de K- sap em plantas

A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade nipponbare. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação climatizada nas seguintes condições: 70% de umidade relativa e temperatura de 26 °C. As sementes de arroz foram desinfestadas previamente com hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, as sementes foram transferidas a potes com gaze que continham somente água destilada. Dois dias após a germinação das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland (HOAGLAND E ARNON,1950) modificada a 1/8 da força iônica total. Após quatro dias foi trocada a solução de Hoagland para 1/4 da força iônica total. Três dias após a última troca de solução, as plantas foram transplantadas para potes de 0,7L contendo solução de Hoagland a 1/4 força iônica total. Três dias após o transplantio houve a troca de solução para 1/2 força iônica total, sendo renovada a cada três dias até o momento da coleta. Todas as soluções preparadas tinham como fonte de nitrogênio N-NO₃- a 2mM e pH ajustado a 5,6.

A aplicação dos tratamentos contendo k-sap por diferentes vias e doses ocorreu aos 19 e 22 DAG. As doses utilizadas foram selecionadas de acordo com resultados obtidos previamente e com o interesse do estudo. Foram adotados quatro tratamentos: controle, K-sapR2% (aplicação via radicular na dose de 2% preparada em solução nutritiva), K-sapF2% (aplicação via foliar na dose de 2%) e K-sapF10% (aplicação via foliar na dose de 10%). Para a pulverização foliar, foi aplicado um volume diretamente nas folhas até atingir o ponto de gotejo, sendo de 8 mL (primeira aplicação) e 10 mL (segunda aplicação) por unidade experimental. A coleta ocorreu aos 25 dias após a germinação, às 144 horas após o início dos tratamentos.

d) Análises estatísticas

Os delineamentos experimentais adotados foram inteiramente casualizados. As análises estatísticas serão realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5 e no software estatístico R. Os testes de médias serão feitos por tukey ($p < 0,05$), e os gráficos serão elaborados no programa Sigmaplot 12.0 e Microsoft Excel 365. O trabalho com os espectros será realizado utilizando o Software ACD/Labs v.12.01.

4.4.3 Avaliações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas

a) Determinação da biomassa fresca e seca

Para avaliação da massa fresca foram separadas folhas, caules e o sistema radicular de cada planta e pesadas utilizando balança digital de precisão. Em seguida, as amostras foram armazenadas em envelopes de papel e transferidas para estufa secadora, permanecendo assim por 72 horas à 60 °C. Passado esse período, foram pesadas as massas secas do sistema radicular e das partes aéreas utilizando balança digital de precisão.

b) Análise do desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular

Ao final do experimento foram medidos o número de folhas por planta e altura de cada planta. A avaliação do desenvolvimento das raízes das plantas mediante os diferentes parâmetros foi realizada de acordo com Tavares (2014). Resumidamente, o sistema radicular das plântulas de arroz foi quantificado mediante distribuição uniforme em uma camada de água em bandeja transparente de acrílico (30 cm x 20 cm) para a digitalização em resolução de 600 dpi. Foi utilizado um sistema de digitalização Epson Expression 10000XL com uma unidade

de luz adicional (ULA) onde as imagens das raízes foram convertidas para um formato em tons de cinza de oito bits. Os limites das imagens foram definidos e então importados para o software WinRHIZO, 2012b (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.) para análise dos caracteres da raiz e sua quantificação. As imagens foram analisadas usando um grid de calibração com uma escala de referência, e foram alteradas as configurações de entrada para raízes pálidas em um fundo preto (WinRhizo Arabidopsis 2012b). Em seguida os dados foram gerados através do software XLRhizo (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.).

Foram analisados e quantificados diferentes parâmetros radiculares: número de raízes e de bifurcações, comprimento médio (mm), área de superfície (mm²), diâmetro médio (mm) e volume (mm³). Também será definido e medido o número de raízes mediante classificação em classes quanto ao diâmetro: finas (> 1,5 mm), médias (1,5 - 3,5 mm) e grossas (> 3,5 mm).

c) Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila *a*

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida utilizando-se um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hanstech, King's Lynn, Norfolk, UK). Os cliques utilizados para estas medições foram colocados no terço médio de folhas jovens completamente expandidas, durante nove dias após o início dos tratamentos, às 7:00, e as medições foram realizadas 30 minutos após a adaptação das folhas ao escuro. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a um pulso de luz saturante numa intensidade de 3.000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo o intervalo entre os pulsos de 500 ms. A partir da curva de emissão de fluorescência transiente obtida, as intensidades determinadas a 50 μs (fluorescência inicial - F₀), 100, 300 μs , 2 e 30 ms e FM (fluorescência máxima), foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER et al., 2004) (Tabela 15, APÊNDICES).

d) Extração alcoólica do material fresco e dosagem das frações solúveis

A extração alcoólica e partição com clorofórmio foram realizadas segundo FERNANDES (1984), como descritas a seguir. Após determinar a massa fresca, um grama de material vegetal foi colocado em 20 mL de etanol 80% e armazenado em frascos do tipo falcon para posterior extração das frações solúveis. As amostras armazenadas em etanol foram fragmentadas em um triturador (TECNAL TE-102), e filtradas em camadas de gaze e papel filtro. Posteriormente, foram transferidas para funil de separação onde se adicionou igual volume de clorofórmio. Após agitação suave, permaneceu em repouso por 40 minutos até a separação das frações por polaridade, a fração apolar foi descartada. A fração polar (sobrenadante) foi recolhida e elevada a um volume final de 25 mL com etanol 80%, sendo em seguida armazenada para as análises posteriores conforme descrito a seguir.

e) Determinação dos teores de N-NO₃⁻

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

Foram realizados vários testes (dentre eles testes alterando a concentração dos reagentes, das amostras, etc) até que os devidos ajustes foram feitos para uma melhor eficiência

na determinação de nitrato. Em uma microplaca de 96 poços, foram pipetados 30µL da amostra e 60 µL de uma solução resultante da mistura de VCL₃ 0,5% (m/v) em HCl 1M + sulfanilamida 0,4% (m/v) em HCl 1M + N-(1-naftil) etilenodiamnino dihidroclorido (0,02% (m/v) em H₂O ultrapura), na proporção de 2:1:1. Em seguida as amostras foram colocadas em estufa a 40°C por 50 minutos para acelerar o desenvolvimento da coloração, após o aquecimento foram adicionados 110 µL de H₂O ultrapura e realizada a leitura a 540nm.

f) Determinação dos teores de N-NH₄⁺

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

g) Determinação dos teores de açúcares solúveis

A determinação dos teores de açúcares solúveis foi realizada segundo YEMM & WILLIS (1954). Em tubos de ensaio de 2,5 cm de diâmetro imersos em banho de gelo, foram adicionados 5 mL do reagente de antrona (2% em H₂SO₄ 5:2), e após 5 minutos de repouso, adicionou-se lentamente 1 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessário), deixando-se em repouso por 5 minutos a 0°C. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 10 minutos para o desenvolvimento da coloração esverdeada característica. Após resfriamento em água corrente, as leituras espectrofotométricas foram realizadas. A glicose (0, 20, 40, 50, 80 e 100µg mL⁻¹) foi utilizada como padrão.

h) Determinação dos teores de N-amino livre

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

i) Determinação dos teores nutricionais em tecido vegetal

Para a determinação dos teores dos elementos N, K e P, as raízes, colmos e folhas secas, foi realizada a digestão sulfúrica de cada parte da planta de acordo com o protocolo de Tedesco (1995), onde uma massa de 0,2 g de amostra foi pesada e colocada em tubo para digestão. Foram adicionados 7 g de mistura catalisadora (sulfato de sódio, sulfato de cobre e selênio), 1 ml de peróxido de hidrogênio e 2 ml de ácido sulfúrico. Os tubos foram inseridos no bloco digestor à 170 °C durante 1h, posteriormente, a temperatura foi elevada para 350 °C e permaneceu por mais 2 h. Para determinação de nitrogênio, foi retirado uma alíquota de 10 mL do extrato digerido e transferido para o tubo de destilação de nitrogênio, sendo adicionado 5

mL de NaOH 10M. O produto da destilação foi coletado em Erlenmeyer contendo 5 mL de indicador de ácido bórico. Após o resfriamento da amostra, ocorreu a titulação com H₂SO₄ 0,025M até o momento da viragem. Para a determinação de potássio foi retirada uma alíquota de 1 mL do extrato digerido, diluído em 10 mL de água destilada e determinada a concentração em fotômetro de chama). A determinação de fósforo foi feita por espectrofotometria numa alíquota de 1mL do extrato digerido, sendo adicionados 2 mL de água destilada, 3 mL de molibdato de amônio, 3 gotas de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico, esta mistura foi agitada e após 15 minutos realizada a leitura.

j) Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando tampão NTES (Tris-HCl (0,2 M) pH 8,0; EDTA (25 mM) pH 8,0; NaCl (0,3 M) e SDS (2%)). Amostras de raízes e folhas foram maceradas em N- líquido e homogeneizadas por 10 minutos em vórtex numa mistura contendo 800 µL de tampão NTES e 600 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. O homogenato foi centrifugado a 18.000 x g. por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo e novamente centrifugado por 20 minutos com 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Após o procedimento, o RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 3M (NaOAc_{DEPC}) pH 4,8 (70 µL) e 1 volume de isopropanol puro (700 µL). A seguir a mistura foi mantida a -80°C por 1 hora seguida de centrifugação a 18.000 x g. por 20 min a 4°C. Descartado o sobrenadante o precipitado foi lavado em etanol_{DEPC} (70%) e centrifugado a 18.000 x g. por 10 minutos. O precipitado foi solubilizado em 600 µL H₂O_{DEPC} e novamente precipitado com 600 µL de cloreto de lítio 4M (LiCl_{DEPC}), pH 4,8 durante 16 horas a 4°C. Decorrido esse período a solução foi centrifugada a 18.000 x g. por 20 minutos a 4°C e o precipitado foi novamente solubilizado em 450 µL H₂O_{DEPC}. Após a completa dissolução foi adicionado acetato de sódio 3M (NaOAc_{DEPC}) pH 4,8 (50 µL) e etanol absoluto (1000 µL). A mistura foi mantida por 45 minutos a -80°C e centrifugada a 18.000 x g. por 20 min a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol (70%) e após a secagem do solubilizado com H₂O_{DEPC} (50 µL), para armazenamento a -80°C. O RNA total foi quantificado com uso de fluoróforo específico para RNA no fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Após a quantificação, 3 µL de amostras de cada extração foram corridas em gel de agarose (1%) e coradas com gel red, para detecção de possíveis sinais de degradação do RNA.

k) Tratamento com DNase I, síntese do cDNA e PCR em tempo real

Amostras de 0,5 µg de RNA total foram tratadas com DNase (“*DNase I Amplification Grade – Invitrogen™*”) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 30 µL com concentração de 0,125 µg. µL⁻¹, para aumentar a alíquota a ser pipetada. Quatro microlitros de solução representado 0,5 µg de RNA foram misturados com 0,5 µL do tampão de reação da DNase I (10X), 0,5 µL da DNase I. A incubação da reação foi conduzida a 25°C por 15 min., seguida da adição de 0,5 µL de EDTA (25 mM) e posterior inativação da DNase I a 70°C por 10 minutos. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “*High Capacity RNA-to-cDNA*” (*Life Technologies*) seguindo as instruções do fabricante.

O gene do fator de alongamento 1- α de arroz (*eEF1- α*) foi utilizado como controle endógeno para normalização da expressão gênica (JAIN, 2009). As reações foram feitas no aparelho “*StepOne Plus Real-Time PCR System*” (“*Applied Biosystems*”) utilizando o “*kit Power SYBR® Green PCR Master Mix*” (“*Applied Biosystems*”) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicata. A reação foi montada em placas de PCR da seguinte maneira: 6 µL do tampão “*Power SYBR Green PCR Master Mix*” (2X), 3 µL de uma solução de “*primers*” (3,6 µM) cada e 3 µL do cDNA diluído, com volume final

de 12 µL. A placa foi selada com filme ótico apropriado, agitada por três minutos em vórtex próprio e centrifugada a 3.000g por 3 min a 25°C. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dez minutos a 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Uma curva de dissociação (“*melting*”) foi adicionada à programação para identificar possíveis amplificações inespecíficas.

l) Desenho dos iniciadores (“primers”) para os estudos de expressão gênica

Para confecção dos primers foi utilizada a plataforma do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), os quais foram testados quanto a especificidade através do -alinhamento de sequências neste mesmo site (Tabela 6). Experimentalmente foram testados quanto a especificidade, ao fim da reação de PCR, durante a “*curva de melting*”. Todos os “*primers*” apresentaram especificidade.

Tabela 6. Sequências de nucleotídeos (5' a 3') usadas para amplificar os scripts de cDNA na análise quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Par de Primer	Sequências de nucleotídeos (5' a 3')	Forward / Reverse
OsA 2	GCAGAAGAGGCCCGTAGGA	Forward
OsA 2	CAGGGTGGTCAGCTCTCTCAA	Reverse
OsA 7	TCGACACGATCCAGCAGAAC	Forward
OsA 7	GCTGATGACGATCTCTCGTTGA	Reverse
OsNRT 1.1	AGGGGGTACGTCTACAAGGA	Forward
OsNRT 1.1	AGCTTGCATATGTCATGCTG	Reverse
OsNRT 2.1	CCACGGTGCAAGTCTCAAGT	Forward
OsNRT 2.1	GTCGCAGAATTGTTTACGCCT	Reverse
OsGS 1.2	TCCTCGAGAGGGTCACAGAG	Forward
OsGS 1.2	GAGCTTGTGCGATCGCCTTCT	Reverse
OsGS 2	AGGCGAAGGGAAAAGGCTAC	Forward
OsGS 2	GAGGGTTGGCTCCCAAAGAA	Reverse
OsFD-GOGAT	ATGCAGCTGAAGGGCTTGAT	Forward
OsFD-GOGAT	GGCACAAGCTTCAGGAGAGT	Reverse
OsNADH-GOGAT	TGCAGACGTGGACAATCACT	Forward
OsNADH-GOGAT	CCGAGGGGGTTATGTCCTCT	Reverse
OsNOX 1	CGATGCTCGTTCTGCTCTCA	Forward
OsNOX 1	TAGGTCGTGCGAAATGGGTC	Reverse
OsNOX 9	TACCTTCGGGCAGACACGGAT	Forward
OsNOX 9	GCGGGTTGCTGTCACTAAG	Reverse
OsAKT 1	TACAGCCGACAATGTGGTGAAT	Forward
OsAKT 1	GTCAAGAACAAGCCATGTGGTA	Reverse
OsAKT 2	CTACCTCATCGGCAACATGAC	Forward
OsAKT 2	CGAAATTGGAGGCAGCACGAA	Reverse
OsKAT 1	GATGCACAACACACCAGCAA	Forward

Continua...

Continuação da Tabela 6.

Par de Primer	Sequências de nucleotídeos (5' a 3')	Forward / Reverse
OsKAT 1	CAGGCTCCTTCTGTGGACTG	Reverse
OsKAT 2	GGACCAGGAATTTTAGGGACAC	Forward
OsKAT 2	CCTTGGGGAGACTATCCAATGT	Reverse
OsHKT 1.1	TTGCTGGTTTCCTTGCTCTGA	Forward
OsHKT 1.1	TCAGAACCCAGAGTTGCCTG	Reverse
OsHAK 5	CAGACCAACACACGACGGAA	Forward
OsHAK 5	AAATCGGCGTTTGGTTCTGC	Reverse
OsNHX 1	ACATAGATGCGGCTGTCGTT	Forward
OsNHX 1	CATAAGGGCAACCTCACGGT	Reverse
OsSKOR	CCTTACGGCATAGTTGGCGA	Forward
OsSKOR	TCAGAAGGCTGCAAAGCTCA	Reverse
OsSOS 1	AGCGTGCTAGTGATGCAGTT	Forward
OsSOS 1	AACACGATGCCACCAGTGAA	Reverse

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Caracterização Químico-Espectroscópica da seiva extraída de *Kappaphicus alvarezii*

a) Composição elementar dos extratos de *Kappaphicus alvarezii*

A Tabela 7 mostra a composição elementar das diferentes frações de algas. A maior quantidade de carbono foi encontrada nos subprodutos de biomassa seca residual (K-msr), com quantidade ligeiramente maior nas amostras secas em estufa (KmsrE). As quantidades de carbono nas subfrações do extrato foram inferiores às das biomassas, com valores menores para o extrato seco em estufa do que para o extrato liofilizado. As quantidades de H e N nas subfrações de biomassa também foram superiores às dos extratos. Entre as subfrações de biomassa, K-sapE (seca em estufa) apresentou valores ligeiramente superiores à biomassa liofilizada, e entre as subfrações de extrato, K-sapL (extrato liofilizado) apresentou valores ligeiramente superiores a K-sapE.

A relação C:N, que influencia no grau de estabilidade do composto, apresentou valores maiores para as subfrações de biomassa do que para as subfrações de extrato. A biomassa seca em estufa (K-msrE) apresentou a maior relação C:N, seguida pela biomassa liofilizada (K-msrL), e entre os extratos, K-sapL teve um valor ligeiramente superior ao K-sapE (extrato seco em estufa).

Tabela 7. Composição elementar, relações atômicas dos diferentes extratos de *Kappaphicus alvarezii*.

Amostras	C	H	N	C/N
				%
K-sapL	2,825	1,530	0,290	11,364
K-sapE	1,580	0,650	0,175	10,533
K-msrL	23,890	4,545	0,485	57,467
K-msrE	25,74	4,645	0,420	71,500

b) Caracterização mediante espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (IVTF)

A Figura 25 mostra a presença de grupamentos funcionais das diferentes frações de algas obtidas durante o processo de extração de k-sap e com diferentes formas de secagem mediante espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier. Os espectros em Figura 25A e 25a1-3 mostram os efeitos das formas de secagem na biomassa residuais das algas. A aplicação de calor modifica a composição química de K-msr e K-sap quando comparado com a liofilização. Bandas em 3346.11 cm^{-1} e 3349.46 cm^{-1} foram menos intensas e mais estreitas em K-msrE e K-sapE respectivamente, quando comparadas com K-msrL (3342.25 cm^{-1}) e K-sapL (3330.68 cm^{-1}), respectivamente. Isto indica que grupamentos -OH e -NH, pertencentes a carboxilas ou amidas são fortemente diminuídos pela secagem em estufa. Grupamentos -CH, pertencentes a fragmentos -CH₃ em K-msrE (2964.25 cm^{-1} e 2900.6 cm^{-1}) e K-sapE (2965.05 cm^{-1} e 2906.39 cm^{-1}) foram praticamente imperceptíveis após aplicação de temperatura quando comparados com K-msrL (2900.12 cm^{-1} e 2883.24 cm^{-1}) e K-sapL (2901.12 cm^{-1} e 2883.24 cm^{-1}). As bandas em 1643.16 cm^{-1} , 1643.16 cm^{-1} , 1641.23 cm^{-1} e 1643.16 cm^{-1} em K-msrE, K-msrL, K-sapE e K-sapL respectivamente foram mais intensas nas frações liofilizadas, o que indica que aplicação de temperatura na secagem das frações também impacta os grupamentos -COO, C=O. Bandas em 1224.66 cm^{-1} , 1225.33 cm^{-1} , 1224.66 cm^{-1} e 1203.44 cm^{-1} em K-msrE, K-msrL, K-sapE e K-sapL respectivamente que pertencem a -CO e ésteres -S=O permaneceram

visíveis em todas as frações independente da forma de secagem. No entanto, as bandas em 1151.37 cm^{-1} nas frações liofilizadas K-msrL e K-sapL estão mais bem resolvidas e ausentes nas frações secas a temperatura K-msrE e K-sapE, podendo indicar melhor preservação dos fragmentos de carboidratos e *k*-carragena quando liofilizadas as frações. A elevada visibilidade das bandas em 1072.3 cm^{-1} em K-msrL revelou que grupamentos específicos como -CO pertencentes a fragmentos 3,6-anidrogalatose somente são preservados mediante liofilização da biomassa. Por outro lado, as bandas em 1033.72 cm^{-1} , 1072.3 cm^{-1} , 1033.72 cm^{-1} e 1037.58 cm^{-1} pertencentes a grupamentos -C-O-C de carboidratos foram persistentes em todas as frações independente da forma de secagem (PEREIRA et al., 2009; GÓMEZ-ORDÓÑEZ & RUPÉREZ 2011; KANG et al., 2011).

A Figura 26B mostra a análise quimiométrica de PCA-ATR-FTIR (PC-1 + PC-2=100% da variância total explicada) das frações de *Kappaphycus*. Os *scores* confirmaram uma forte diferenciação composicional entre os extratos aquosos de *Kappaphycus* (K-sapL e K-sapE) agrupados a valores negativos da PC-1 (53% da variância total explicada) e as frações de biomassa residual da extração (K-msrE e K-msrL), agrupados a valores positivos. Os *scores* indicam que a aplicação de temperatura como forma de secagem impacta mais intensamente a biomassa residual, separando essas duas frações na PC-2 (47% da variância total explicada), com a biomassa liofilizada (K-msrL) agrupada a valores negativos e a seca mediante estufa (K-msrE) a valores positivos. Os *loadings* (Figura 26b1) da PC-1 confirmam que a liofilização preserva melhor os fragmentos de carboidratos, enquanto a aplicação de temperatura impacta grupamentos como -OH e -NH.

No melhor de nosso conhecimento, são escassos os estudos onde se comparam as metodologias de obtenção de extratos de *Kappaphycus* e seu impacto no crescimento das plantas. Nesse sentido, os resultados mostrados aqui são altamente relevantes uma vez que existem relatos sobre a variabilidade dos efeitos sobre as vias de sinalização e genes expressos em plantas quando tratadas com extratos aquosos de alga (GOÑI et al., 2016). Estudos mais recentes sobre os efeitos dos extratos de *Kappaphycus* em plantas utilizam preservativos na sua composição (KUMAR et al., 2020), o que pode modificar a quantidade de estruturas orgânicas originais nos extratos assim como quantidades de nutrientes como o K. No presente estudo propomos formas de preservação das estruturas íntegras baseado na liofilização e, portanto, na sua forma sólida, preservando os fragmentos responsáveis pelos seus efeitos nas plantas.

A espectroscopia vibracional tem sido amplamente utilizada para a caracterização de compostos extraídos de macroalgas como *Kappaphycus alvarezii*, especialmente aquelas substâncias tipo carragenas (PEREIRA et al. 2013). Grupos funcionais como -NH, estiramentos de estrutura CH₃, COO e -C-O de carboidratos encontradas na biomassa de *Kappaphycus alvarezii* foram identificados no extrato aquoso K-sapL quando liofilizado (KANG et al. 2011). Bandas específicas indicativas da presença de bandas pertencentes a carboidratos (1037 cm^{-1}), lipídeos (2850 cm^{-1}) e aldeídos (1637 cm^{-1}) foram também observadas neste estudo (SUMAYA & MURUGAN, 2017).

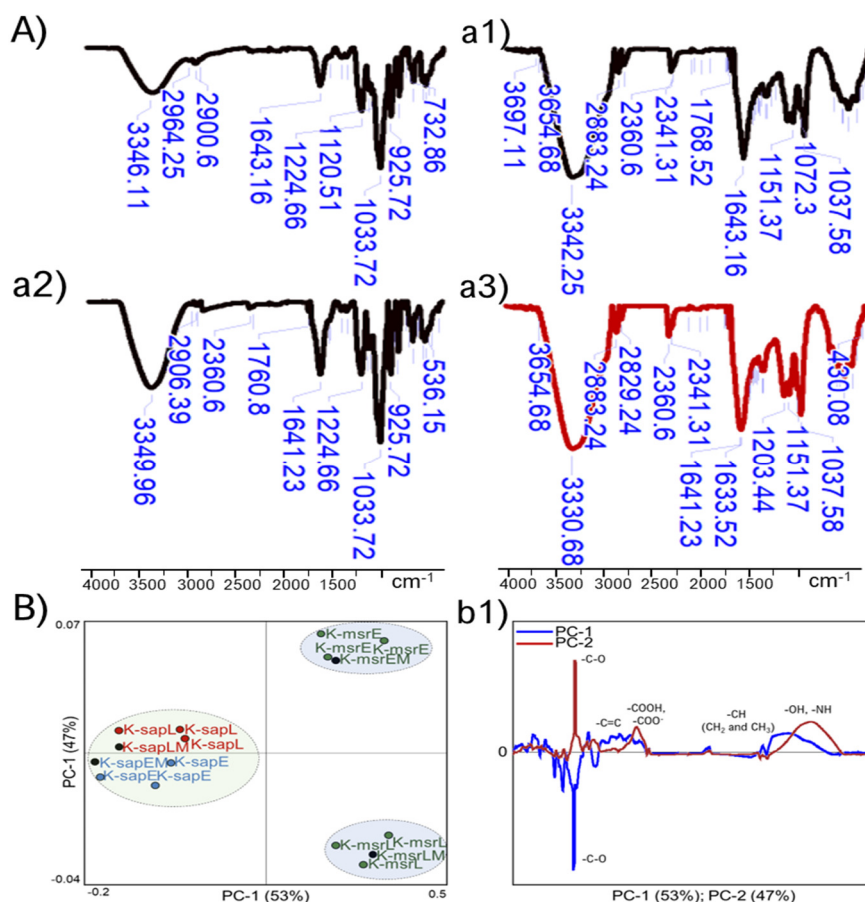


Figura 26. Espectros IVTR das frações de algas, biomassa residual da extração das algas seca mediante aplicação de calor em estufa A), liofilização a1) e do extrato aquoso seco em estufa a2), liofilização a3). Análise de componentes principais PCA-IVTR, scores B) e loadings b1) realizado com os espectros puros.

c) Ressonância magnética nuclear do isótopo de carbono de massa 13 com rotação no ângulo mágico e polarização cruzada (RMN ¹³C PC RAM)

A Figura 27 mostra a caracterização mediante RMN ¹³C PC RAM das frações de algas secas utilizando temperatura ou liofilização. Nos espectros de todas as frações de algas há presença de sinais entre ~14 ppm e 40 ppm, correspondentes a estruturas (-CH₂)_n de fragmentos lipídicos. Picos mais intensos e resolvidos de fragmentos lipídicos (16.51 ppm, 20.34 ppm, 25.90 ppm, 28.36 ppm) estiveram presentes na fração aquosa liofilizada (K-sapL). Todas as frações apresentaram em seus espectros sinais entre 59 ppm e 105 ppm correspondentes a estruturas de carboidratos, presumivelmente, resíduos de *k*-carragena. As estruturas das biomassas K-msrE e K-msrL são semelhantes, no entanto, a liofilização parece preservar estruturas lábeis como α-D-glucopiranosas (59.99 ppm). Em ambas as frações K-msrE e K-msrE estão presentes picos em 62.09 ppm e 62.23 ppm respectivamente, característicos de resíduo de galatopiranososa. Os picos em 69.81 ppm e 69.52 ppm em K-msrE e K-msrL respectivamente indicam a presença de resíduos de galactopiranososa e anidrogalatopiranososa em ambas as frações. Picos bem resolvidos são também observados em 80.72 ppm e 80.65 ppm para K-msrE e K-msrL respectivamente, indicando a presença de resíduos, assim como os sinais em 102.39 ppm e 101.31 ppm que indicam a presença de carbonos anoméricos de carboidratos (EHA et al., 2021; JAIN et al., 2015). Os sinais em 132.50 ppm e 150.48 ppm em K-msrE assim como em 132.07 ppm e 150.27 ppm em K-msrL pertencem a carbonos aromáticos (aminoácidos aromáticos) e olefinas (=C-H de lipídeos) com e sem funcionalização respectivamente. Já os

sinais em 171.36 ppm e 173.02 ppm presentes em K-msrE e K-msrL respectivamente correspondem com estruturas -COO e NC=O de peptídeos e lipídeos (MAO et al., 2007; KEELER et al., 2006) (Figuras 27A e a1).

A secagem em estufa do extrato K-sapE ocasionou a decomposição e perda de estruturas mais lábeis (e.g. lipídeos: 22.65 ppm – 35.94 ppm, peptídeos e metoxilas: 54.07 ppm, 59.70 ppm) e em consequência, a preservação de estruturas que se resultaram mais termoestáveis (e.g. resíduos de *k*-carragena: 62.74 ppm -109.97 ppm e carbonos aromáticos: 150.92 ppm). Já a liofilização do extrato aquoso K-sapL mostrou uma assinatura espectral diferentes com as restantes frações estudadas (K-msrE, K-msrL, K-sapE). A liofilização de K-sapL mostrou picos resolvidos e intensos entre 15.51 ppm – 28.36 ppm, correspondentes a estruturas alifáticas de lipídeos e proteínas. Estruturas e fragmentos peptídeos se mostraram mais bem preservados pela liofilização em K-sapL, uma vez que os picos em 49.37 ppm e 57.68 ppm são intensos e característicos destes fragmentos ausentes nas outras frações. Os picos em 68.08 ppm, 70.46 ppm, 96.54 ppm e 100.87 ppm correspondentes a estruturas de carboidratos como resíduo *k*-carragena também estão presentes em K-sapL. O pico em 169.55 ppm, correspondente a estruturas -COO e NC=O de peptídeos e lipídeos foi o mais intenso entre todos quando comparado com o resto das frações (Figuras 27 a2 e a3).

A análises quimiométrica PCA-¹³C RMN RAM PC (PC-1+PC-2 =98% da variância total explicada) permitiu confirmar a diferença entre as frações e a integridade de seus componentes (Figura 27B). Três grupos de amostras se organizaram ao longo da PC-1 (53% da variância total explicada), a valores positivos se agruparam a repetições de K-sapE e com maiores semelhanças, as frações de K-msrE e KmsrL. A valores negativos da PC-1 se agruparam somente as repetições das frações de K-sapL (Figuras 27B). Os loadings (PC-1) reafirmam que a diferença entre K-sapL e restante das frações consiste em uma preservação de fragmentos peptídeos. Assim os landings da PC-2 confirmam que aplicação de temperatura nas frações aquosas de K-sapE preserva fundamentalmente carbonos aromáticos (Figura 27 b2).

A quantificação das estruturas presentes nas frações permite entender as modificações na composição de acordo com a extração e secagem (Figuras 27C, c1, c2 e c3). Quantidades superiores de C_{Alkyl-H,R} e C_{COOH} (28% e 16% respectivamente) na fração K-sapL, confirmam a preservação de estruturas lipídicas e proteicas durante a liofilização. A secagem em estufa reduz a quantidade relativa de estruturas peptídicas (C_{Alkyl-O,N}) em até 8% em comparação com a liofilização. Fragmentos de carboidratos (C_{Alkyl-O}; C_{Alkyl-di-O}) e estruturas aromáticas (C_{Aromatic-H,R}; C_{Aromatic-O,N}) estão em maior quantidade (7-15%) e 3-5% respectivamente superior quando comparado com K-sapL (Figura 27C). As distintas quantidades de estruturas nas frações das algas geram diferentes propriedades (Figura 27 c1, c2 e c3). As frações K-sapE e K-msrE, secas mediante aplicação de temperatura mostraram maior aromaticidade (Figuras 27 c1) e por tanto, as frações K-sapE e K-msrE, liofilizadas apresentam maior alifaticidade (Figura 27 c2). Dentre todas as frações, o K-sapL apresentou maior índice de hidrofobicidade, presumivelmente pela elevada preservação de estruturas mais alifáticas (Figura 27 c3).

São praticamente inexistentes os estudos que mostrem os resultados que aqui foram obtidos. Este estudo é pioneiro na utilização de RMN ¹³C PC RAM aliada a técnicas quimiométricas para caracterizar as biomassas e extratos obtidos de *Kappaphycus alvarezii* e sua relação com a bioatividade em plantas. Foram identificados nos espectros de K-sapL, sinais que pertencem a resíduos de *k*-carragena, lipídeos e peptídeos, já confirmados na literatura (MASARIN et al., 2016; WEBBER et al., 2012; VAGHELA et al., 2022). Embora muitos dos efeitos dos extratos de *Kappaphycus* relatados na literatura tenham sido justificados pela sua composição nutricional, a fração orgânica pode justificar os efeitos encontrados nas plantas de arroz quando aplicados o K-sapL tanto foliar como radicular. Isto porque existem relatos na literatura que demonstram que carragenas extraídas de *Kappaphycus* possuem bioatividade nas plantas, estimulando o crescimento, multiplicação celular e a capacidade de defesa das plantas

em condições normais e diante eventos de estresse (LEMONNIER-LE PENHUIZIC et al., 2001; GONZÁLEZ et al., 2012; VERA et al., 2012; HASHMI et al., 2012; GUO et al., 2022).

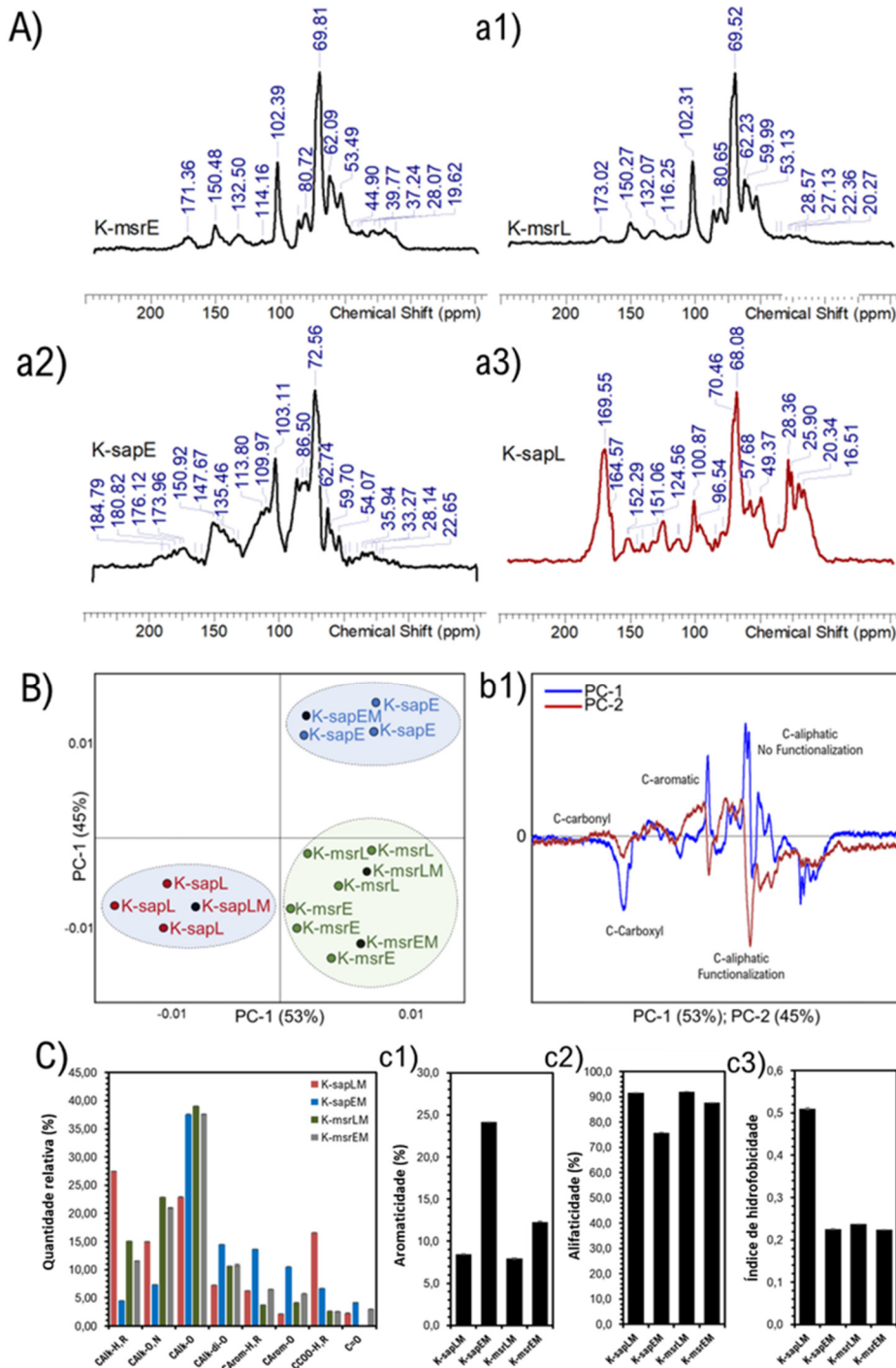


Figura 27. Espectros RMN ^{13}C PC RAM das frações de algas, biomassa residual da extração das algas seca mediante aplicação de calor em estufa A), liofilização a1) e do extrato aquoso seco em estufa a2), liofilização a3). Análise de componentes principais -PCA, scores B) e loadings b1) realizado com os espectros puros. Quantidade relativa dos tipos de carbono C), aromaticidade c1), alifaticidade c2) e índice de hidrofobicidade c3).

d) Determinação dos teores de macro e micronutrientes e de metais pesados nos extratos e biomassa residual de K-sap

A Tabela 8 mostra a composição de macro, micronutrientes e metais pesados presentes nas frações de extratos aquoso de algas e da biomassa residual da extração das algas. Quantidades de macronutrientes foram detectados nas subfrações de algas. O Ca mostrou estar em maior quantidade no extrato liofilizado K-sapL, seguido pela subfração de biomassa K-sapE e em menor quantidade nas subfrações K-msrL e K-sapE respectivamente. A quantidade Mg foi superior no extrato liofilizado K-sapL quando comparado com o extrato seco em estufa (K-sapE), sendo as biomassas secas com estufa e liofilizada as de menores quantidades de Mg na sua composição respectivamente. A presença de K mostrou-se elevada em todas as subfrações, sendo o componente maioritário entre todos os presentes. A quantidade de K foi superior na fração de extrato liofilizado K-sapL, seguido da fração de extrato seco com estufa K-sapE, ambos os extratos com quantidades superiores às biomassas das algas. O P também apresentou quantidades superiores nos extratos aquoso K-sapL e K-sapE quando comparado com as biomassas das algas.

As subfrações de algas mostraram quantidades importantes de micronutrientes como Fe, Mn, Zn e Cu. As quantidades de Fe foram maiores nas biomassas sólidas, com valores superiores na biomassa liofilizada quando comparada com a biomassa seca em estufa. As subfrações dos extratos apresentaram valores de até 8.65 vezes inferior às biomassas, com quantidades levemente superior no extrato liofilizado (K-sapL). A quantidade de Mn foi superior na biomassa liofilizada (K-msrL), enquanto na subfração do extrato K-sapE resultou a menor entre todas, para as subfrações de K-sapL e K-msrE as quantidades de Mn foram semelhantes. A presença de Zn foi superior na subfração do extrato liofilizado K-sapL e semelhante nas subfrações restantes. A quantidade de Cu mostrou ser superior nas subfrações das biomassas, quando comparadas com as subfrações dos extratos. A biomassa K-msrL apresentou quantidades de Ni, diferente com a biomassa seca em estufa onde não foi possível detectar esse cátion. Os extratos de alga (K-sapL e K-sapE) não mostraram quantidades de níquel.

A composição das subfrações de extratos de algas não mostrou presença de metais pesados e potencialmente tóxicos para as plantas como Cd, Pb, Cr e Ni. As subfrações de biomassa K-msrL e K-msrE não apresentaram quantidades detectáveis de Cd e Pb, no entanto, ambas apresentaram quantidades elevadas de Cr, principalmente K-msrL. As quantidades de Na nas biomassas das algas foi semelhante tanto em K-msrL quanto em K-msrE, em ambas as sub frações, inferiores aos extratos de algas, onde K-sapL apresentou as maiores quantidades de Na, seguidos da fração K-sapE.

A composição de macro e micronutrientes no K-sapL também foi relatada em outros estudos considerando extratos de *Kappaphycus*. PAL et al. (2015) observaram quantidades substanciais de K, Ca, Mg e P na composição do extrato de *Kappaphycus*, entretanto, diferentemente deste estudo, os autores também relataram a presença de metais pesados como Pb e Cr. PRAMANICK et al. (2017) também relataram extratos de *Kappaphycus* com composição mineral semelhante ao K_{AIV}-sapL, mas com mais Na⁺ do que K⁺ e alta quantidade de Mg. SINGH et al. (2016) obtiveram um extrato de *Kappaphycus* (K_{AIV}-sap) que também continha grandes quantidades de K, Na, Mg, Fe e Zn, além de metais pesados como Pb, Ni e Cr.

Tabela 8. Composição de macro, micronutrientes e metais pesados presentes nas frações de extratos aquoso de algas e da biomassa residual da extração das algas.

	K-sapL	K-sapE	K-msrL	K-msrE
	g kg ⁻¹			
K	450,000	390,000	170,000	150,000
P	2,5227	2.1250	0,9318	0,4962
Ca	4,3540	1,0652	1,6822	2,7780
Mg	5,3602	4,8089	3,2482	3.5714
Fe	0,0395	0,0260	0,4143	0,1526
Mn	0,0070	0,0052	0,0176	0,0077
Zn	0,0313	0,0216	0,0266	0,0223
Cu	0,0058	0,0053	0,0084	0,0064
Ni	<i>nd</i> *	<i>nd</i>	16.2	<i>nd</i>
Pb	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Cr	<i>nd</i>	<i>nd</i>	53,93	7,53
Cd	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Na	3,5000	0,8000	0,6500	0,7000

*A leitura do elemento, na solução obtida após digestão e diluição, ficou abaixo do limite de detecção ou de quantificação do equipamento.

4.5.2 Experimento 1 - Dose vs Resposta do K-sap Aplicado Via Radicular

a) Acúmulo de biomassa fresca e seca em plantas

O efeito da aplicação de K-sap via radicular na produção de biomassa seca e fresca nas raízes, bainhas e folhas das plantas aos 22 e 25 dias são apresentados na Figura 28. A massa fresca das raízes foi estatisticamente estimulada por todas as concentrações de K-sap aplicadas. Aos 22 dias o maior estímulo da massa fresca foi encontrado nas raízes das plantas sob tratamento com 3% de K-sap, estatisticamente superior ao controle em até 50%. Um comportamento semelhante foi observado aos 25 dias, onde 3% de K-sap promoveu um aumento significativo de massa fresca das raízes em até 60%. De forma semelhante, a massa seca das raízes das plantas foram também estimuladas por todas as concentrações de K-sap. A concentração de 2% foi a que mais estimulou a massa seca aos 22 dias, sendo superior estatisticamente ao controle em até 25%, enquanto aos 25 dias o tratamento de 3% estimulou a massa seca radicular em até 28% estatisticamente superior ao controle (Figura 28).

A massa fresca das bainhas foi levemente estimulada apenas pela aplicação de K-sap a 2%, os tratamentos restantes não mostraram nenhum efeito aos 22 dias de aplicação. Aos 25 dias de aplicação, tão pouco houve efeitos na massa fresca das bainhas plantas pelos tratamentos aplicados. Contrariamente ao observado para massa fresca, a aplicação radicular do K-sap promoveu estímulo da produção de massa seca da bainha. Aos 22 dias, a massa seca da bainha foi estimulada por todos os tratamentos de K-sap, especificamente o tratamento mais concentrado 10%, superou significativamente ao controle em até 13%. Aos 22 dias os tratamentos de 3%, 5% e 10% foram estatisticamente superiores ao controle, especialmente, a aplicação de K-sap a 3%, estimulou a massa seca em até 43% (Figura 28).

A aplicação radicular de 2%, 3%, 5% e 10% estimularam a produção de massa fresca das folhas das plantas aos 22 dias. A concentração de 2% promoveu um aumento de massa fresca nas folhas estatisticamente superior ao controle em até 10%. Aos 25 dias, somente a concentração de 2% mostrou aumento da produção de massa fresca das folhas, superior ao controle em até 11%. A produção de massa seca foliar foi estimulada por todas as concentrações aplicadas de K-sap aos 22 e 25 dias. A concentração de 10% de K-sap aplicada via radicular nas plantas aos 22 dias, promoveu o maior estímulo de produção de massa seca das folhas, induzindo um acréscimo estatisticamente superior ao controle de até 60%. Já aos 25 dias, K-

sap na concentração de 3% promoveu um acréscimo na massa seca das folhas das plantas estatisticamente superior em até 14%, quando comparado ao controle (Figura 28).

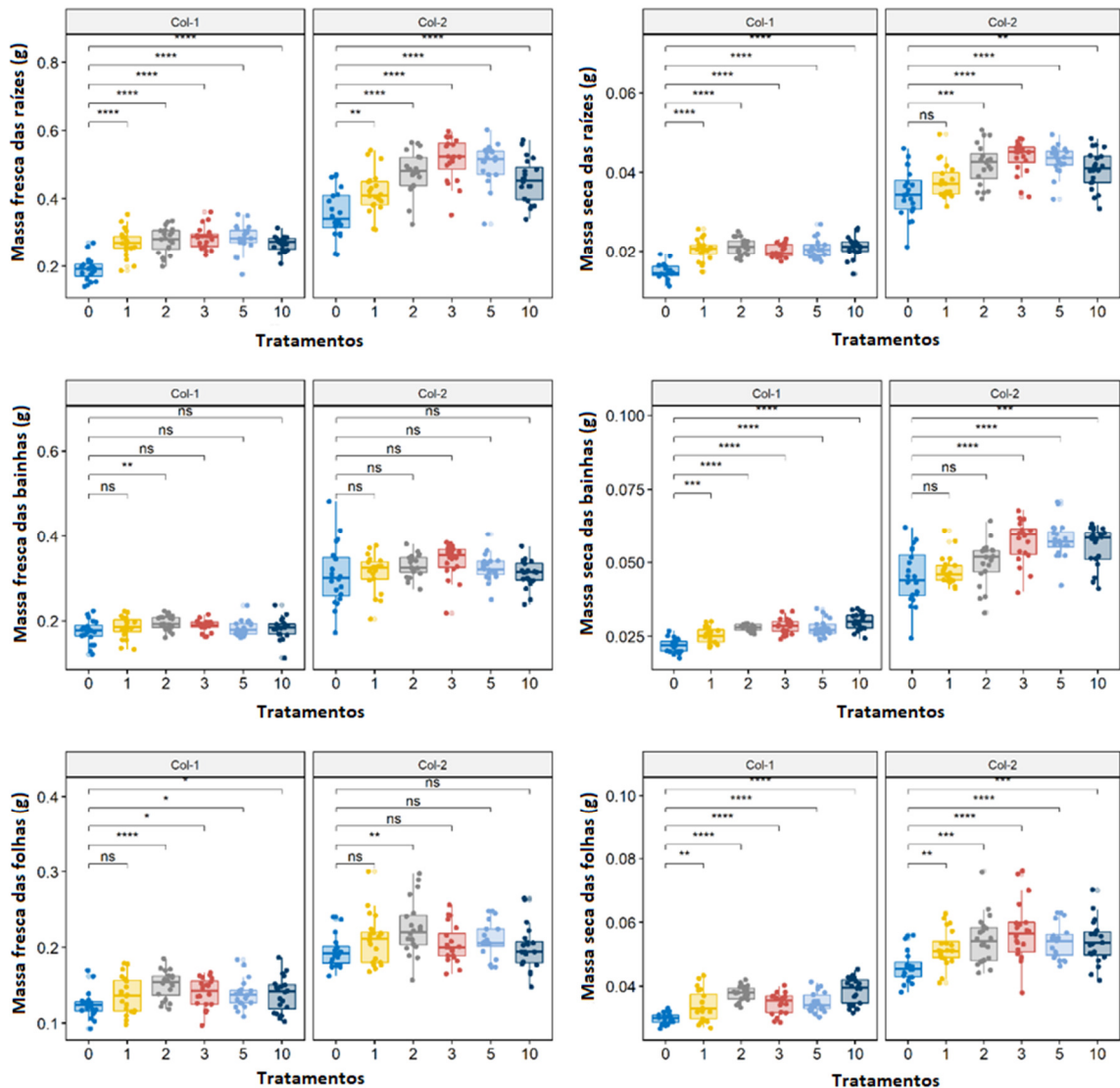


Figura 28. Produção de biomassa fresca e biomassa seca das raízes, bainhas e folhas das plantas de arroz avaliada em dois momentos, pela aplicação radicular de K-sapL a concentrações de 1%, 2%, 3%, 5% e 10% (v:v).

b) Estímulo da aplicação radicular de K-sap no desenvolvimento de raízes

A aplicação radicular K-sap promoveu intensas modificações da morfologia radicular nas plantas de arroz (Figura 29). A área total das raízes foi estimulada por todas as concentrações de K-sap aplicadas via radicular. A concentração de 2% de K-sap estimulou tanto aos 22 dias quanto aos 25 dias a área total das raízes, com valores estatisticamente superiores ao controle em 42% e 30%, respectivamente (Figura 29). A área das raízes superfinais foi estimulada pela concentração de 2% em até 60% e 42% estatisticamente superiores ao controle aos 22 e 25 dias, respectivamente. Embora menos intensas, a área das raízes finas nos tratamentos de 2% também foi estatisticamente superior ao controle, tanto aos 22 dias como aos 25 dias, com aumentos de 22% e 6%, respectivamente. A área das raízes grossas resultou

também em superioridade estatística ao controle, à concentração aplicada de 1% e 3% aos 22 dias e 25 dias, com aumentos respectivos de 70% e 20% (Figura 29).

A aplicação radicular de K-sap promoveu aumentos no comprimento total das raízes (Figura 29). A concentração de 2% promoveu comprimentos estatisticamente superiores ao controle em até 50% tanto aos 22 dias como aos 25 dias. As raízes superfinas parecem ter sido a classe mais estimulada pelo K-sap à concentração de 2%, tanto aos 22 dias quanto aos 25 dias, com aumentos estatisticamente superiores ao controle em 80% e 50%, respectivamente. Também menos intensos, mas com aumentos significativos o comprimento das raízes classificadas como finas, também foi estimulado à concentração de 2%, tanto aos 22 dias como aos 25 dias, os aumentos foram de 15% e 18%, respectivamente. O comprimento das raízes mais grossas resultou em aumentos de 22% e 18% nas concentrações de 1%, aos 22 dias e 25 dias, respectivamente, quando comparados ao controle (Figura 29).

Os efeitos da aplicação radicular de K-sap sobre o número de pontas (quantidade total de raízes) foi menos homogêneo (Figura 29). A quantidade total de pontas foi estatisticamente superior nos tratamentos de 2% de K-sap aos 22 e 25 dias em até 44% e 19%, respectivamente. A quantidade de pontas nas raízes superfinas mostra um estímulo estatisticamente superior ao controle, apenas para os tratamentos de 2%, 5% e 10%. Especificamente para o tratamento de 10% aos 18 dias, o estímulo foi significativamente superior ao controle em 61%. Aos 25 dias, a quantidade de pontas foi levemente superior ao controle no tratamento de 2%, porém sem diferenças estatísticas. A quantidade de pontas de raízes classificadas como finas aos 22 dias foi significativamente superior ao controle em até 61% e de 23% aos 25 dias, para as concentrações de 10%. As pontas das raízes classificadas como grossas foram estimuladas em até 25%, com diferença estatística quando comparada com o controle, na concentração de K-sap de 2%. Aos 25 dias, nenhuma concentração de K-sap promoveu estímulos significativos nas pontas das raízes grossas das plantas (Figura 29).

O volume total das raízes foi também estimulado pela aplicação de K-sap via radicular. Aos 18 dias, a concentração de 2% estimulou significativamente em 15% o volume total, enquanto aos 22 dias, 3% de K-sap estimulou significativamente o volume total em até 12%. A concentração de 2% de K-sap, promoveu nas plantas aumentos significativos do volume radicular das raízes superfinas de 25% e 31% aos 22 dias e 25 dias, respectivamente. O volume das raízes finas também foi estatisticamente estimulado pelo tratamento na dose de 2% em até 8% e 11% aos 22 e 25 dias, respectivamente. Por outro lado, o volume das raízes grossas foi estatisticamente superior ao controle aos 22 dias em até 6% para o tratamento de 1%, enquanto aos 22 dias, o tratamento de 3% promoveu um acréscimo do volume de 37% (Figura 29).

O parâmetro número de bifurcações, que oferece informações sobre a ramificação das raízes mostrou intensas modificações pela aplicação radicular do K-sap. Aos 22 dias, a aplicação radicular de 2% e 3% de K-sap provocou aumentos significativos nas ramificações das raízes das plantas de até 80%. Aos 25 dias, o tratamento de 2% ocasionou aumentos significativos nas ramificações do sistema radicular, superiores ao controle em até 60% (Figura 29). Ao mesmo tempo, o diâmetro das raízes mostrou pouca resposta para os estímulos pelos tratamentos de K-sap. Aos 22 dias, apenas o tratamento de 3% mostrou um efeito de inibição de desenvolvimento do diâmetro, enquanto aos 25 dias, as maiores concentrações de 5% e 10%, promoveram aumentos do diâmetro entre 33% e 35% respectivamente (Figura 29).

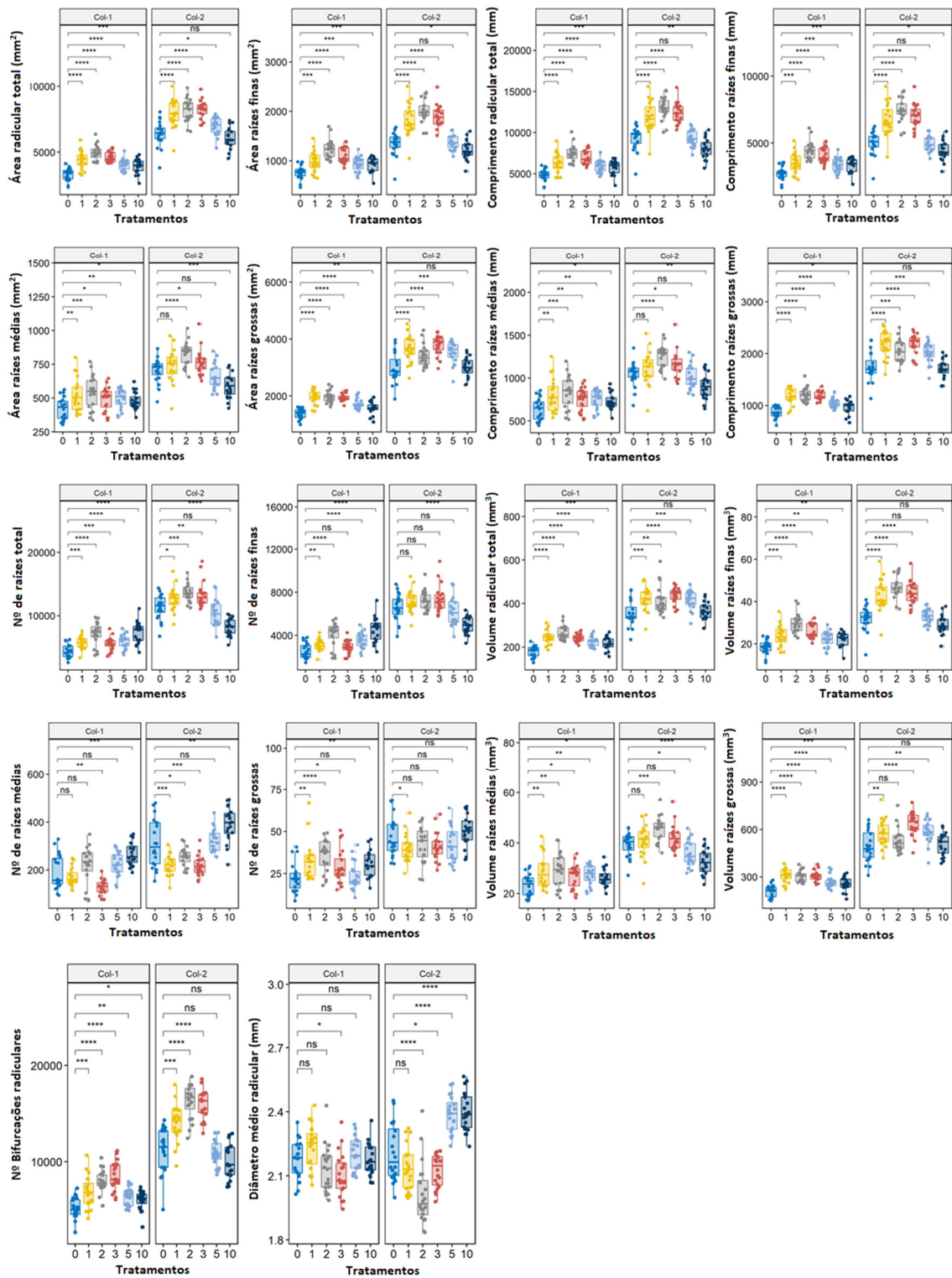


Figura 29. Quantificação dos parâmetros morfológicos das raízes das plantas de arroz tratadas via radicular a concentrações de 1%, 2%, 3%, 5% e 10% (m:m) de K-sap, avaliados em dois momentos.

c) Conteúdo de K⁺ e Na⁺ na parte aérea de plantas pela aplicação radicular de K-sap

A conteúdo de Na⁺ e K⁺ nos tecidos foliares das plantas tratadas com o extrato de K-sap são mostrados na Figura 30. Todos os tratamentos promoveram um acúmulo significativo de Na⁺ nos órgãos foliares aos 22 dias. Interessantemente, a concentração de K-sap a 2% promoveu a maior remoção e alocação de Na⁺ na parte aérea das plantas. Tais resultados parecem lógicos uma vez que há presença importante de Na⁺ na composição de K-sap como quantificado acima. Aos 25 dias, houve aumento da quantidade de Na⁺ na parte aérea com o aumento da concentração de K-sap aplicada, sendo maior o acúmulo nas plantas tratadas com 10%. Aos 25 dias a quantidade de Na⁺ acumulada na parte aérea duplicou (0,24 mg) quando comparado ao acumulado aos 22 dias (0,10 mg) (Figura 30).

Por outro lado, a quantidade de K⁺ presente na parte aérea das plantas também foi superior em todos os tratamentos com K-sap. Semelhante aos resultados observados para o acúmulo de Na⁺, o K⁺ foi mais acumulado no tratamento de 2% aos 22 dias enquanto o tratamento de 3% foi aquele que mais promoveu acúmulo significativo de K⁺ aos 25 dias. Apesar do comportamento dos tratamentos terem sido diferentes em ambos os momentos, tanto para 2% quanto para 3%, o acúmulo de K⁺ na parte aérea da planta permaneceu constante (6 mg) (Figura 30).

Os resultados obtidos aqui são especialmente importantes, isto porque apesar de haver uma quantidade importante de Na⁺ no extrato K-sap, quando comparado com a quantidade K⁺ presente, a relação Na⁺/K⁺ aplicada nos tratamentos é baixa (0,007). Esta baixa relação também contribui para entender o baixo acúmulo de Na⁺ na parte aérea da planta em relação com a quantidade acumulada de K⁺ aos 22 dias (0,016) e aos 25 dias (0,04) e por tanto, as plantas sob tratamento de K-sap translocam inicialmente até 60 vezes mais K⁺ que Na⁺ e posteriormente até 25 vezes a mais. Layek et al. (2015) mostraram anteriormente que a aplicação de extratos de *K. alvarezii* em plantas de milho promove aumento na mobilização de K do solo para a planta. Dwivedi et al. (2014) também relataram aumentos no conteúdo de K em tecidos de plantas de feijão após aplicação de extrato de *Kappaphycus*.

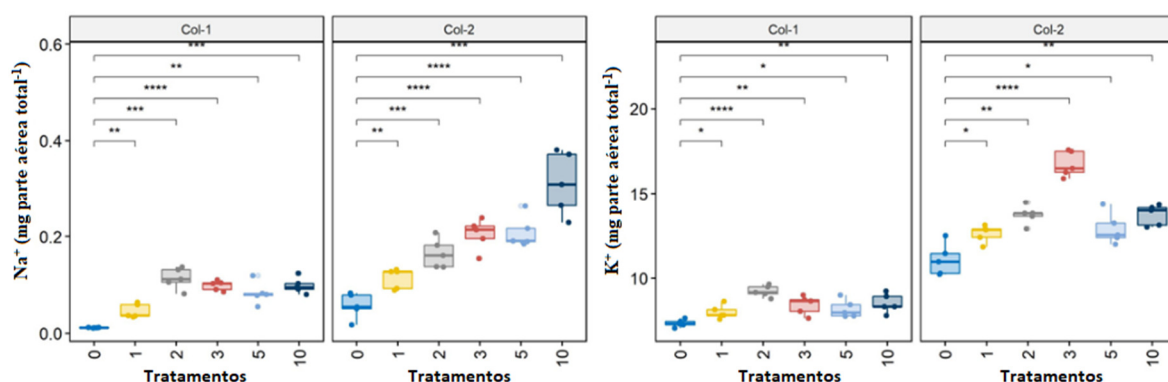


Figura 30. Conteúdo de Na⁺ e K⁺ na parte aérea das plantas tratadas com diferentes concentrações de K-sap: 1%, 2%, 3%, 5% e 10% (v:v) aos 22 e 25 dias, n=5.

4.5.3 Experimento 2 – Dose vs resposta do K-sap por aplicação foliar

a) Acúmulo de biomassa fresca e seca em plantas sob aplicação foliar de K-sap

A aplicação foliar de K-sap modificou a massa fresca nas plantas de arroz dependendo da concentração aplicada (Figura 31). As concentrações entre 10% e 25% estimularam a produção de massa fresca nas raízes, especificamente as plantas tratadas com as concentrações

de 10% e 15% produziram até 10% a mais de biomassa fresca radicular, quando comparadas com o controle. Na bainha, todos os tratamentos de K-sap estimularam significativamente a massa fresca, no entanto, o aumento não superou o 5% quando em comparação ao controle. Já para as folhas, apenas os tratamentos de K-sap com concentrações de 5% e 10% mostraram estímulos significativos e superiores ao controle, no entanto, os aumentos de massa fresca não superam o 6%.

O efeito estimulador na biomassa seca pela aplicação de K-sap foi mais intenso do que o observado na biomassa fresca (Figura 31). As raízes das plantas foram significativamente estimuladas pelo K-sap a concentrações de 5%, 10% e 25%, especialmente o tratamento de 10% estimulou a biomassa em até 33%. De forma semelhante, a bainha foi estimulada em até 13% pela aplicação foliar de 10% de K-sap. A mesma concentração de 10% aplicada via foliar estimulou significativamente até 10% da massa seca das folhas quando comparada com o controle.

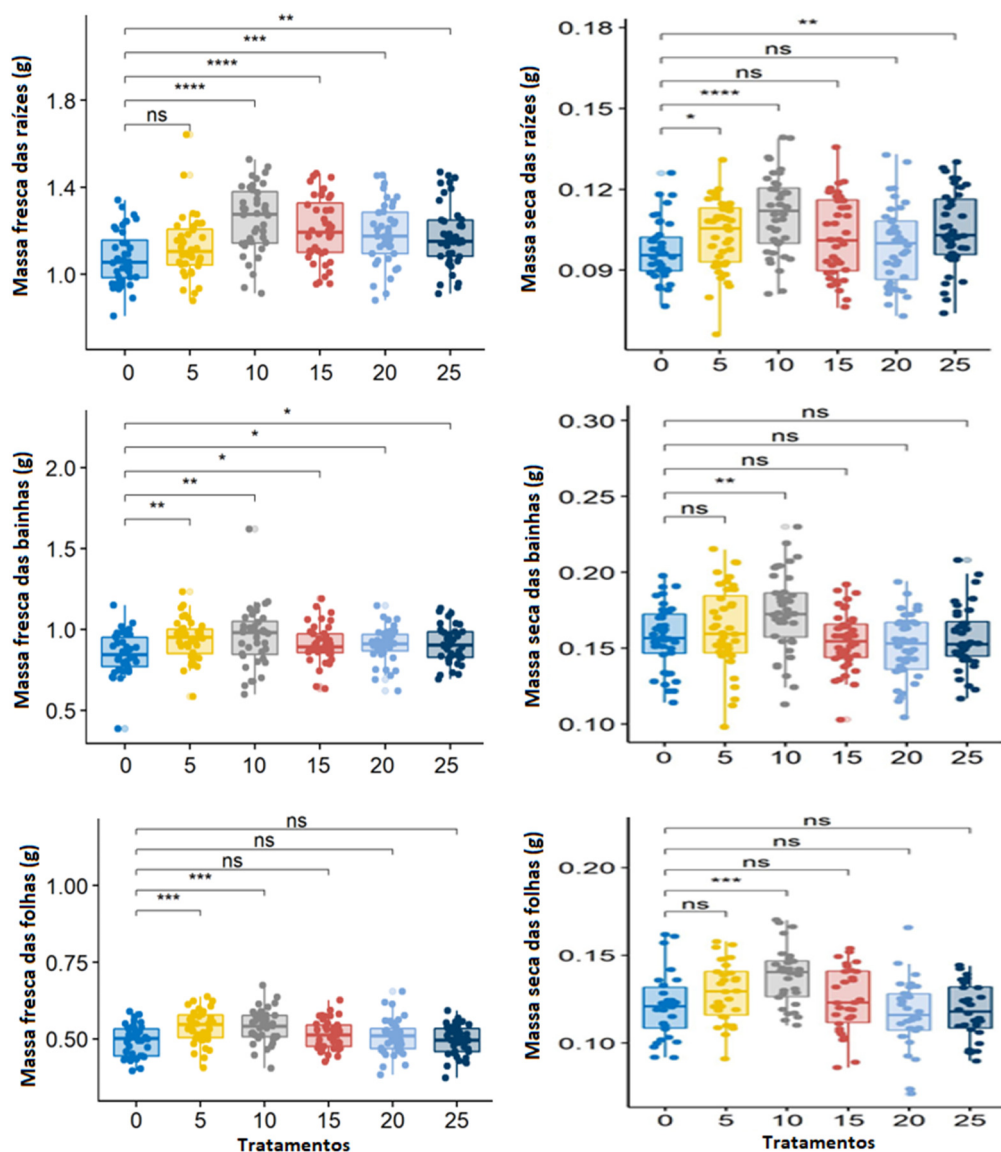


Figura 31. Produção de biomassa fresca e biomassa seca das raízes, bainhas e folhas e de plantas de arroz pela aplicação foliar de K-sap a concentrações de 5%, 10%, 15%, 20% e 25% (m:m).

b) Estímulo da aplicação foliar de K-sap no desenvolvimento de raízes

A morfologia radicular foi regulada nas plantas de arroz pela aplicação foliar de K-sap, onde em geral, concentrações mais elevadas promoveram efeitos prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento (Figura 32). A área das raízes foi estimulada pelas concentrações de 5% e 10%, o aumento foi estatisticamente superior ao controle em até 11%. A aplicação de concentrações a 20% e 25% provocaram diminuição significativa da área radicular em até 10%. Efeitos de inibição da área radicular pela aplicação de concentrações elevadas foram intensos para as classificações das raízes superfina, finas e grossas.

O comprimento total das raízes das plantas foi também prejudicado pela aplicação de elevadas concentrações de K-sap (15%, 20% e 25%) (Figura 32). A inibição significativa do comprimento radicular para os tratamentos de 15%, 20% e 25% foi de 5%, 11% e 8%, respectivamente. As concentrações de 5% e 10% não modificaram o comprimento das raízes, e por tanto não experimentaram diferenças estatísticas com o tratamento controle. Esse resultado foi constante e semelhante nas classes de raízes avaliadas: raízes finas, médias e grossas. Nesta mesma linha, a quantidade de bifurcações radiculares, um parâmetro relacionado com o crescimento radicular, também foi inferior nos tratamentos com K-sap quando comparado com o controle. As bifurcações nas raízes das plantas diminuíram entre 4% e 40% com o aumento da concentração aplicada de K-sap.

Por outro lado, parâmetros como o diâmetro radicular, quantidade de raízes e volume radicular experimentaram estímulos em função da concentração de K-sap aplicadas (Figura 32). O K-sap aplicado via foliar a concentrações de 10%, 15%, 20% e 25% estimularam significativamente o diâmetro das raízes em até 19%. O número de pontas totais foi estatisticamente superior nas plantas tratadas via foliar com 10% de K-sap, tendo seu maior efeito nas raízes classificadas como finas, estatisticamente superior ao controle em até 40% (Figura 32). O número de pontas das raízes classificadas como grossas também foi estatisticamente estimulado pelo K-sap (10%) em até 9% enquanto as raízes superfina foram inibidas concentrações de 15%, 20% e 25% (Figura 32). O volume total das raízes foi estimulado para todas as concentrações de K-sap, especialmente para o tratamento de 10%, resultando em superioridade estatística quando comparado ao controle em até 11%. O volume das raízes classificadas como grossas mostraram um leve aumento quando comparado ao controle também para o tratamento de 10%, embora sem diferenças estatísticas, raízes superfina e finas não mostraram um aumento de seus volumes, quando comparado ao tratamento controle (Figura 32).

Vários estudos atribuíram parte dos efeitos dos extratos de *Kappaphycus* nas plantas à presença de fitohormônios em sua composição (CRAIG, 2011). A seiva de *K. alvarezii* quando aplicada em plantas promove respostas de estímulo às plantas de arroz, batata e milho pela presença e concentrações, respectivamente, de AIA iguais a 27 mg L⁻¹, 23,36 mg L⁻¹, 26,52 mg L⁻¹; a presença de Zeatina igual a 19,65 mg L⁻¹, 31,91 mg L⁻¹; 20,0 mg L⁻¹. As concentrações de GA₃ equivalem a 27,9 mg L⁻¹, 24 mg L⁻¹ e 27,8 mg L⁻¹ (PRAMANICK et al., 2017; PRAMANICK et al., 2020; KUMAR et al., 2020; GARAI et al., 2021). É provável que o estímulo da seiva *Kappaphycus alvarezii* no crescimento das plantas seja devido ao equilíbrio da quantidade de fitohormônios porque outros estudos comprovaram que a eliminação do fitohormônio GA₃ do extrato melhora sua ação no milho (MONDAL et al., 2015). Por outro lado estudos recentes mostraram uma caracterização completa através de perfis metabolômicos onde foram identificados outros compostos responsáveis pela atividade em plantas como cinetina sulfabenzamida 1-fosfatidil-1D-mioinositol dodecanamida, proteínas e lipídios (VAGHELA et al., 2022).

Neste estudo, os compostos fitohormonais do KAlv-sapL não foram identificados e quantificados, mas estudos futuros devem ser desenvolvidos com o objetivo de homogeneizar

a composição dessas substâncias nos extratos de *K. alvarezii* e estabelecer relação com o crescimento das plantas. Do ponto de vista tecnológico, a bioatividade do K_{AIV}-sapL nas plantas observada neste estudo, tanto para aplicação foliar quanto radicular, reafirma o potencial deste extrato para ser utilizado como bioestimulante e/ou biofertilizante. Do ponto de vista acadêmico, este estudo é um passo à frente na compreensão da relação estrutura-função dos extratos de *Kappaphycus*. Até onde sabemos, praticamente não existem estudos que demonstrem os efeitos dos extratos de *Kappaphycus* na morfologia das raízes das plantas. No entanto, alguns estudos relatam efeitos estimulatórios em parâmetros como massa da planta, número de perfilhos por planta e tamanho da espiga (SHAH et al., 2013). David e Mani (2015) também estudaram a aplicação de um extrato aquoso de *Kappaphycus alvarezii* em arroz e observaram efeitos estimuladores na produção de massa seca, tamanho e taxa de crescimento da planta.

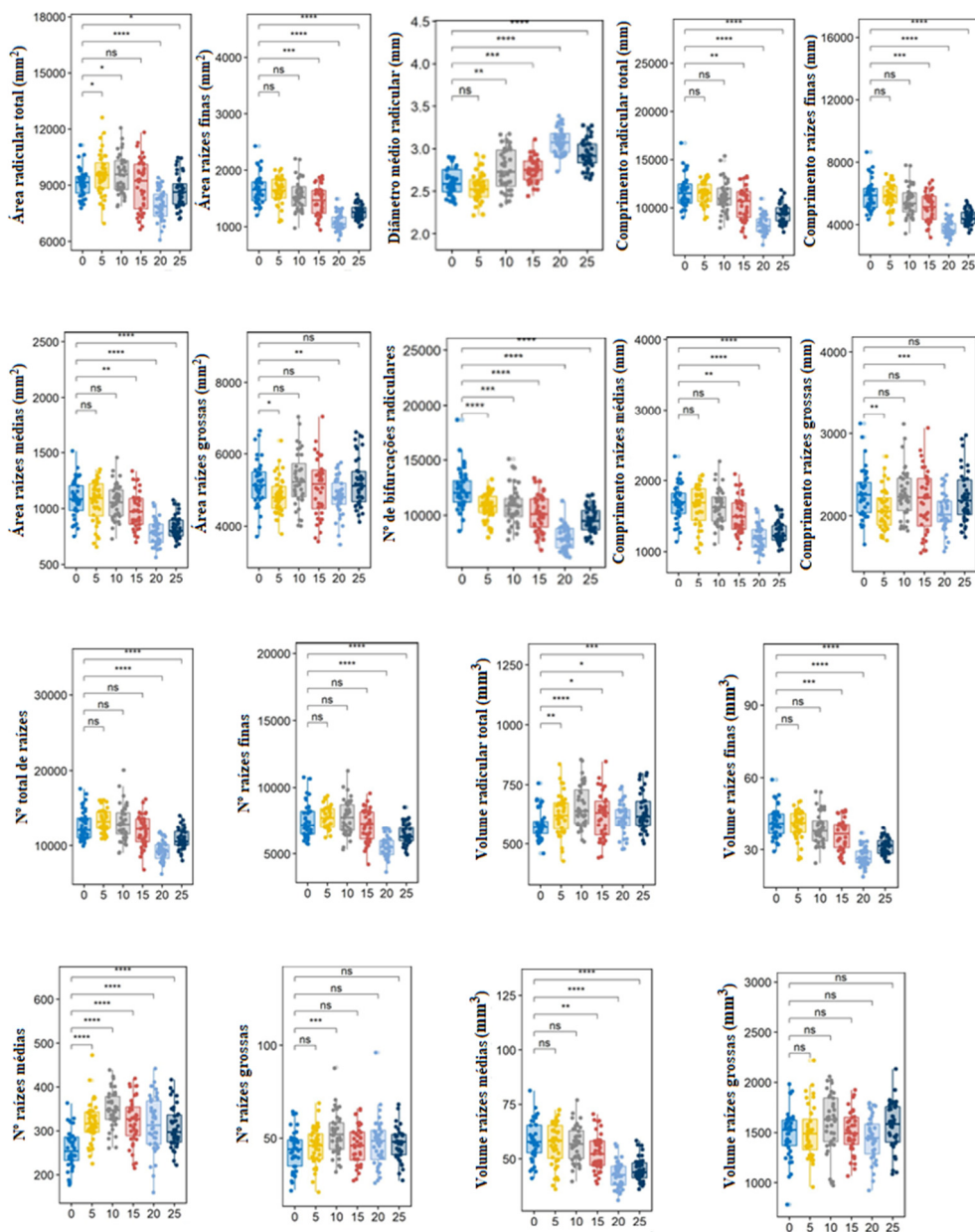


Figura 32. Quantificação dos parâmetros morfológicos das raízes das plantas de arroz tratadas pela aplicação foliar de K-sap a concentrações de 5%, 10%, 15%, 20% e 25% (m:m), n=40.

4.5.4 Experimento 3 – mecanismos envolvidos na bioatividade de K-sap aplicado por diferentes vias e concentrações

a) Efeito das vias de aplicação e doses de K-sap na expressão relativa de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio e resposta a estresse

A Figura 33 mostra a expressão relativa de genes que codificam para isoformas de H⁺-ATPases, transportadores e enzimas de assimilação de nitrogênio e de regulação do sistema oxidativo nas plantas após aplicação dos diferentes tratamentos com K-sap via foliar e radicular. A expressão de duas isoformas de H⁺-ATPases da membrana plasmática de arroz (*OsA2* e *OsA7*), cuja funções envolvem regulação do pH celular, a absorção de nutrientes, o transporte de íons e a adaptação a estresses ambientais (TODA et al., 2016), foi alterada de acordo com os tratamentos. Em raízes, a expressão do gene *OsA2* foi significativamente suprimida pela aplicação dos tratamentos foliares de K_{Alv}-sap em relação ao controle. Nas folhas, apenas a aplicação radicular (2%) aumentou a expressão do gene *OsA2*, embora sem diferença significativa em relação ao controle. As aplicações foliares, independente da concentração suprimiram a expressão do gene (Figura 33A).

O gene que codifica a isoforma *OsA7* não apresentou expressão estatisticamente diferente ao controle nas raízes pela aplicação dos diferentes tratamentos. Por outro lado, nas folhas, a aplicação via radicular de K_{Alv}-sap a 2%, aumentou significativamente a expressão do gene *OsA7* quando comparado com o controle. Os tratamentos de aplicação foliar em ambas as concentrações ocasionaram a supressão da expressão do gene *OsA7*, não diferindo estatisticamente do controle (Figura 33B).

A expressão do gene que codifica para o transportador *OsNRT1.1*, que está relacionado a um transportador de NO₃⁻ de baixa afinidade (PLETT et al., 2010), foi estimulada, embora não significativamente, nas raízes quando aplicado o K_{Alv}-sap via foliar em relação ao controle. A aplicação radicular de K_{Alv}-sap ocasionou supressão significativa da expressão do transportador *OsNRT1.1* em raízes quando comparado ao controle. Nas folhas, a aplicação foliar de K_{Alv}-sap em ambas as concentrações (2% e 10%) aumentou significativamente a expressão de *OsNRT1.1* quando comparado ao controle. Por outro lado, a expressão do gene que codifica para o transportador *OsNRT2.1*, que envolve um transportador de NO₃⁻ de alta afinidade (ZHOU et al., 2000) foi suprimida nas raízes quando aplicado o K_{Alv}-sap, tanto via foliar como radicular (Figura 33C).

A expressão dos genes que codificam para as enzimas do metabolismo de assimilação de N é mostrada na Figura 33E- H. A expressão do gene da glutamina sintetase citosólica *OsGS1.2* mostrou uma superexpressão quando aplicado o K_{Alv}-sap tanto foliar como radicular. Especialmente, o tratamento via radicular a 2% estimulou significativamente a expressão do *OsGS1.2* em até 4 vezes quando comparado ao controle (Figura xE), por outro lado, a expressão dos genes *OsGS2* mostrou supressão tanto para as aplicações foliares quanto radiculares, especialmente para as aplicações foliares, a resposta na diminuição da expressão foi estatisticamente diferente ao controle (Figura xF). Ambos os genes codificam para isoformas de glutamina sintetase, estando envolvidos na assimilação de NH₄⁺ (TABUCHI et al., 2007), porém o *OsGS1.2* é expresso exclusivamente nas raízes enquanto o *OsGS2* é expresso exclusivamente nas folhas. A expressão dos genes *OsNADH-GOGAT* (exclusiva das raízes) e *OsFd-GOGAT* (exclusiva das folhas), que codificam para a enzima Glutamato sintase, responsável pela assimilação de glutamina a glutamato (WANG et al., 2012), mostrou uma supressão em ambos os casos para todos os tratamentos aplicados às plantas (Figura xG e H). A supressão dos genes *OsNADH-GOGAT* não mostrou diferença estatística quando comparado ao controle, enquanto, o gene *OsFd-GOGAT* mostrou supressão com diferença estatística pelos tratamentos aplicados foliarmente, em relação ao controle.

A expressão dos genes de NADPH oxidases *OsNOX1* e *OsNOX9*, responsáveis pela oxidação do NADPH ou NADH e regulação dos níveis de EROs nas plantas (KAUR & PATI, 2016) são mostrados na Figura 33I e 33J. Nas raízes, a expressão dos genes *OsNOX1* sofreu supressão estatisticamente significativa, exceto para K-sapF 10%, quando aplicado o extrato tanto foliar como radicular em relação ao controle. Nas folhas, a aplicação de K_{Alv} -sap via foliar promoveu uma supressão dos genes *OsNOX1*, sendo o efeito da aplicação de K-sapF 2% estatisticamente diferente ao controle, enquanto a aplicação radicular de K_{Alv} -sap aumentou a expressão do gene *OsNOX1*, embora sem diferenças estatísticas quando comparado ao controle (Figura xI). Por outro lado, nas raízes, a expressão dos genes *OsNOX9* foram suprimidos para as aplicações foliares e levemente aumentada para a aplicação radicular de K_{Alv} -sap, embora sem diferenças significativas em relação ao controle. Nas folhas, tanto as aplicações radiculares como as foliares, promoveram aumentos da expressão dos genes *OsNOX9*, havendo aumento significativo pelas aplicações foliares, especialmente a aplicação foliar de K_{Alv} -sap (2%) aumentou significativamente em até cinco vezes a expressão quando comparada ao controle (Figura xJ).

Os resultados obtidos aqui mostram um envolvimento do metabolismo do N na ação de K_{Alv} -sap nas plantas de arroz, principalmente quando aplicados via radicular a 2%. É bem estabelecido na literatura que as isoformas de H^+ -ATPase *OsA2* e *OsA7* são induzidas na presença de $N-NO_3^-$ e, portanto, estão relacionadas com o crescimento das plantas (SPERANDIO et al., 2021). O comportamento de aumento na expressão dos genes *OsNRT1.1* em folhas e a sua relação com a expressão de genes H^+ -ATPase observado neste estudo, foi também comprovado nos estudos de SPERANDIO et al. (2011). A influência da aplicação de K_{Alv} -sap no metabolismo do N se confirma pela expressão nas raízes dos genes *OsGSI.2*, isto porque tais genes são chaves para a assimilação de íons NH_4^+ absorvidos pelas raízes (FUNAYAMA et al., 2013), assim como participa no balanço adequado do metabolismo do N e do C (BAO et al., 2014).

Houve diminuição não significativa da expressão do gene *OsNADH-GOGAT* e, significativa, da expressão do gene *OsFd-GOGAT*, mostrando modificações no ciclo de assimilação do nitrogênio. Apesar da literatura relacionar a expressão de genes NOXs a uma condição fisiológica de estresse nas plantas (CHANG et al., 2016), também tem sido relatado uma relação direta entre as NOXs/RBOHs e as H^+ -ATPases, mostrando um papel importante para o desenvolvimento de raízes laterais (HU et al., 2020; MAJUMDAR & KAR, 2018). Embora neste estudo não houve evidências visuais de danos ao crescimento e desenvolvimento das plantas pelos tratamentos, nas folhas houve aumento da expressão das *OsNOX9* quando tratadas tanto via foliar como radicular, isto porque estas proteínas são responsáveis pela regulação da EROs em condições tanto normais como de estresse nas plantas (WANG et al., 2013).

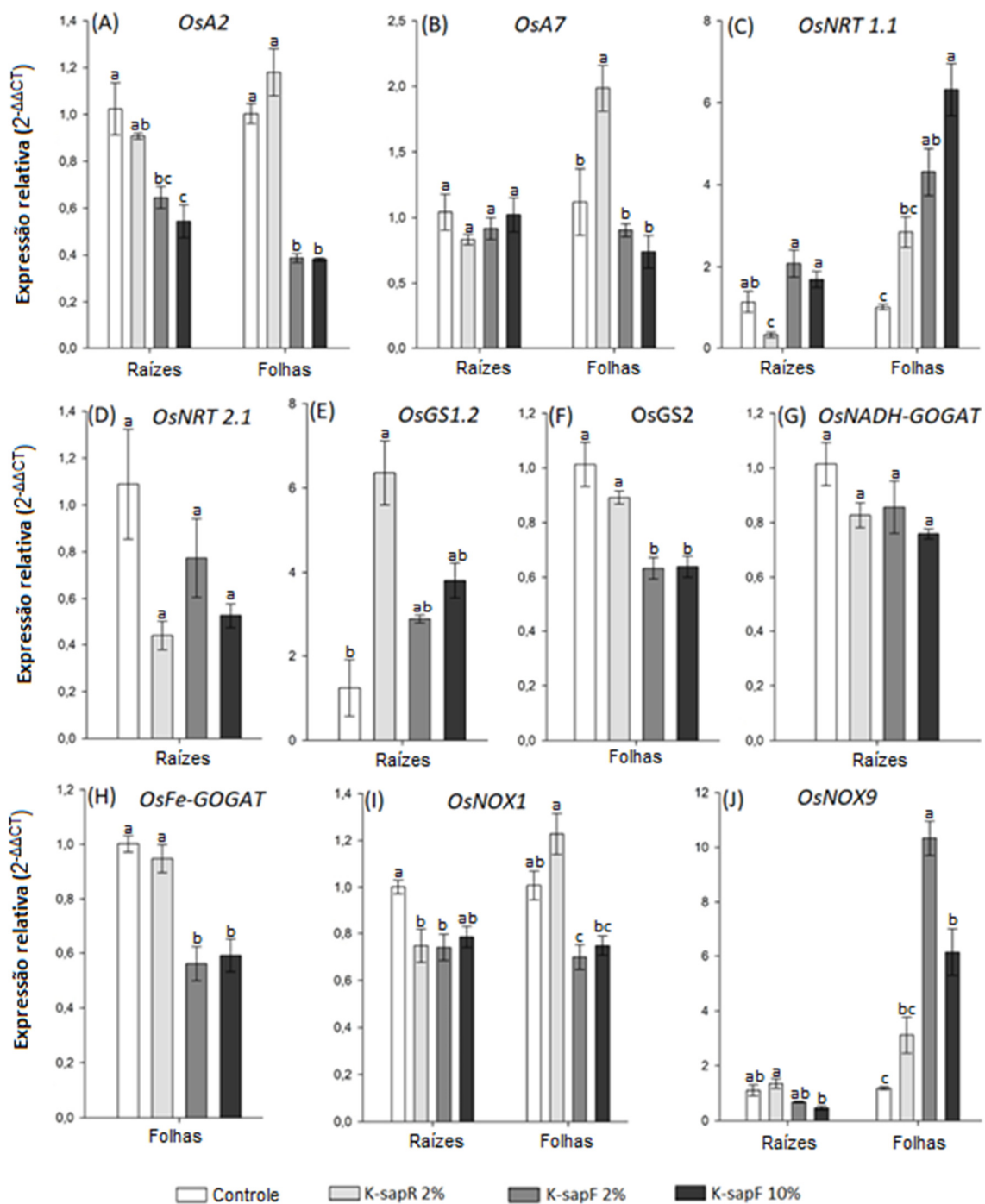


Figura 33. Expressão relativa de genes relacionados a bombas de prótons, metabolismo de nitrogênio e sistema oxidativo em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas sob diferentes condições. Barras com a mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ($p < .05$), $n=4$.

b) Teores de metabólitos solúveis pelo estímulo à aplicação de K-sap (N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, N- amino livre e açúcares solúveis)

A Figure 34 mostra os valores de concentração de N-NO₃⁻, N-NH₄⁺, N-amino livre e açúcares solúveis em raízes, bainhas e folhas. Nas raízes e nas bainhas das plantas, a aplicação radicular de K_{AIV}-sap 2%, promoveu uma redução significativa de N-NO₃⁻ enquanto a aplicação de K_{AIV}-sap via foliar aumentou significativamente a concentração de NO₃⁻. Nas folhas, os

teores de N-NO_3^- não mostraram diferenças estatísticas entre os tratamentos e com relação ao controle (Figura 34A). Por outro lado, o teor de N-NH_4^+ nos tecidos das plantas não mostrou diferenças significativas para os tratamentos de aplicação de $\text{K}_{\text{AlV-sap}}$, tanto foliar como radicular, em nenhum dos órgãos analisados (Figura 34B).

A Figura 34C mostra que a aplicação de $\text{K}_{\text{AlV-sapF 2\%}}$ aumentou significativamente a concentração e N-amino nas raízes em comparação aos demais tratamentos. Na bainha, todos os tratamentos contendo $\text{K}_{\text{AlV-sap}}$ reduziram o teor de N-amino, porém, apenas o tratamento com $\text{K}_{\text{AlV-sapF 2\%}}$ resultou em redução significativa quando comparado ao controle. A concentração de N-amino livre nas folhas foi significativamente superior em plantas tratadas com $\text{K}_{\text{AlV-sapF 2\%}}$, com uma redução não significativa nas plantas sob aplicação de $\text{K}_{\text{AlV-sapF 10\%}}$.

A aplicação de K-sapR 2\% reduziu significativamente o teor de açúcares solúveis nas raízes e aumentou com diferenças significativas o teor de açúcares solúveis na bainha, em comparação ao controle. A aplicação de K-sap via foliar, independente da concentração, não resultou em teores de açúcares solúveis significativamente diferentes ao controle. A aplicação de K-sapF 2\% e K-sapF 10\% diminuiu os teores de açúcares solúveis nas folhas, enquanto o tratamento com K-sapR 2\% não diferiu estatisticamente, em relação ao controle (Figura 34D).

Estes resultados indicam que a aplicação de $\text{K}_{\text{AlV-sap}}$ regula o metabolismo do N nas plantas. Aos 25 dias, as aplicações de $\text{K}_{\text{AlV-sap}}$ estimulam a absorção de N-NO_3^- via transportador *OsNRT1.1*, um transportador de baixa afinidade (FAN et al., 2015). Este resultado é importante porque há relatos sobre o transportador *OsNRT1.1* como centro de processo de sinalização nas plantas, regulador do crescimento radicular e como transportador de auxinas (MAGHIAOUI et al., 2020). A regulação no metabolismo de N ainda se confirma pelo aumento da expressão de *OsGS1.2*, gene que codifica para GS citosólica, envolvida na assimilação primária de NH_4^+ na raiz, e isto coincidiu com o aumento de N-amino formado nos tecidos das raízes e folhas, principalmente para o tratamento de aplicação foliar de 2% (FUNAYAMA et al., 2013).

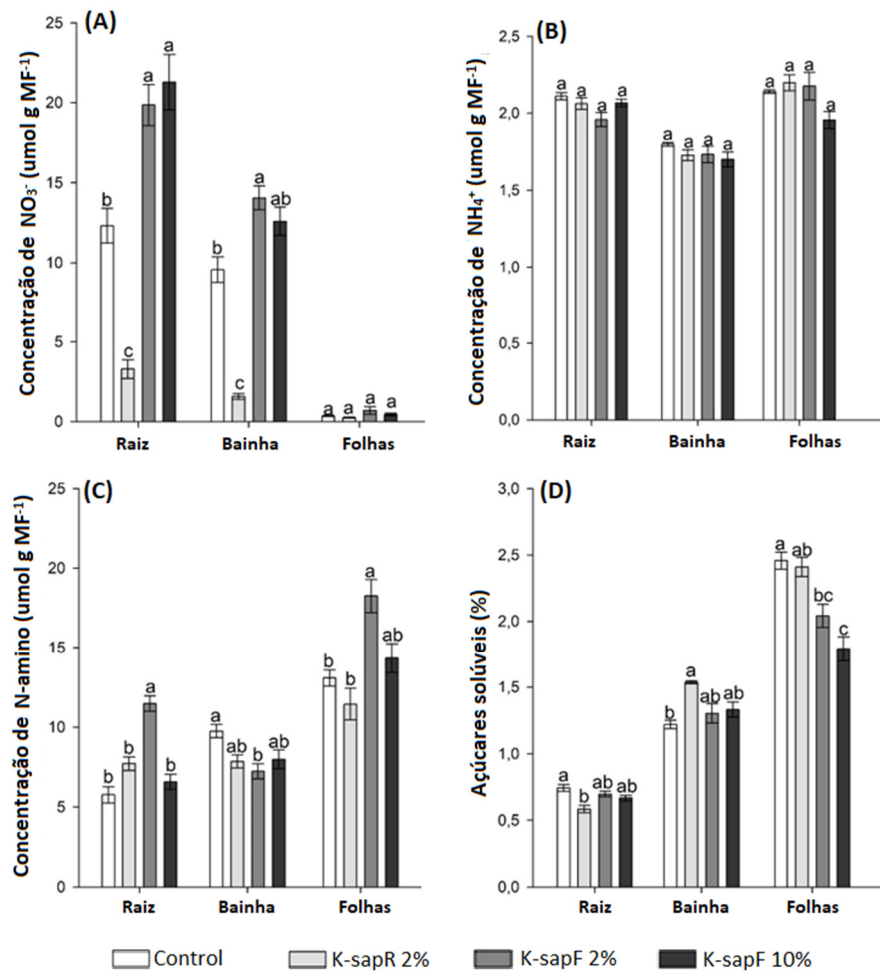


Figura 34. Concentração de N-NO₃⁻ (A), concentração de N-NH₄⁺ (B), concentração de N-amino (C) e concentração de açúcares solúveis (D) em raízes, bainhas e folhas de arroz plantas (*Oryza Sativa* L.) cultivadas em diferentes condições. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05), n=4.

c) Efeito das vias de aplicação e doses de K-sap na expressão relativa de genes envolvidos no transporte de potássio

A expressão de genes que codificam para transportadores de K⁺, em resposta a aplicação de K_{Alv}-sap são mostrados na Figura 35. Tanto nas raízes como nas folhas, o gene *OsAKT1* que codificam para um canal de baixa afinidade envolvido na absorção de K⁺ (AHMAD et al., 2016), teve sua expressão suprimida pela aplicação foliar de K_{Alv}-sap a 10%, quando comparado ao tratamento controle. Nas folhas, o tratamento de aplicação foliar de K_{Alv}-sap a 2%, mostrou um leve aumento da expressão de *OsAKT1*, embora sem diferenças estatísticas em relação ao controle (Figura 35A). O gene *OsAKT2* localizado no floema e envolvido na redistribuição de K⁺ da parte aérea à raiz e na tolerância a salinidade (TIAN et al., 2021), também mostrou respostas à aplicação de K-sap (Figura 35B). Nas raízes, a aplicação foliar de K_{Alv}-sap a 2% aumentou significativamente em até duas vezes a expressão de *OsAKT2* quando comparado ao controle. Contrariamente, nas folhas, o mesmo tratamento K_{Alv}-sap a 2% ocasionou uma supressão da expressão de *OsAKT2* estatisticamente diferente em relação ao controle (Figura 35B).

Tanto nas raízes como nas folhas, a expressão do gene *OsKAT1* não diferiu significativamente ao tratamento controle, porém foi possível observar supressão do gene em

raízes pela aplicação de K-sapR 2% e aumento da expressão em folhas pela aplicação de K-sapF 10% (Figura 35C). OsKAT1 foi caracterizado como um canal do tipo *shaker* de potássio que confere tolerância à salinidade no arroz (OBATA et al., 2007). Por outro lado, nas folhas, a expressão do gene *OsKAT2*, também caracterizado como um canal do tipo *shaker* de potássio (HWANG et al., 2013) foi levemente estimulada pela aplicação radicular K_{AIV}-sap 2%, embora sem diferença estatística em relação ao controle. Contrariamente, as aplicações foliares de K_{AIV}-sap ocasionaram uma diminuição da expressão do gene *OsKAT2* quando comparados ao controle, embora sem diferenças estatísticas (Figura 35D). O transportador de alta afinidade *OsHKT1.1* (IMRAN et al., 2019) foi induzido nas raízes pela aplicação foliar de K_{AIV}-sap a 2%. Nas folhas, os tratamentos de aplicação foliar de K_{AIV}-sap reprimiram significativamente a expressão de *OsHKT1.1* em relação ao controle (Figura 35E). Ao mesmo tempo, a expressão de *OsHAK5*, que codifica para um transportador de alta afinidade de K⁺ envolvido no seu transporte desde as raízes até as folhas (JING et al., 2022), não mostraram respostas claras aos efeitos da aplicação de K_{AIV}-sap em ambos os órgãos (Figura 35F).

A expressão do gene *OsSKOR*, um canal de potássio tipo *shaker* no arroz (KIM et al., 2015) que está envolvido no transporte de K⁺ para o xilema (GAYMARD et al., 1998), foi reprimido em plantas tratadas por aplicação foliar e radicular de K-sap, especialmente a aplicação foliar a 2%, que promoveu uma repressão estatisticamente significativa em comparação ao controle (Figura 35G). Ao mesmo tempo, o gene *OsNHX1*, que codifica para um transportador do tipo antiporte K⁺-Na⁺/H⁺ (FUKUDA et al., 2011), apresentou expressão não significativamente menor nas raízes quando comparado ao tratamento controle. Nas folhas, a expressão de *OsNHX1* foi ligeiramente superior à do tratamento controle em plantas tratadas com aplicação radicular e foliar de 2% e 10% de K-sap, respectivamente, embora as diferenças não tenham sido significativas (Figura 35H). A expressão do transportador antiporte Na⁺/H⁺ da membrana plasmática *OsSOS1* (ZHU et al., 2003) foi reduzida nas raízes após a aplicação de todos os tratamentos em comparação ao controle, enquanto nas folhas a expressão foi mais reprimida pela aplicação foliar de K-sap 2%. Em ambos os casos, não houve diferença significativa em relação ao tratamento controle (Figura 35I).

Os resultados obtidos aqui mostram que a aplicação de K_{AIV}-sap promove estímulos de genes relacionados ao transporte de K⁺, mas também relacionados com a regulação a estresse. É possível que aplicações de K-sap regulem os mecanismos de defesa a estresse salino, uma vez que *OsAKT1* e *OsKAT1* são sensíveis a condições de estresse e o aumento da sua expressão confere tolerância (OBATA et al., 2007). Tal análise pode ser também observada pela elevada expressão de *OsHKT1.1*, um transportador de K⁺ de alta afinidade que também regula entrada de Na⁺ via radicular (IMRAN et al., 2019; CAMBELLE et al., 2017), o que também coincide com a expressão de transportadores de NO₃⁻ observados neste estudo (WANG et al., 2012). Neste momento de avaliação, a regulação dos níveis K⁺/Na⁺ para manutenção da homeostase parece acontecer via regulação transcricional com a participação de *OsAKT*, *OsHAK*, *OsSKOR*, *OsHKT* e *OsSOS*, em linha com o relatado por Li et al. (2020).

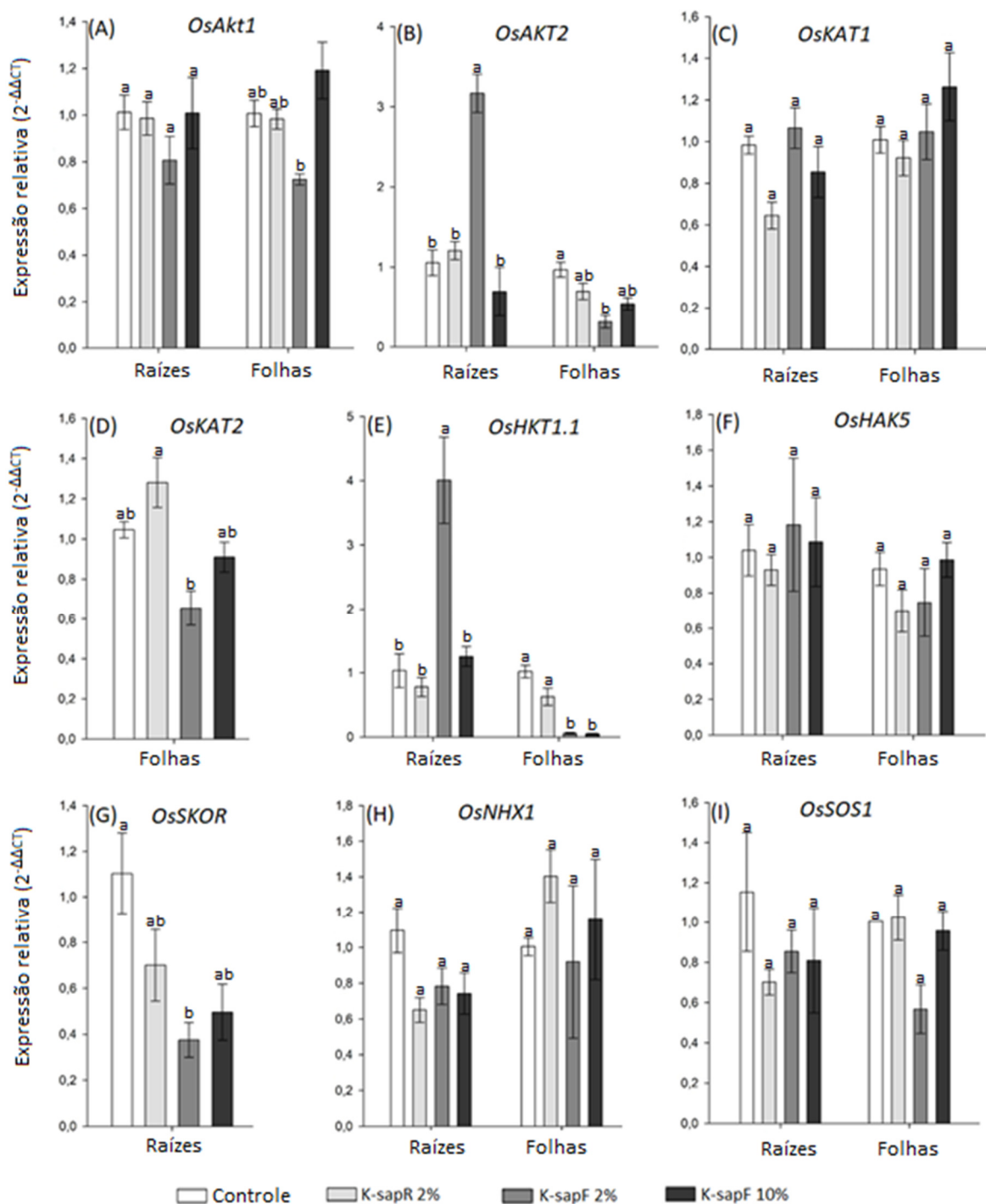


Figura 35. Expressão relativa de genes relacionados a absorção e translocação de potássio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas sob diferentes condições. Barras com a mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ($p < 0.05$), $n=4$.

d) Acúmulo de nitrogênio, fósforo e potássio em plantas devido à via e dose de aplicação K-sap

A Figura 36 mostra os teores de N, P e K nos tecidos das plantas tratadas com K_{Alv} -sap via radicular e foliar. Todos os tratamentos de aplicação com K_{Alv} -sap promoveram uma diminuição de N nas raízes independente da forma e concentração de aplicação. No entanto, as aplicações foliares de K_{Alv} -sap mostraram os menores teores de N nas raízes. Na bainha, o

acúmulo de N foi diferente de acordo com cada tratamento. A aplicação de K_{AIV} -sapR 2% aumentou mais expressivamente o teor de N na bainha, havendo por parte do tratamento K_{AIV} -sapF 2% um leve aumento, e uma redução no tratamento K_{AIV} -sapF 10%. Nas folhas, todos os tratamentos com K_{AIV} -sap aumentaram o teor de N, no entanto, K_{AIV} -sapF 10% promoveu um aumento mais expressivo quando comparado aos outros tratamentos e, com menor intensidade, os tratamentos com K_{AIV} -sapR 2% e K_{AIV} -sapF 2%, quando comparado ao controle (Figura 36A).

O teor de K^+ nas raízes mostrou aumento pela aplicação radicular de K_{AIV} -sap, ao mesmo tempo em que houve uma redução do K^+ quando aplicado o K_{AIV} -sap via foliar. Na bainha, os teores de K^+ foram similares entre os tratamentos, porém foi observada ligeira redução pela aplicação do K_{AIV} -sap, independente da forma de aplicação e da concentração. Nas folhas, as aplicações de K_{AIV} -sap promoveram um aumento do teor de K^+ , levemente menores para as aplicações de K_{AIV} -sap via foliar (Figura 36B).

As concentrações de P nas raízes das plantas foram superiores ao tratamento controle quando aplicados os tratamentos de K_{AIV} -sapR e K_{AIV} -sapF a 2% e 10%, respectivamente, enquanto o tratamento K_{AIV} -sapF 2% promoveu uma leve diminuição do teor de P. Na bainha, todos os tratamentos de K_{AIV} -sap promoveram diminuição do teor de P. Nas folhas, a aplicação de K_{AIV} -sap exerceu um efeito semelhante com o obtido na bainha, promovendo uma redução no teor de P tanto pela aplicação foliar como radicular (Figura 36C).

Os resultados são consistentes com as análises discutidas anteriormente, onde estímulos na expressão de transportadores de N e K pela aplicação de K_{AIV} -sap, promovem aumento de N e K. O aumento de N, P e K nos tecidos das plantas pela aplicação de extratos aquosos de *Kappaphycus alvarezii* obtido aqui está em linha com diferentes estudos na literatura, em um deles foi relatado que a aplicação radicular em plantas de milho promove acúmulo nos tecidos de N, K e P (KUMAR et al., 2019). Nesta linha, os estudos realizados por Pramanick et al., (2020) também relataram que aplicações foliares de extratos aquosos de *Kappaphycus alvarezii* em plantas de arroz são capazes de induzir um balanço positivo na tomada e assimilação de N. Um comportamento semelhante no aumento da eficiência na tomada de N, K e P, foi relatado por Garai et al. (2021), aplicando extratos de *Kappaphycus alvarezii* e *Gracilaria edulis* via foliar em plantas de batata.

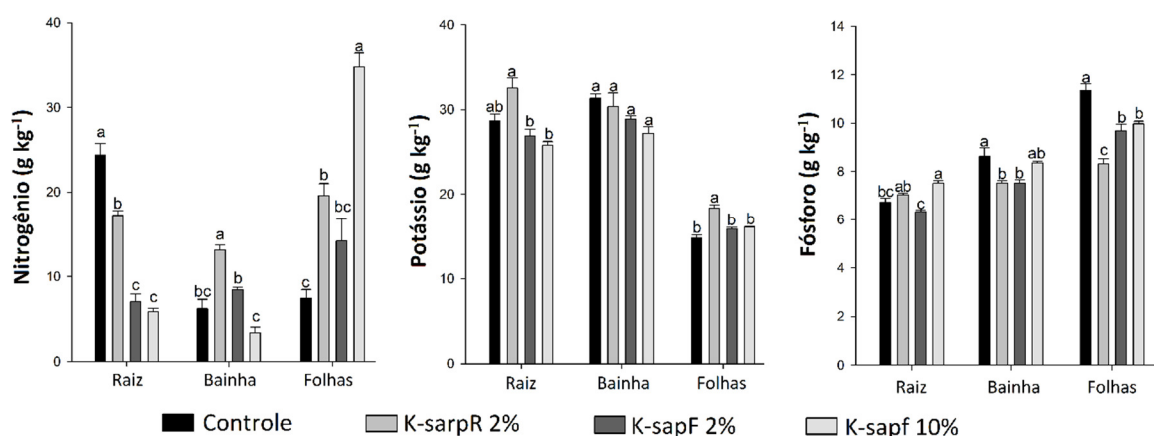


Figura 36. Teor de N, K e P em raízes, bainhas e folhas nas plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com K_{AIV} -sap via radicular e foliar. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=4$.

e) Efeito das diferentes formas e doses de aplicação de K-sap na emissão da fluorescência transiente da clorofila *a*

Os parâmetros fotossintéticos obtidos pela análise Jip-test da fluorescência transiente da clorofila *a* normalizados, usando como referência o controle, das plantas de arroz tratadas com extrato de alga a 2% via radicular ($K_{Alv-sapR}$ 2%), com aplicação foliar a 2% ($K_{Alv-sap}$ 2%) e com aplicação foliar a 10% ($K_{Alv-sapF10}$) são mostrados na Figura 37 e na Tabela 16 (APÊNDICES). Após 24 horas da aplicação dos tratamentos com $K_{Alv-sap}$, ocorreu uma resposta fotossintética inicial de todas as plantas com incremento nos índices de desempenho fotossintético, na conservação de energia de excitação para redução dos aceptores de elétrons do intersistema (PI_{ABS}) e do índice de desempenho na conservação de energia de excitação para redução dos aceptores finais do PSI (fotossistema I) (PI_{TOTAL}), sendo o incremento no desempenho fotossintético mais intenso pela aplicação de $K_{Alv-sapR}$ 2% (Figure 37A).

Após 48 horas, as plantas que receberam aplicação de K-sap, independente da via ou dose, apresentaram redução na conservação de energia de excitação para redução dos aceptores de elétrons do intersistema (PI_{ABS}) em comparação com controle, já o índice de desempenho na conservação de energia de excitação para redução dos aceptores finais do PSI (fotossistema I) (PI_{TOTAL}) não sofreu alterações neste momento (Figure 37B).

Depois de 72 horas a resposta fotossintética das plantas retornaram à normalidade, sendo observada estabilidade na etapa fotoquímica da fotossíntese quando comparados os índices de desempenho fotossintético entre os tratamentos (Figure 37C). Apenas as 96 horas após aplicação dos tratamentos, as plantas que receberam $K_{Alv-sap}$ apresentaram novamente aumento da taxa fotossintética, com incremento ainda mais expressivo do PI_{ABS} e do PI_{TOTAL} do que o observado após 24 horas, sendo novamente o incremento do desempenho fotossintético mais intenso nas plantas tratadas com $K_{Alv-sapR}$ 2%. Além disso, o tratamento com $K_{Alv-sapR}$ 2% apresentou um incremento expressivo no parâmetro de rendimento ϕRo (rendimento quântico de transporte de elétrons da QA^- para oceptor final de elétrons do FSI), no respectivo parâmetro de eficiência de redução um éxciton capturado no RC (centro de reação) (δRo) e um aumento na redução dos aceptores finais de elétrons do FSI (RE_0/RC), sendo consistente com o aumento da performance fotossintética das plantas que receberam este tratamento (Figura 37D).

Após 120 horas do início da aplicação dos tratamentos, novamente o desempenho fotossintético se mostra estável entre os tratamentos, não havendo diferenças em comparação com o controle (Figure 37E). O melhor desempenho fotossintético das plantas que receberam o tratamento $K_{Alv-sapR}$ 2% é confirmado após 144 horas, com um incremento ainda mais expressivo do PI_{ABS} e do PI_{TOTAL} e redução da perda de energia na forma de calor (DIo/RC) e do tamanho aparente do sistema antena (ABS/RC). Nesse último momento de avaliação observa-se que o tratamento que apresentou menor desempenho fotossintético (PI_{ABS} e PI_{TOTAL}) foi o $K_{Alv-sapF}$ 10% (Figura 37F).

Os estímulos no desempenho fotossintético ao longo de seis dias após início de aplicação do $K_{Alv-sap}$, por diferentes vias e concentrações, ocorreram de maneira diferenciada. Foram observadas respostas logo após 24 horas da aplicação dos extratos de alga, principalmente via radicular, já nos dias seguintes houve manutenção do desempenho fotossintético, havendo estabilidade do sistema. Após 96 horas, as plantas tratadas com $K_{Alv-sap}$ apresentaram novamente aumento da taxa fotossintética, seguida mais uma vez por estabilidade da taxa fotossintética. Por fim, após 144 horas de início da aplicação dos tratamentos, o tratamento com $K_{Alv-sapR}$ 2% resultou em plantas com o maior desempenho fotossintético, enquanto plantas tratadas com $K_{Alv-sapF}$ 2% mostraram fotossíntese semelhante ao controle, já o tratamento com $K_{Alv-sapF}$ 10% resultou em plantas com menor desempenho fotossintético.

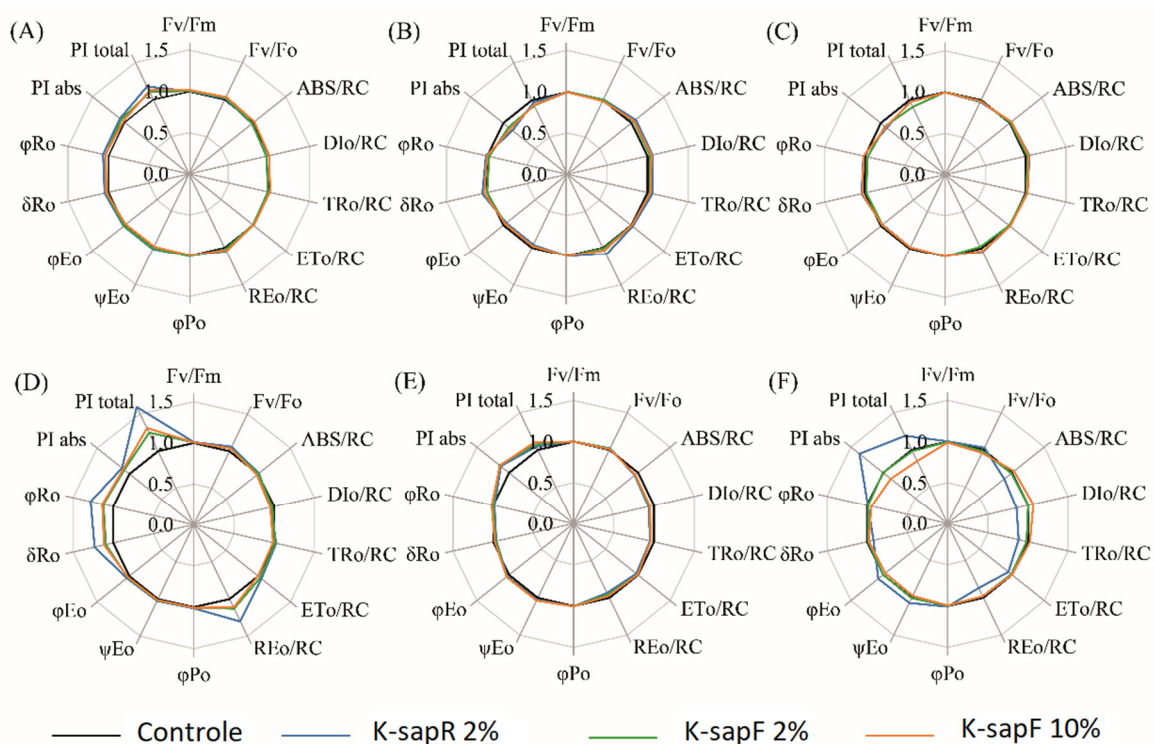


Figura 37. Parâmetros fotossintéticos de plantas de arroz cultivadas em diferentes condições deduzidos pela análise do teste JIP de transientes de fluorescência normalizados usando o controle como referência. Índice de desempenho fotossintético (PIABS), índice de desempenho fotossintético total (PI TOTAL), rendimento quântico máximo da fotoquímica primária (ϕP_0), rendimento quântico do transporte de elétrons de Q (ϕR_0), rendimento quântico do transporte de elétrons (ϕE_0), eficiência com a qual um elétron pode mover o intersistema de aceptores de elétrons reduzidos em o intersistema para o acceptor final de elétrons FSI (δR_v), eficiência com a qual um éxciton capturado no centro de reação (RC) pode mover um elétron de QA – para o intersistema de aceptores de elétrons (OE0), redução do acceptor final de elétrons no elétron FSI lado do acceptor por RC (RE0/RC), fluxo de transporte de elétrons por RC (ET0/RC), fluxo de energia dissipada por RC (DI0/RC), fluxo de absorção por RC (ABS/RC), fluxo de energia aprisionada por RC (TR0/RC), complexo de evolução de oxigênio (OEC). (A) 24 horas; (B) 48 horas; (C) 72 horas; (D) 96 horas; (E) 120 horas; (F) 144 horas. n=11.

Na Figura 38 são apresentados os gráficos de análise de fluorescência da clorofila *a* normalizada como curva de fluorescência variável relativa OJIP (os pontos $O_{50\mu s}$, J_{2ms} , I_{30ms} , e P_{1s} estão marcadas no gráfico) (Wt) (Figuras 38A, 38D, 38G, 38J, 38M e 38P), os gráficos de fluorescência variável relativa normalizados entre os pontos $O_{50\mu s}$ e I_{30ms} (W_{OI}) (Figuras XB, XE, XH, XK, XN e XQ), e os gráficos de fluorescência variável relativa normalizados entre os pontos I_{30ms} e P_{1s} (W_{IP}) (Figuras 38C, 38F, 38I, 38L, 38O e 38R). Observa-se na Figura XJ, associado ao incremento do desempenho fotossintético 96 hrs após a aplicação do tratamento K-sapR 2%, uma redução da emissão de fluorescência pelas plantas que receberam esse tratamento. Os gráficos W_{IP} demonstram a sequência de eventos de transferência de elétrons a partir do PSI (começando em PQH₂) para os aceptores finais desse fotossistema da planta.

A Figura 50 (APÊNDICES) demonstra que as plantas que receberam o tratamento K-sapR 2% apresentaram um aumento na sequência de eventos da transferência de elétrons conduzida pelo PSI para os aceptores de elétrons finais no lado do acceptor do PSI, começando em PQH₂ (plastoquinol) (W_{IP}) (W_{IP}). As avaliações de cinética não demonstraram a presença

de bandas-L (ΔW_{OK}) (Figura 50, APÊNDICES). A ausência de banda-L positiva sugere a estabilidade do sistema com a manutenção da conectividade energética e um consumo eficiente da energia de excitação (SOUZA et al., 2020). Variações nas bandas-K (ΔW_{OJ}) estão associados ao desacoplamento do complexo de evolução do oxigênio (CEO) (DABROWSKI et al., 2016). Entretanto, não foram observadas a presença de banda K positiva, apenas banda-K negativa 144 hrs após aplicação de K-sapR 2% (Figura 50, APÊNDICES), sugerindo que não houve permeabilidade do CEO à elétrons não provenientes de moléculas de água (SOUZA et al., 2020).

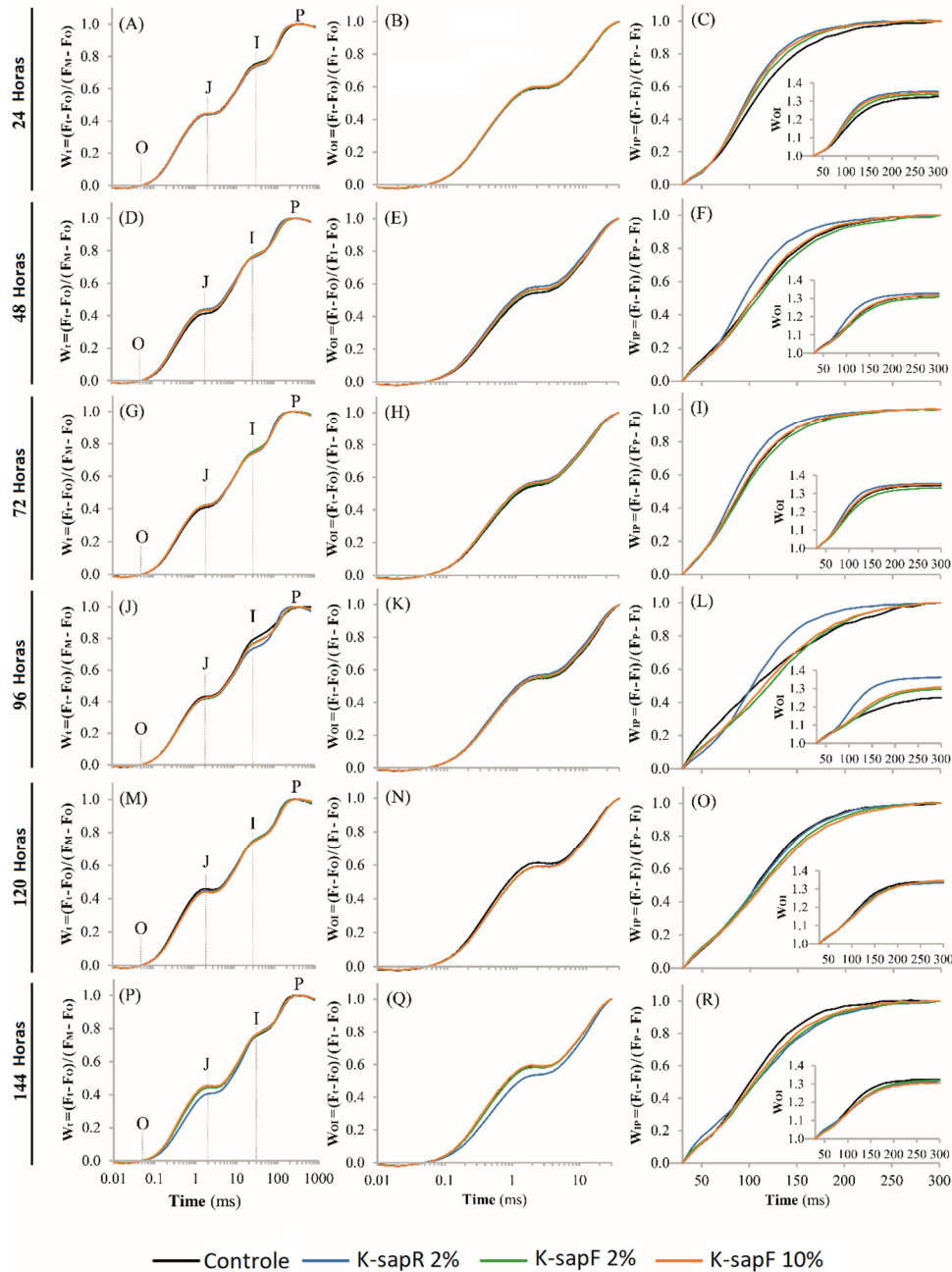


Figure 38. Fluorescência transiente da clorofila *a* de folhas de plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) adaptadas ao escuro, cultivadas em diferentes condições. Fluorescência relativa variável entre as etapas O e P (W_t ; A, D, G, J, M, P) em tempo logarítmico; Fluorescência relativa variável entre os passos O e I (W_{OI} ; B, E, H, K, N, Q) em tempo logarítmico; Fluorescência relativa variável entre as etapas I e P (W_{IP} ; C, F, I, L, O, R) e W_{OI} na inserção. $n=11$.

f) Estímulos na morfologia radicular pela aplicação de K-sap por diferentes vias

A aplicação de K-sap via radicular e foliar em diferentes concentrações modificou a morfologia radicular de plantas de arroz (Figura 39). A área radicular não sofreu alterações significativas pela aplicação de K-sap, no entanto, foi possível observar aumento da área pela aplicação de K-sapF 2% e redução pela aplicação de K-sapF 10%, quando comparados ao controle (Figura 39A). A aplicação de K-sapR 2% resultou em aumento significativo do volume radicular em relação ao controle. Plantas submetidas à K-sapF 2% também apresentaram estímulo no volume de raízes, porém sem diferir estatisticamente de plantas controle. As raízes de plantas tratadas com K-sapF 10% mostraram uma redução no volume radicular, porém, sem diferenças estatísticas (Figura 39B).

A Figura 39C mostra que o comprimento radicular foi estimulado por todos os tratamentos com K-sap, no entanto, a aplicação de K-sapF 2% foi o único que resultou em alongamento radicular significativo em relação ao controle. Por outro lado, o diâmetro médio das raízes aumentou significativamente em plantas tratadas com K-sapR 2%, já os tratamentos com K-sap aplicados via foliar resultaram em redução do diâmetro médio, sem diferenças estatísticas quando comparado ao controle (Figura 39D).

O número de bifurcações nas raízes aumentou significativamente quando comparado ao controle, em plantas tratadas com K-sapF 2%. Os tratamentos com K-sapR 2% e K-sapF 10% resultaram em aumento do número de bifurcações radiculares, porém, sem diferenças significativas em relação ao controle (Figura 39E). A Figura 39F mostra que a quantidade total de raízes foi estimulada de maneira semelhante por todos os tratamentos com K-sap, uma vez que todos resultaram em número de raízes significativamente superior ao de plantas controle.

As Figuras 39G-I mostram que o número de raízes de acordo com classes de diâmetro (finas, médias e grossas) foi diferente para cada tratamento aplicado de K-sap. A quantidade de raízes finas aumentou significativamente em todas as plantas tratadas com K-sap, independentemente da forma e concentração de aplicação. A quantidade de raízes médias aumentou significativamente em plantas tratadas com K-sapR 2% e K-sapF 10%, em relação ao controle. Por outro lado, a aplicação de K-sapF 2% não resultou em diferenças estatísticas com os demais tratamentos. A quantidade de raízes grossas não foi modificada em nível estatisticamente significativo quando comparado ao controle. Os estímulos diferenciados na quantidade de raízes finas, médias e grossas justificam as diferenças observadas nos valores de diâmetro radicular médio, sendo os maiores diâmetros observados em raízes tratadas com K-sapR 2%, justificado pela maior quantidade de raízes médias e grossas quando comparado aos demais tratamentos, e os menores diâmetros observados em raízes tratadas com K-sapF 2%, justificado pela menor quantidade de raízes grossas dentre todos os tratamentos.

Não são muitos os estudos onde se demostrem os efeitos das aplicações de K-sap na morfologia das plantas. Em estudos prévios foi demonstrado que as aplicações foliares e radiculares de K-sap exercem efeitos de estímulo nos diferentes parâmetros morfológicos das plantas de arroz, porém, tais efeitos são dependentes das concentrações aplicadas (CASTRO et al., 2023). Outros estudos mostraram modificar a morfologia radicular das plantas de arroz e milho quando aplicado o K-sap via foliar (DAVI & MANI 2015; SHAH ET AL., 2013).

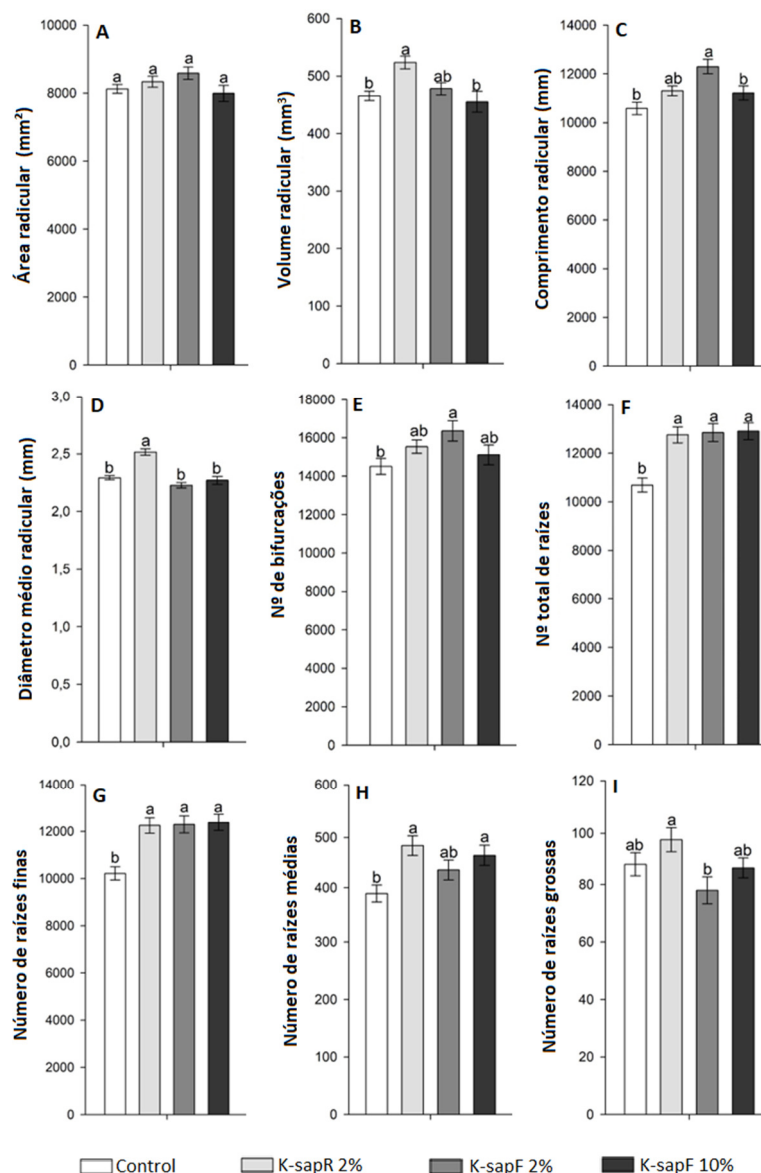


Figura 39. Parâmetros radiculares modificados em plantas de arroz pela aplicação foliar (2% e 10%) e radicular (2%) de K-sap. Área (A), volume (B), comprimento (C), diâmetro (D), bifurcações (E), quantidade total de raízes (F), quantidade de raízes finas (G), quantidade de raízes médias (H) e quantidade de raízes grossas (I). Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=20$.

g) Produção de biomassa fresca e seca, número de folhas e alturas das plantas por efeito da aplicação de K-sap por diferentes vias

O acúmulo de biomassa fresca e seca em plantas de arroz foi alterado pela aplicação foliar e radicular de K-sap. As Figuras 40A e 40B mostram que a aplicação de K-sapF 2% resultou nos maiores valores de massa fresca e seca de raízes, bainhas e folhas, quando comparado com os demais tratamentos e ao controle. A produção de massa fresca na raiz foi significativamente superior ao controle em plantas tratadas com K-sapF 2% e K-sapR 2%, não diferindo estatisticamente entre estes dois tratamentos. A aplicação de K-sapF 10% não resultou em valor de massa fresca radicular significativamente superior ao controle. A massa fresca da bainha não diferiu significativamente entre os tratamentos. Nas folhas, os tratamentos contendo K-sapF 2% e K-sapF 10%, promoveram valores de massa fresca superiores ao controle. A

aplicação de K-sapR 2% não estimulou significativamente a massa fresca em folhas (Figuras 40A). A massa seca radicular e da bainha tiveram aumento significativo, em comparação ao controle, apenas no tratamento com K-sapF 2%. Os demais tratamentos contendo K-sap também estimularam o acúmulo de massa seca em raízes e bainhas, porém sem diferir estatisticamente das plantas controle. A massa seca foliar foi significativamente superior ao controle em plantas tratadas com K-sapF 2% e K-sapF 10%, enquanto o tratamento com K-sapR 2% não resultou em aumento significativo de massa seca das folhas em relação ao controle (Figura 40B).

A Figura 40C mostra o efeito dos diferentes tratamentos sobre a altura das plantas. Todas as aplicações de K-sap estimularam significativamente a altura das plantas quando comparado ao controle. A aplicação de K-sapF 2% promoveu o maior estímulo da altura da planta, enquanto a aplicação de K-sapR-2% exerceu um estímulo inferior. Neste sentido, parece haver uma coerência entre os resultados obtidos para a altura das plantas e a produção de massa fresca e seca nos diferentes tratamentos de K-sap, isto porque quanto maior o acúmulo de massa estimulado pela aplicação do extrato líquido, maior foi a altura das plantas. A aplicação de K-sap também mostrou um efeito estimulador na quantidade de folhas por planta (Figura 40D). A aplicação de K-sapF 2% e K-sapF 10%, resultou em número de folhas por planta significativamente superior ao controle, sem diferenças estatísticas entre os tratamentos. A aplicação de K-sapR 2% mostrou um leve aumento, porém sem diferenças significativas quando comparado ao controle.

É bem conhecido na literatura o papel do K⁺ na melhoria das funções metabólicas e fisiológicas das plantas para seu crescimento, desenvolvimento e defesa a estresse (SARDANS & PEÑUELAS, 2021). Ao mesmo tempo, há relatos que mostram que um adequado balanço entre N e K⁺ na nutrição vegetal promove uma melhoria do vigor das plantas e um aumento da capacidade para assimilar outros nutrientes (GUO et al., 2019). O aumento na absorção de K⁺ e N pela aplicação K-sap obtida neste estudo está em linha com outros estudos na literatura. Um aumento no acúmulo de K e N de até 5% e 7%, respectivamente, foi obtido pela aplicação foliar de extratos de *Kappaphycus alvarezii* (K-sap) em plantas de trigo (SHAH et al., 2013). Um comportamento semelhante foi obtido quando aplicado K-sap via foliar a plantas de milho, promovendo aumento dos rendimentos devido às melhorias na absorção de nutrientes (BASAVARAJA et al., 2018).

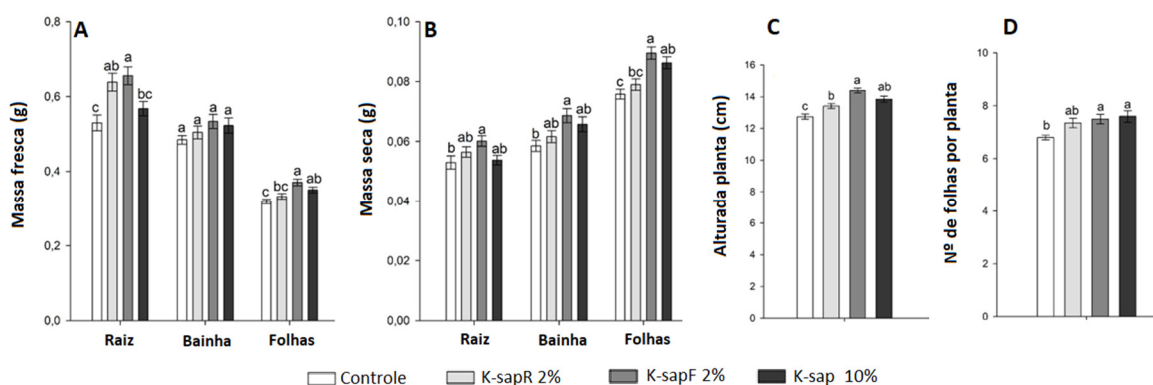


Figura 40. Produção de biomassa fresca (A) e seca (B), altura das plantas (C) e número de folhas por planta (D) de arroz pela aplicação foliar (2% e 10%) e radicular (2%) de K-sap. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 20$.

4.6 CONCLUSÕES

A liofilização do extrato aquoso extraído da alga *Kappaphycus alvarezii* constituiu uma alternativa eficiente para a obtenção de bioestimulante capaz de aumentar o crescimento e desenvolvimento de plantas sem a necessidade de conservantes químicos. O extrato aquoso liofilizado (K-sapL) obtido neste estudo preservou fragmentos orgânicos ricos em lipídeos, proteínas e *k*-carragena além de uma composição de macro e micronutrientes rica em Ca, Mg, K e P e uma baixa relação C:N. A composição organo-mineral em K-sapL o torna um material com capacidade para exercer efeitos de estímulo nas plantas. O extrato K-sap pode ser utilizado como um bioestimulante de aplicação via foliar e radicular, produzindo maior biomassa seca em raízes, bainhas e folhas e maior desenvolvimento radicular.

As aplicações radiculares de K_{Alv}-sap estimulam o crescimento de plantas de arroz em momentos mais tardios quando comparado com as aplicações foliares. A utilização do K-sap (2%-3%) via radicular garantiu uma alocação de elevada quantidade K para o interior das plantas. Melhorias na eficiência da nutrição K promovido pela utilização de K-sap significa uma alternativa para a fertilização potássica de origem extrativista. A implementação de um biofertilizante com origem na algicultura permitirá a inserção das atividades da bioeconomia na cadeia produtiva agrícola, fortalecendo a produção limpa de insumos para a agricultura.

O modo de ação do extrato aquoso de *Kappaphycus alvarezii* (K-sap) que promove estímulos no crescimento e desenvolvimento das plantas de arroz, ocorre mediante a regulação da expressão de genes relacionados ao transporte de N, K e de resposta adaptativa a estresse na fase inicial de crescimento de plantas de arroz. Aplicações radiculares de K-sap promovem melhorias na nutrição das plantas, aumentando a quantidade de K e N, principalmente em folhas, momento em que ainda há genes expressos envolvidos no transporte e assimilação de N, assim como uma intensa melhoria da eficiência fotossintética. Melhores condições nutricionais e fotossintéticas induziram aumentos na produção de biomassa, plantas de maior altura e com maior quantidade de raízes. Contrariamente, as aplicações foliares promovem menor acúmulo de N e K, principalmente em raízes e bainhas, embora neste momento, os transportadores de N e K estejam sendo estimulados, levando a aumento de N-NO₃⁻ e N-amino. Mesmo com uma melhoria menos expressiva na eficiência fotossintética, a aplicação foliar a 2% induz o crescimento das plantas, aumento da produção de biomassa, do crescimento e desenvolvimento radicular.

5. CAPÍTULO III

POTENCIALIDADES E EFEITOS DA APLICAÇÃO FOLIAR DE BIOESTIMULANTE MISTO DE ÁCIDO FÚLVICO E K-SAP SOBRE A REGULAÇÃO METABÓLICA, DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO VEGETAL

5.1 RESUMO

O setor agrícola enfrenta um desafio duplo: a necessidade de aumentar a eficiência para sustentar a crescente população global e, ao mesmo tempo, aprimorar a gestão de recursos, reduzindo o impacto ambiental nos ecossistemas e na saúde humana. Uma abordagem inovadora e ecologicamente sustentável envolve a utilização de bioestimulantes naturais, que promovem o crescimento e a produtividade das plantas. Os bioestimulantes atuam de diversas maneiras, podendo ter efeitos gerais ou específicos. A eficácia de um bioestimulante, em geral, resulta da interação de diferentes substâncias ativas presentes em sua composição. Vale ressaltar que, embora os efeitos dos bioestimulantes nas raízes sejam amplamente estudados, os mecanismos de promoção das partes aéreas das plantas são menos explorados. Bioestimulantes à base de extratos de algas marinhas e substâncias húmicas são amplamente empregados para melhorar a produção agrícola. No entanto, na literatura, não foram encontrados estudos sobre bioestimulantes que combinem ácidos fúlvicos e extratos de *Kappaphycus alvarezii*. Portanto, o objetivo deste capítulo consistiu em avaliar e comparar os estímulos desencadeados pela aplicação foliar isolada e conjunta de ácido fúlvico de vermicomposto e extrato de *Kappaphycus alvarezii* em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade *nippombare*. O estudo abordou a regulação gênica, o metabolismo, a absorção de nutrientes, a fotossíntese, o desenvolvimento do sistema radicular e o crescimento, visando desenvolver um bioestimulante foliar misto com potencial de aplicação na agricultura. A aplicação de todos os bioestimulantes resultou em plantas com um desenvolvimento mais robusto, porém, a pulverização foliar do bioestimulante misto composto por AFVC + K-sap demonstrou estimular o crescimento e a produção vegetal de forma mais acentuada. O aumento da produção de biomassa vegetal foi atribuído aos efeitos observados na melhoria do desempenho fotossintético, na regulação gênica, na absorção de nutrientes, no metabolismo de nitrogênio e carbono, bem como no desenvolvimento do sistema radicular. Os estímulos iniciais na etapa fotoquímica da fotossíntese e as regulações fisiológicas diferiram com base no bioestimulante aplicado. A aplicação de K-sap resultou em plantas com um maior acúmulo de biomassa foliar, enquanto a aplicação de AFVC promoveu um maior acúmulo de biomassa nas raízes, quando comparadas individualmente. Por outro lado, a aplicação conjunta de AFVC + K-sap resultou em plantas com a maior produção de biomassa tanto nas raízes quanto na parte aérea, superando os outros tratamentos. O modo de ação desencadeado pelos bioestimulantes quando aplicados foliarmente parece ser distinto daquele normalmente relatado na literatura em relação às aplicações radiculares, o que ressalta a necessidade de investigações adicionais. A pulverização foliar dos bioestimulantes, como AFVC, K-sap e AFVC + K-sap, demonstrou um grande potencial como agentes de estímulo vegetal, promovendo tanto o crescimento radicular quanto da parte aérea. Além disso, essa abordagem pode ser mais econômica do que a aplicação no solo e aumentar a eficiência na absorção e assimilação de nutrientes, possivelmente resultando em uma redução do consumo de fertilizantes ao longo do ciclo da cultura.

Palavras-chave: Substâncias húmicas. *Kappaphycus alvarezii*. Pulverização foliar. Bioatividade.

5.2 ABSTRACT

The agricultural sector faces a dual challenge: the need to increase efficiency to support the growing global population while at the same time improving resource management, reducing the environmental impact on ecosystems and human health. An innovative and ecologically sustainable approach involves the use of natural biostimulants, which promote plant growth and productivity. Biostimulants act in different ways and can have general or specific effects. The effectiveness of a biostimulant, in general, results from the interaction of different active substances present in its composition. It is worth mentioning that, although the effects of biostimulants on roots are widely studied, the promotion mechanisms in the aerial parts of plants are less explored. Biostimulants based on seaweed extracts and humic substances are widely used to improve agricultural production. However, in the literature, no studies were found on biostimulants that combine fulvic acids and *Kappaphycus alvarezii* extracts. Therefore, the objective of this chapter was to evaluate and compare the stimuli triggered by the isolated and combined foliar application of vermicompost fulvic acid and *Kappaphycus alvarezii* extract on rice plants (*Oryza sativa* L.) of the *nippombare* variety. The study addressed gene regulation, metabolism, nutrient absorption, photosynthesis, root system development and growth, aiming to develop a mixed foliar biostimulant with potential for application in agriculture. The application of all biostimulants resulted in plants with a more robust development, however, the foliar spraying of the mixed biostimulant composed of AFVC + K-sap demonstrated to stimulate plant growth and production more markedly. The increase in plant biomass production was attributed to the effects observed in improving photosynthetic performance, gene regulation, nutrient absorption, nitrogen and carbon metabolism, as well as root system development. The initial stimuli in the photochemical step of photosynthesis and physiological regulations differed based on the biostimulant applied. The application of K-sap resulted in plants with a greater accumulation of leaf biomass, while the application of AFVC promoted a greater accumulation of biomass in the roots, when compared individually. On the other hand, the joint application of AFVC + K-sap resulted in plants with the highest biomass production in both roots and shoots, surpassing the other treatments. The mode of action triggered by biostimulants when applied foliarly appears to be different from that normally reported in the literature in relation to root applications, which highlights the need for additional investigations. Foliar spraying of biostimulants, such as AFVC, K-sap and AFVC + K-sap, demonstrated great potential as plant stimulation agents, promoting both root and shoot growth. Furthermore, this approach can be more economical than soil application and increase efficiency in nutrient absorption and assimilation, possibly resulting in a reduction in fertilizer consumption throughout the crop cycle.

Key words: Humic substances. *Kappaphycus alvarezii*. Foliar spray. Bioactivity.

5.3 INTRODUÇÃO

O setor agrícola encara simultaneamente o desafio de ampliar a eficiência para sustentar a crescente população global e aprimorar o uso de recursos, enquanto diminui o impacto ambiental em ecossistemas e na saúde humana (ROUPHAEL & COLLA, 2020). Alguns dos principais motivos que contribuíram para a diminuição dos rendimentos das colheitas na agricultura estão principalmente associados à pressão biótica, como enfermidades fungicidas e bacterianas, e à restrição no uso de fertilizantes químicos e pesticidas (PONISIO et al. 2015; PARADIKOVIC et al. 2019). Uma inovação promissora e ecologicamente amigável envolve a aplicação de bioestimulantes naturais, que aprimoram o crescimento e a produtividade das plantas (COLLA E ROUPHAEL; 2015).

A composição dos bioestimulantes permanece parcialmente desconhecida devido à complexidade dos extratos e à ampla variedade de moléculas presentes na solução, o que torna desafiador compreender quais são os compostos mais ativos, sendo que os mecanismos desencadeados pelos bioestimulantes ainda estão sob investigação (ERTANI ET AL., 2011; GUINAN et al., 2013). Preferencialmente, a classificação dos bioestimulantes deve ser baseada nas respostas fisiológicas das plantas, em vez de sua composição (ERTANI et al., 2013).

O mercado de bioestimulantes está experimentando um crescimento acelerado na indústria agrícola. De fato, o mercado de ingredientes ativos, que inclui extratos de algas marinhas, corretivos microbianos, aminoácidos e substâncias húmicas, tem a projeção de atingir cerca de 5,6 bilhões de dólares até 2026, com uma taxa de crescimento anual de 12,1% (KANABAR & NANDWANI, 2023). Os modos de ação dos bioestimulantes são diversos e podem ser gerais ou específicos, mas a maioria deles estimula o crescimento e a produção, aumentando a biossíntese de clorofila, aprimorando a fotossíntese, estimulando o desenvolvimento das raízes e melhorando a absorção de água e nutrientes no solo (BULGARI et al., 2015; YAKHIN et al., 2017; LANGOWSKI et al., 2019). A eficácia de um bioestimulante geralmente se manifesta por meio do efeito combinado das diferentes substâncias ativas presentes em sua formulação (ROUPHAEL & COLLA, 2018).

É importante notar que embora os efeitos mediados por bioestimulantes nas raízes sejam extensivamente estudados, os mecanismos de promoção destas moléculas na parte aérea são pouco abordados (MORA et al., 2010). Ao contrário dos estímulos desencadeados pela aplicação de bioestimulantes via radicular (aumento da síntese e atividade de H^+ -ATPase, transportes de íons na membrana plasmática, respostas do tipo hormonal, dentre outros), os efeitos e modos de ação pela aplicação foliar são pouco explorados (DE HITA et al., 2020).

O ácido fúlvico representa uma fração húmica encontrada na matéria orgânica do solo que tem sido empregada como um bioestimulante para plantas. É caracterizado por seu baixo peso molecular, elevado teor de compostos fenólicos e grupos carboxílicos, e uma menor quantidade de estruturas aromáticas, o que resulta em uma melhor solubilidade em água e maior capacidade de interações (PASCUAL et al. 1999; CANELLAS et al., 2014). A aplicação foliar do ácido fúlvico é associada a diversos efeitos benéficos, incluindo o estímulo ao crescimento de raízes, folhas e brotos, o aumento da taxa de respiração, fotossíntese e teor de clorofila, além de promover a absorção de íons e a produção de ATP (CALVO et al., 2014; CANELLAS et al., 2014; ABDEL-BAKY et al., 2019; KANABAR & NANDWANI, 2023). Além disso, os ácidos fúlvicos são compostos por aminoácidos, vitaminas, oligoelementos e hormônios vegetais, e todos esses compostos podem estimular a divisão celular, o crescimento das raízes e a absorção de nutrientes (DE PASCALE et al., 2018; QIN & LESKOVAR, 2020).

Os extratos da alga *Kappaphycus alvarezii* também demonstraram potencial como bioestimulantes de pulverização foliar, uma vez que promovem o aumento dos rendimentos em várias culturas (GHOSH et al., 2015). Os efeitos benéficos desses extratos parecem ser

atribuídos à sua rica composição, que inclui compostos bioativos, como fenóis, flavonoides, esteroides, carboidratos, proteínas, lipídeos, carotenoides, fitohormônios e antioxidantes, além de conter uma elevada quantidade de elementos minerais, como potássio, fósforo, ferro, zinco e outros (VAGHELA et al., 2022). A aplicação foliar de extratos de *Kappaphycus alvarezii* contribuiu para o aumento do rendimento e quantidade de tubérculos por planta em cultivos de batata (PRAMANICK et al., 2017), promoveu melhoria da qualidade do suco e aumento de rendimento agrícola na cultura da cana-de-açúcar (KARTHIKEYAN & SHANMUGAM, 2017), aumentou o rendimento do cultivo da banana e qualidade interna dos frutos (KARTHIKEYAN & SHANMUGAM., 2014) e estimulou a produção de grãos de arroz (DEVI & MANI, 2015). Em plantas de milho que foram submetidas a aplicações foliares de extratos aquosos de *Kappaphycus alvarezii*, observou-se um aumento na produção da cultura. Além disso, houve uma redução na presença de espécies reativas de oxigênio e um aumento na atividade enzimática de regulação redox nas plantas (TRIVEDI et al., 2021). A aplicação do mesmo tipo de extrato também em plantas de milho, mostrou que há um estímulo no crescimento do sistema radicular e do aumento na absorção de nutrientes, tais efeitos mediante uma regulação de genes que codificam para sinalização hormonal, metabolismo no nitrogênio e regulação oxidativa (KUMAR et al., 2020).

Billard et al. (et al., 2013) realizaram um estudo comparativo entre um bioestimulante à base de substância húmica e outro à base de extrato de alga, aplicados via radicular, observando respostas semelhantes sobre o crescimento e absorção de nutrientes de plantas de colza (*Brassica napus* L.). A aplicação foliar de ácido húmico e de extrato de alga em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.), em conjunto com adubação nitrogenada, mostrou maior efeito no aumento da produtividade (NAZIROLESMANI et al., 2021). Rosa et al. (2021) observaram que o uso de bioestimulante de pulverização foliar à base de extrato de alga *Ascophyllum nodosum* L. e ácidos fúlvicos induziu melhor recuperação das plantas de soja após déficit hídrico por proporcionar mais rápido restabelecimento do potencial hídrico celular e atividade fotossintética. Wadas e Dziugil (2019) constataram aumento no rendimento comercial de tubérculos de batata de colheita precoce com a aplicação foliar de extratos de algas marinhas *Ascophyllum nodosum* e *Ecklonia maxima* e ácidos húmicos e fúlvicos de leonardita.

Bioestimulantes à base de extratos de algas marinhas e de substâncias húmicas têm sido amplamente utilizados para melhorar a produção agrícola. No entanto, não foram encontrados estudos contendo ácidos fúlvicos e extratos de *Kappaphycus alvarezii*, faltando relatos dos efeitos de produtos compostos por esses dois componentes na fisiologia e produção das culturas.

Deste modo, o objetivo deste capítulo foi avaliar e comparar os estímulos desencadeados pela aplicação foliar isolada e conjunta de ácido fúlvico de vermicomposto e extrato de *Kappaphycus alvarezii* em plantas de arroz, sobre a regulação gênica, metabolismo, absorção de nutrientes, fotossíntese, desenvolvimento radicular e crescimento, visando a obtenção de um bioestimulante foliar misto com potencial agrícola.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Condições experimentais para o ensaio com aplicação dos potenciais bioestimulantes mistos

A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade nipponbare. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação climatizada nas seguintes condições: 70% de umidade relativa e temperatura de 26 °C. As sementes de arroz foram desinfestadas previamente com hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, as sementes foram transferidas a potes com gaze que continham somente água destilada. Dois dias após a germinação das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland (HOAGLAND E ARNON, 1950) modificada a 1/8 da força iônica total. Após quatro dias foi trocada a solução de Hoagland para 1/4 da força iônica total. Três dias após a última troca de solução, as plantas foram transplantadas para potes de 0,7L contendo solução de Hoagland a 1/4 força iônica total. Três dias após o transplantio houve a troca de solução para 1/2 força iônica total, sendo renovada a cada três dias até o momento da coleta. Todas as soluções preparadas tinham como fonte de nitrogênio $N-NO_3^-$ a 2mM e pH ajustado a 5,6.

A aplicação dos tratamentos com diferentes tipos de bioestimulantes ocorreu aos 22 e 25 DAG, mediante aplicação por pulverização via foliar. As doses utilizadas foram selecionadas de acordo com resultados obtidos previamente. Foram adotados quatro tratamentos: controle (pulverização foliar apenas com água destilada), AFVC (80 mg L⁻¹), K-sapF (2%) e AFVC (80 mg L⁻¹) + K-sapF (2%). Foi aplicado um volume diretamente nas folhas até atingir o ponto de gotejo, sendo de 8 mL (primeira aplicação) e 10 mL (segunda aplicação) por unidade experimental. A coleta ocorreu aos 28 dias após a germinação, às 144 horas após o início dos tratamentos.

Os delineamentos experimentais adotados foram inteiramente casualizados. As análises estatísticas serão realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5 e no software estatístico R. Os testes de médias serão feitos por tukey ($p < 0,05$), e os gráficos serão elaborados no programa Sigmaplot 12.0 e Microsoft Excel 365. O trabalho com os espectros será realizado utilizando o Software ACD/Labs v.12.01.

5.4.2 Avaliações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas

a) Determinação da biomassa fresca e seca

Para avaliação da massa fresca foram separadas folhas, caules e o sistema radicular de cada planta e pesadas utilizando balança digital de precisão. Em seguida, as amostras foram armazenadas em envelopes de papel e transferidas para estufa secadora, permanecendo assim por 72 horas à 60 °C. Passado esse período, foram pesadas as massas secas do sistema radicular e das partes aéreas utilizando balança digital de precisão.

b) Análise do desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular

Ao final do experimento foram medidos o número de folhas por planta e altura de cada planta. A avaliação do desenvolvimento das raízes das plantas mediante os diferentes parâmetros foi realizada de acordo com Tavares (2014). Resumidamente, o sistema radicular das plântulas de arroz foi quantificado mediante distribuição uniforme em uma camada de água em bandeja transparente de acrílico (30 cm x 20 cm) para a digitalização em resolução de 600 dpi. Foi utilizado um sistema de digitalização Epson Expression 10000XL com uma unidade de luz adicional (ULA) onde as imagens das raízes foram convertidas para um formato em tons

de cinza de oito bits. Os limites das imagens foram definidos e então importados para o software WinRHIZO, 2012b (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.) para análise dos caracteres da raiz e sua quantificação. As imagens foram analisadas usando um grid de calibração com uma escala de referência, e foram alteradas as configurações de entrada para raízes pálidas em um fundo preto (WinRhizo Arabidopsis 2012b). Em seguida os dados foram gerados através do software XLRhizo (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.).

Foram analisados e quantificados diferentes parâmetros radiculares: número de raízes e de bifurcações, comprimento médio (mm), área de superfície (mm²), diâmetro médio (mm) e volume (mm³). Também será definido e medido o número de raízes mediante classificação em classes quanto ao diâmetro: s (> 1,5 mm), médias (1,5 - 3,5 mm) e grossas (> 3,5 mm).

c) Avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila a5

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida utilizando-se um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hanstech, King's Lynn, Norfolk, UK). Os cliques utilizados para estas medições foram colocados no terço médio de folhas jovens completamente expandidas, durante nove dias após o início dos tratamentos, às 7:00, e as medições foram realizadas 30 minutos após a adaptação das folhas ao escuro. A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4mm de diâmetro da folha pela exposição da amostra a um pulso de luz saturante numa intensidade de 3.000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo o intervalo entre os pulsos de 500 ms. A partir da curva de emissão de fluorescência transiente obtida, as intensidades determinadas a 50 μs (fluorescência inicial - F0), 100, 300 μs , 2 e 30 ms e FM (fluorescência máxima), foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER et al., 2004) (Tabela 15).

d) Extração alcoólica do material fresco e dosagem das frações solúveis

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

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

e) Determinação dos teores de N-NO₃⁻

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

Foram realizados vários testes (dentre eles testes alterando a concentração dos reagentes, das amostras, etc) até que os devidos ajustes foram feitos para uma melhor eficiência

na determinação de nitrato. Em uma microplaca de 96 poços, foram pipetados 30µL da amostra e 60 µL de uma solução resultante da mistura de VCL₃ 0,5% (m/v) em HCl 1M + sulfanilamida 0,4% (m/v) em HCl 1M + N-(1- naftil) etilenodiamnino dihidroclorido (0,02% (m/v) em H₂O ultrapura), na proporção de 2:1:1. Em seguida as amostras foram colocadas em estufa a 40°C por 50 minutos para acelerar o desenvolvimento da coloração, após o aquecimento foram adicionados 110 µL de H₂O ultrapura e realizada a leitura a 540nm.

f) Determinação dos teores de N-NH₄⁺

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

g) Determinação dos teores de açúcares solúveis

A determinação dos teores de açúcares solúveis foi realizada segundo Yemm & Willis (1954). Em tubos de ensaio de 2,5 cm de diâmetro imersos em banho de gelo, foram adicionados 5 mL do reagente de antrona (2% em H₂SO₄ 5:2), e após 5 minutos de repouso, adicionou-se lentamente 1 mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluída quando necessário), deixando-se em repouso por 5 minutos a 0°C. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 10 minutos para o desenvolvimento da coloração esverdeada característica. Após resfriamento em água corrente, as leituras espectrofotométricas foram realizadas. A glicose (0, 20, 40, 50, 80 e 100µg mL⁻¹) foi utilizada como padrão.

h) Determinação dos teores de N-amino livre

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

i) Determinação dos teores nutricionais em tecido vegetal

Para a determinação dos teores dos elementos N, K e P, as raízes, colmos e folhas secas, foi realizada a digestão sulfúrica de cada parte da planta de acordo com o protocolo de Tedesco (1995), onde uma massa de 0,2 g de amostra foi pesada e colocada em tubo para digestão. Foram adicionados 7 g de mistura catalisadora (sulfato de sódio, sulfato de cobre e selênio), 1 ml de peróxido de hidrogênio e 2 ml de ácido sulfúrico. Os tubos foram inseridos no bloco digestor à 170 °C durante 1h, posteriormente, a temperatura foi elevada para 350 °C e permaneceu por mais 2 h. Para determinação de nitrogênio, foi retirado uma alíquota de 10 mL do extrato digerido e transferido para o tubo de destilação de nitrogênio, sendo adicionado 5

mL de NaOH 10M. O produto da destilação foi coletado em Erlenmeyer contendo 5 mL de indicador de ácido bórico. Após o resfriamento da amostra, ocorreu a titulação com H₂SO₄ 0,025M até o momento da viragem. Para a determinação de potássio foi retirada uma alíquota de 1 mL do extrato digerido, diluído em 10 mL de água destilada e determinada a concentração em fotômetro de chama). A determinação de fósforo foi feita por espectrofotometria numa alíquota de 1mL do extrato digerido, sendo adicionados 2 mL de água destilada, 3 mL de molibdato de amônio, 3 gotas de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico, esta mistura foi agitada e após 15 minutos realizada a leitura.

j) Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando tampão NTES (Tris-HCl (0,2 M) pH 8,0; EDTA (25 mM) pH 8,0; NaCl (0,3 M) e SDS (2%)). Amostras de raízes e folhas foram maceradas em N- líquido e homogeneizadas por 10 minutos em vórtex numa mistura contendo 800 µL de tampão NTES e 600 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. O homogenato foi centrifugado a 18.000 x g. por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo e novamente centrifugado por 20 minutos com 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Após o procedimento, o RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 3M (NaOAc_{DEPC}) pH 4,8 (70 µL) e 1 volume de isopropanol puro (700 µL). A seguir a mistura foi mantida a -80°C por 1 hora seguida de centrifugação a 18.000 x g. por 20 min a 4°C. Descartado o sobrenadante o precipitado foi lavado em etanol_{DEPC} (70%) e centrifugado a 18.000 x g. por 10 minutos. O precipitado foi solubilizado em 600 µL H₂O_{DEPC} e novamente precipitado com 600 µL de cloreto de lítio 4M (LiCl_{DEPC}), pH 4,8 durante 16 horas a 4°C. Decorrido esse período a solução foi centrifugada a 18.000 x g. por 20 minutos a 4°C e o precipitado foi novamente solubilizado em 450 µL H₂O_{DEPC}. Após a completa dissolução foi adicionado acetato de sódio 3M (NaOAc_{DEPC}) pH 4,8 (50 µL) e etanol absoluto (1000 µL). A mistura foi mantida por 45 minutos a -80°C e centrifugada a 18.000 x g. por 20 min a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol (70%) e após a secagem do solubilizado com H₂O_{DEPC} (50 µL), para armazenamento a -80°C. O RNA total foi quantificado com uso de fluoróforo específico para RNA no fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Após a quantificação, 3 uL de amostras de cada extração foram corridas em gel de agarose (1%) e coradas com gel red, para detecção de possíveis sinais de degradação do RNA.

k) Tratamento com DNase I, síntese do cDNA e PCR em tempo real

Amostras de 0,5 µg de RNA total foram tratadas com DNase (“*DNase I Amplification Grade – Invitrogen™*”) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 30 µL com concentração de 0,125 µg. µL⁻¹, para aumentar a alíquota a ser pipetada. Quatro microlitros de solução representado 0,5 µg de RNA foram misturados com 0,5 µL do tampão de reação da DNase I (10X), 0,5 µL da DNase I. A incubação da reação foi conduzida a 25°C por 15 min., seguida da adição de 0,5 µL de EDTA (25 mM) e posterior inativação da DNase I a 70°C por 10 minutos. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “*High Capacity RNA-to-cDNA*” (*Life Technologies*) seguindo as instruções do fabricante.

O gene do fator de alongamento 1- α de arroz (*eEF1- α*) foi utilizado como controle endógeno para normalização da expressão gênica (JAIN, 2009). As reações foram feitas no aparelho “*StepOne Plus Real-Time PCR System*” (“*Applied Biosystems*”) utilizando o “*kit Power SYBR® Green PCR Master Mix*” (“*Applied Biosystems*”) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicata. A reação foi montada em placas de PCR da seguinte maneira: 6 µL do tampão “*Power SYBR Green PCR Master Mix*” (2X), 3 µL de uma solução de “*primers*” (3,6 µM) cada e 3 µL do cDNA diluído, com volume final

de 12 µL. A placa foi selada com filme ótico apropriado, agitada por três minutos em vórtex próprio e centrifugada a 3.000g por 3 min a 25°C. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dez minutos a 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Uma curva de dissociação (“*melting*”) foi adicionada à programação para identificar possíveis ampliações inespecíficas.

l) Desenho dos iniciadores (“primers”) para os estudos de expressão gênica

Para confecção dos primers foi utilizada a plataforma do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), os quais foram testados quanto a especificidade através do -alinhamento de sequências neste mesmo site (Tabela 9). Experimentalmente foram testados quanto a especificidade, ao fim da reação de PCR, durante a “*curva de melting*”. Todos os “*primers*” apresentaram especificidade.

Tabela 9. Sequências de nucleotídeos (5' a 3') usadas para amplificar os scripts de cDNA na análise quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Par de Primer	Sequências de nucleotídeos (5' a 3')	Forward / Reverse
OsA 1	TGGGCACATGCACATAGGA	Forward
OsA 1	GCTCACTGTAGCCGGTCTTCTC	Reverse
OsA 2	GCAGAAGAGGCCCGTAGGA	Forward
OsA 2	CAGGGTGGTCAGCTCTCTCAA	Reverse
OsNRT 1.1	AGGGGGTACGTCTACAAGGA	Forward
OsNRT 1.1	AGCTTGCGTATGTCATGCTG	Reverse
OsAMT2.1	CACGCGCGTTTGTACTGTTT	Forward
OsAMT2.1	TCACCCTTCACCTTGCAGTC	Reverse
OsGS 1.2	TCCTCGAGAGGGTCACAGAG	Forward
OsGS 1.2	GAGCTTGTGCGATCGCCTTCT	Reverse
OsGS 2	AGGCGAAGGGAAAAGGCTAC	Forward
OsGS 2	GAGGGTTGGCTCCCAAAGAA	Reverse
OsFD-GOGAT	ATGCAGCTGAAGGGCTTGAT	Forward
OsFD-GOGAT	GGCACAAGCTTCAGGAGAGT	Reverse
OsNADH-GOGAT	TGCAGACGTGGACAATCACT	Forward
OsNADH-GOGAT	CCGAGGGGGTTATGTCCTCT	Reverse
OsAAP 1	GGTGGCGTTCTCGGTCATAA	Forward
OsAAP 1	GCTTGGCCGTAGGTGTAGTT	Reverse
OsAAP 4	ACATCTACCCTCCTCGCCAA	Forward
OsAAP 4	GCACACCCACACAACATCAC	Reverse
OsAAP 6	GTCAGAACAGGAACGGTATGG	Forward
OsAAP 6	TAGTAGGTGATGTAGGCGCAGA	Reverse
OsLHT 1	TTGGCCTCATCGCAAGAACA	Forward

Continua...

Continuação da Tabela 9.

Par de Primer	Sequências de nucleotídeos (5' a 3')	Forward / Reverse
OsLHT 1	AGCCACATGATGCAGGGAAG	Reverse
OsAKT 2	CTACCTCATCGGCAACATGAC	Forward
OsAKT 2	CGAAATTGGAGGCAGCACGAA	Reverse
OsKAT 2	GGACCAGGAATTTTAGGGACAC	Forward
OsKAT 2	CCTTGGGGAGACTATCCAATGT	Reverse
OsHKT 1.1	TTGCTGGTTTCCTTGCTCTGA	Forward
OsHKT 1.1	TCAGAACCCAGAGTTGCCTG	Reverse
OsNHX 1	ACATAGATGCGGCTGTCGTT	Forward
OsNHX 1	CATAAGGGCAACCTCACGGT	Reverse
OsSKOR	CCTTACGGCATAGTTGGCGA	Forward
OsSKOR	TCAGAAGGCTGCAAAGCTCA	Reverse
CuZnSOD 1	AGATTCCAAACCAGCAGGAGT	Forward
CuZnSOD 1	AAGCACAACAACAGCCTTCAC	Reverse
POX 2	GGCAAATACCGACCTCCCT	Forward
POX 2	TCGTTGTAGATCCTGTCCCTGA	Reverse
APX 1	AAGGGTTCTGACCACCTAAGGC	Forward
APX 1	GGGCAACAATGTCCTGATCACT	Reverse
OsNOX 9	TACCTTCGGGCAGACACGGAT	Forward
OsNOX 9	GCGGGTTGCTGTCACTAAG	Reverse

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Experimento final – potencialidades de diferentes bioestimulantes aplicados via foliar

a) Efeito da aplicação de diferentes bioestimulantes na expressão relativa de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio

A Figura 41 mostra a expressão relativa de genes que codificam H⁺-ATPases, transportadores e enzimas envolvidas no metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz após aplicação via foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap. Foram modificadas, de acordo com os tratamentos, a expressão de duas isoformas de H⁺-ATPases presentes na membrana plasmática do arroz, *OsA1* e *OsA2*, que desempenham um papel crucial na regulação do pH intracelular, na captação de nutrientes, no transporte iônico e na adaptação a condições ambientais adversas, conforme relatado por Toda et al. (2016). O gene *OsA1*, em raízes, teve sua expressão significativamente reduzida pela aplicação foliar de AFVC + K-sap, quando comparado com os demais tratamentos. Já nas folhas, por mais que tenha sido possível observar menor expressão gênica nos tratamentos com AFVC e AFVC + K-sap, não ocorreram diferenças significativas (Figura 41A). O gene *OsA2*, em comparação com os demais tratamentos, apresentou expressão estatisticamente superior em plantas tratadas com AFVC + K-sap, tanto nas raízes como nas folhas (Figura 41B).

A expressão do gene que codifica para o transportador *OsNRT1.1* em raízes (transportador de NO₃⁻ de baixa afinidade, PLETT et al. (2010), não mostrou diferenças significativas com os demais tratamentos, porém, foi possível observar um maior estímulo pela aplicação de K-sap. Nas folhas, a aplicação de AFVC + K-sap aumentou significativamente a expressão de *OsNRT1.1*, em relação ao controle. Aplicação de AFVC e de K-sap, não resultou em expressão de *OsNRT1.1* nas folhas, significativamente diferente dos demais tratamentos. O gene *OsAMT2.1*, responsável pela absorção e translocação de amônio pela planta (LI et al., 2012) mostrou redução na expressão relativa em raízes e folhas devido à aplicação de todos os tratamentos com bioestimulantes, porém sem diferir significativamente do controle (Figura 41C e 41D).

Os genes *OsGS1.2* e *OsGS2* codificam para isoformas de glutamina sintetase, responsáveis pela assimilação de NH₄⁺ (TABUCHI et al., 2007), sendo o *OsGS1.2* expresso exclusivamente em raízes e o *OsGS2* expresso exclusivamente em folhas. A aplicação de AFVC + K-sap via foliar mostrou o maior aumento na expressão do gene *OsGS1.2*, significativamente superior ao controle e ao tratamento que recebeu apenas K-sap. A aplicação isolada de AFVC resultou em expressão de *OsGS1.2* nas raízes significativamente igual ao observado pela aplicação de AFVC + K-sap, porém também não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Por outro lado, a expressão do gene *OsGs2* em folhas foi significativamente superior aos demais tratamentos devido à aplicação de K-sap (Figura 41E e 41F).

A expressão dos genes *OsNADH-GOGAT* (presente em raízes) e *OsFd-GOGAT* (presente em folhas), que regulam a síntese da enzima Glutamato sintase, encarregada da assimilação de glutamina (WANG et al., 2012), mostrou comportamento diferente de acordo com o tipo de bioestimulante utilizado. O gene *OsNADH-GOGAT* teve sua expressão diminuída significativamente devido à aplicação de K-sap e de AFVC + K-sap, quando comparado com os demais tratamentos. De maneira diferente, o gene *OsFd-GOGAT* em plantas tratadas com AFVC e AFVC + K-sap mostrou expressão estatisticamente superior ao observado em plantas submetidas à aplicação de K-sap (Figura 41G e 41H).

Os genes *OsAAP1*, *OsAAP6* e *OsLHT1*, envolvidos no transporte e distribuição de aminoácidos (LU et al., 2012; ZHAO et al., 2012; JI et al., 2020), não foram diferencialmente

expressos em raízes pela aplicação foliar dos diferentes tratamentos. No entanto, em folhas, a aplicação de K-sap e de AFVC + K-sap foi responsável por aumento significativo na expressão do gene *OsAAP1*, em comparação às plantas tratadas com AFVC. A expressão do gene *OsAAP6* em folhas de plantas submetidas a pulverização isolada de AFVC e de K-sap, foi significativamente superior ao observado no controle. Por fim, a aplicação de K-sap e de AFVC + K-sap foi responsável por folhas de arroz com expressão do gene *OsLHT1* significativamente maior do que de plantas controle. O tratamento contendo AFVC não resultou em expressão de *OsLHT1* significativamente diferente do controle, porém, também foi estatisticamente semelhante ao observado pela aplicação de K-sap (Figura 41I-K).

Em plantas de milho e de arroz, a aplicação de substâncias húmicas estimulou a absorção e a assimilação de N-NO_3^- , induzindo a expressão de genes que codificam para transportadores de nitrato e de isoformas de H^+ - ATPase em raízes e folhas (QUAGGIOTTI et al., 2004; TAVARES et al. 2016). Em plantas de milho cultivadas em condições de estresse hídrico e tratadas com 10% de extrato de *Kappaphycus alvarezii* via foliar, mais de mil genes foram regulados com resultado da ação do extrato de algas, 380 genes foram expressos enquanto 631 genes foram inibidos, havendo genes responsivos ao metabolismo de N (transporte de NO_3^-), fotossíntese, transporte de membrana e síntese de ácido absícico (ABA) (TRIVEDI et al., 2021).

Os resultados mostram que aplicação conjunta de AFVC e de K-sap (AFVC + K-sap) resultou em maior regulação sobre a expressão de genes relacionados a bombas de prótons da membrana plasmática, indicando que as H^+ - ATPases exerceram atividade mais intensa devido à aplicação deste tratamento. A aplicação de todos os tipos de bioestimulantes foliares resultou em estímulo sobre os transportadores de NO_3^- nas folhas, porém com maior intensidade devido à aplicação de AFVC + K-sap. O metabolismo de N, especificamente a rota GS-GOGAT, teve regulações gênicas diferentes em raízes e folhas, pela aplicação de cada bioestimulante. A rota GS-GOGAT radicular mostrou maior regulação pela aplicação de AFVC + K-sap, enquanto a GS-GOGAT foliar foi mais regulada pela aplicação de K-sap. Os genes responsáveis pela absorção e distribuição de aminoácidos pela planta foram modificados apenas em folhas, mostrando que a pulverização foliar dos bioestimulantes exerceu seus estímulos sobre este grupo de genes no órgão vegetal em que foram aplicados. Porém, os efeitos ocorreram de maneira diferenciada, sendo o K-sap o único bioestimulante que resultou em aumento relativo da expressão nas folhas dos genes *OsAAP1*, *OsAAP6* e *OsLHT1*, demonstrando o forte estímulo deste bioestimulante sobre o transporte e distribuição de aminoácidos.

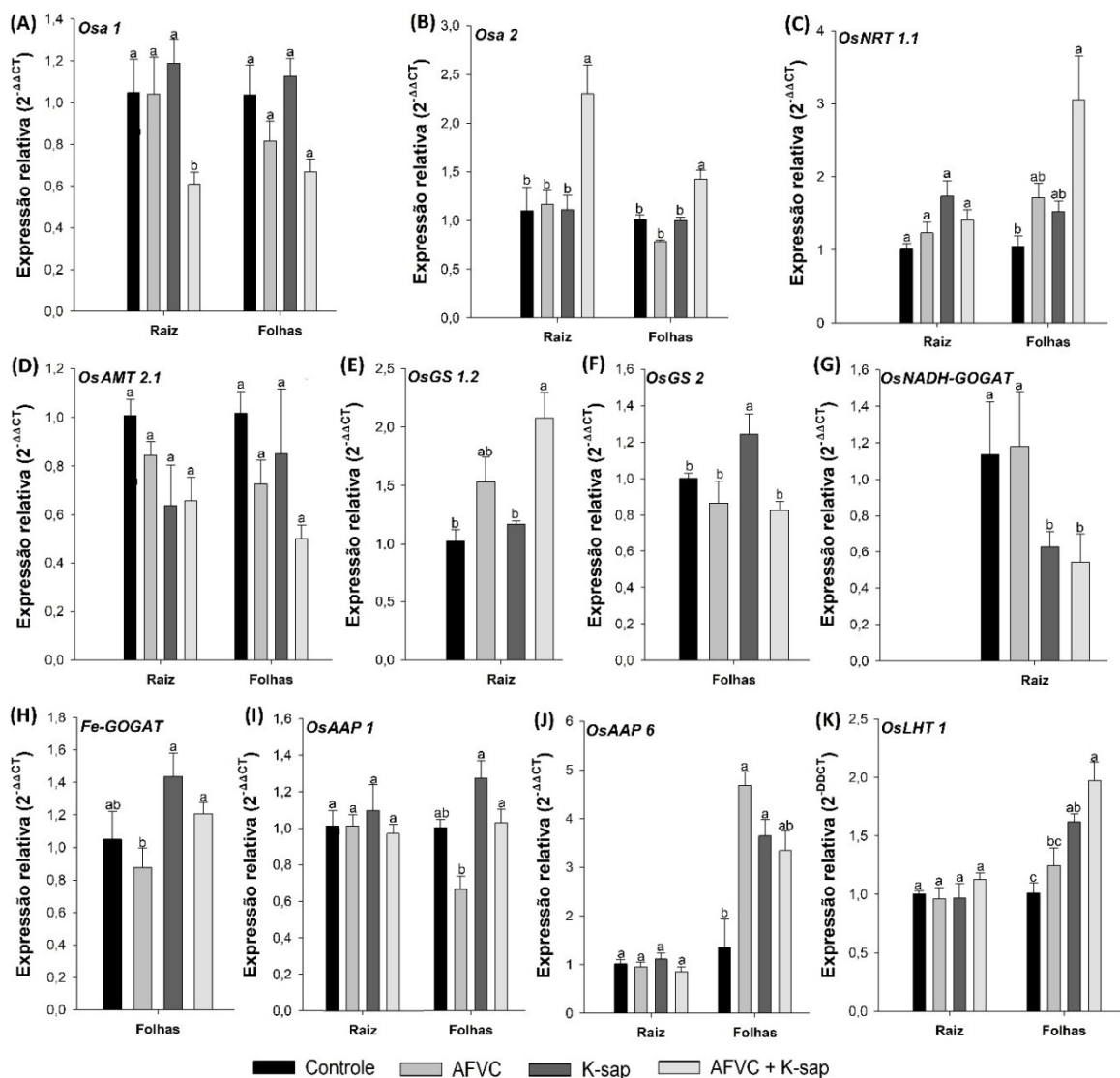


Figura 41. Expressão relativa de genes relacionados a bombas de prótons e metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Barras com a mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ($p < .05$), $n=4$.

b) Teores de metabólitos solúveis pelo estímulo à aplicação de bioestimulantes foliares distintos (N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, N- amino livre e açúcares solúveis)

A Figura 42 mostra os teores de N-NO₃⁻, N-NH₄⁺, N-amino livre e açúcares solúveis em raízes, bainhas e folhas de arroz sob pulverização foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap. O teor de N-NO₃⁻ nas raízes aumentou significativamente devido à aplicação de AFVC em relação ao controle, enquanto a aplicação de K-sap e de AFVC + K-sap não resultou em teores estatisticamente diferentes do observado em raízes de plantas controle e de tratadas com AFVC. Nas bainhas, o teor de N-NO₃⁻ não apresentou diferenças significativas com o controle pela aplicação de qualquer bioestimulante, porém o tratamento com AFVC resultou em teor na bainha significativamente maior do que em plantas tratadas com AFVC + K-sap. O teor de N-NO₃⁻ nas folhas diminuiu significativamente em plantas submetidas à pulverização foliar de AFVC e AFVC + K-sap, quando comparado com o controle. O AFVC resultou no menor teor

de NO_3^- nas folhas, sendo significativamente inferior ao K-sap, que por sua vez não diferiu com significância do bioestimulante contendo AFVC + K-sap (Figura 42A).

A Figura 42B mostra que o teor de amônio na raiz não diferiu significativamente entre os tratamentos. Na bacia, em relação ao controle, a aplicação de AFVC + K-sap resultou em teor de NH_4^+ significativamente superior, enquanto a aplicação separada de AFVC e de K-sap resultou em redução significativa. O teor de NH_4^+ nas folhas foi significativamente maior devido à aplicação de AFVC e de K-sap, quando comparado ao controle, sendo mais estimulado pelo K-sap.

O teor de N-amino livre nas raízes não teve alterações significativas entre os tratamentos. A aplicação de AFVC e de K-sap, separadamente, resultou em teores de N-amino nas bacias significativamente inferior ao observado pelos demais tratamentos, que não diferiram estatisticamente entre si. Nas folhas, a aplicação foliar de todos os tipos de bioestimulantes resultaram em teor de N-amino significativamente superior ao controle, sendo que o tratamento com AFVC foi responsável por teor estatisticamente maior do que o encontrado devido à aplicação de K-sap e de AFVC + K-sap (Figura 42C).

A Figura 42D mostra que o teor de açúcares solúveis nas raízes não foi alterado pela aplicação foliar dos diferentes bioestimulantes. Na bacia, todos os tratamentos resultaram em quantidades de açúcares solúveis estatisticamente superior ao controle, sendo que a aplicação de AFVC + K-sap foi também significativamente maior do que o observado em plantas tratadas, separadamente, com AFVC e com K-sap. O teor de açúcares solúveis em folhas de plantas tratadas com K-sap e com AFVC + K-sap foi significativamente maior do que o encontrado nos outros tratamentos.

De maneira geral, foram observados maiores estímulos nos níveis de metabólitos solúveis nas folhas, principalmente em comparação com as raízes, indicando novamente que os bioestimulantes foliares exerceram maior efeito no órgão vegetal em que foram aplicados. Castro et al. (2021) avaliaram os estímulos de três diferentes ácidos húmicos aplicados via radicular sobre os teores de N-NO_3^- , N-NH_4^+ , N-amino livre e açúcares solúveis em raízes, bacias e folhas de plantas de arroz, observando que os teores de metabólitos solúveis sofreram maior alteração no sistema radicular, quando comparado com as bacias e folhas.

A aplicação dos compostos naturais resultou em menores teores de NO_3^- e maiores teores de NH_4^+ nas folhas, associado ao aumento na expressão de *OsNRT1.1* e redução na expressão de *OsAMT2.1*, mostrando que os níveis de N-NO_3^- e de N-NH_4^+ foliar exercem efeito sobre a regulação de genes codificantes para transportadores de nitrato e amônio nas folhas. Porém, este comportamento foi diferente em relação aos teores de N-amino livre, sendo observados teores nas folhas significativamente superiores ao controle e aumento na expressão dos genes *OsAPP1*, *OsAPP6* e *OsLHT1*, mostrando que estes bioestimulantes exercem estímulos mais intensos sobre o transporte, distribuição e acúmulo de aminoácidos.

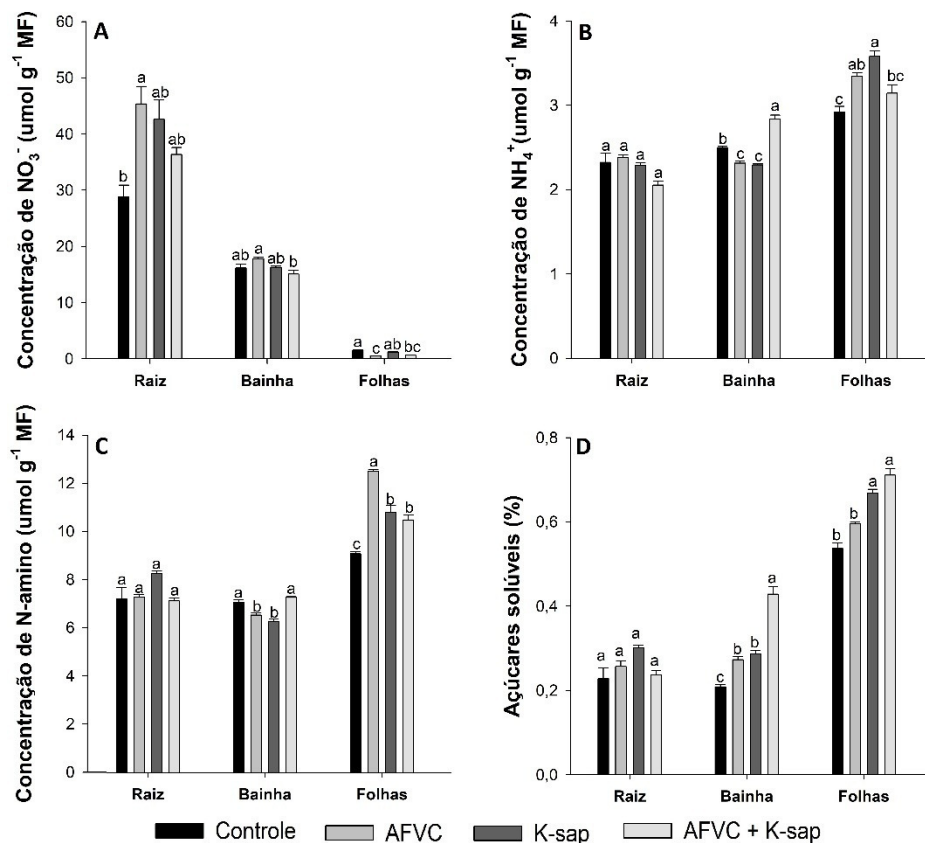


Figura 42. Concentração de N-NO_3^- (A), concentração de N-NH_4^+ (B), concentração de N-amino livre (C) e concentração de açúcares solúveis (D) em raízes, bainhas e folhas de arroz plantas (*Oryza Sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=4$.

c) Efeito da aplicação de diferentes bioestimulantes na expressão relativa de genes envolvidos no transporte de potássio e no sistema oxidativo

A expressão de genes que codificam para transportadores de potássio e enzimas do sistema oxidativo em resposta a aplicação de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap são mostrados na Figura 43. A expressão do gene *OsAKT2* em raízes, cujo qual está envolvido na redistribuição de K^+ da parte aérea à raiz (TIAN et al., 2021), mostrou redução significativa devido à aplicação de AFVC e de AFVC + K-sap, quando comparado aos demais tratamentos. Nas folhas, apenas a aplicação de AFVC + K-sap resultou em expressão deste gene significativamente menor do que o observado em plantas controle (Figura 43A). O canal de potássio do tipo *shaker*, codificado pelo gene *OsKAT2*, exclusivo de folhas (HWANG et al., 2013), teve seu gene significativamente mais expresso em plantas tratadas com K-sap e com AFVC + K-sap do que em plantas sob AFVC (Figura 43B). O gene *OsHKT1.1*, que codifica para um transportador de alta afinidade de potássio (IMRAN et al., 2019), não sofreu alterações significativas na expressão em raízes pela aplicação dos tratamentos. Nas folhas, apenas aplicação de K-sap resultou em expressão deste gene significativamente diferente do controle, havendo redução. Porém, a aplicação de AFVC + K-sap apresentou expressão de *OsHKT1.1* nas folhas significativamente maior do que o observado pela aplicação de AFVC, que por sua vez também resultou em expressão estatisticamente maior do que de plantas tratadas apenas com K-sap (Figura 43C). A Figura 43D mostra que a pulverização foliar dos diferentes bioestimulantes não resultou em diferenças estatísticas na expressão do gene *OsNHX1* em raízes e folhas, cuja

função é codificar para um transportador antiporte K^+Na^+/H^+ (FUKUDA et al., 2011). No entanto, nas folhas, a aplicação AFVC + K-sap resultou em expressão deste gene significativamente maior do que o observado em plantas tratadas com AFVC. A expressão do gene *OsSKOR*, um canal de potássio tipo *shaker* envolvido no transporte de K^+ para o xilema (GAYMARD et al., 1998; KIM et al., 2015), presente apenas em raízes, mostrou supressão significativa devido à aplicação de AFVC + K-sap, quando comparado com os demais tratamentos.

A expressão do gene *OsNOX1*, envolvido na codificação para a enzima NAD(P)H oxidase que regula os níveis de EROs na planta (KAUR & PATI, 2016), teve sua expressão em raízes significativamente aumentada apenas pela aplicação foliar de K-sap, quando comparado com o controle. Nas folhas, a pulverização com K-sap resultou em expressão do gene *OsNOX1* significativamente superior ao observado em plantas tratadas com AFVC (Figura 43F). As Figuras 43G-I, mostram a expressão relativa de genes que codificam para outras enzimas do sistema oxidativo, responsáveis pela regulação dos níveis de EROs, sendo *OsPOX2* (peroxidases), *OsAPX1* (ascorbato peroxidases) e *OsCuZnSOD1* (superóxido dismutase) (GARCÍA et al., 2014; 2019), os quais não apresentaram alterações na expressão gênica em raízes pela aplicação dos diferentes tratamentos. Em folhas, o gene *OsPOX2* mostrou expressão significativamente maior em plantas tratadas com AFVC e AFVC + K-sap quando comparado às plantas pulverizadas com AFVC. O gene *OsAPX1* também não foi diferencialmente expresso em folhas. O gene *OsCuZnSOD1* teve expressão gênica suprimida pela aplicação de AFVC + K-sap.

Assim como para as análises anteriores, o órgão vegetal em que foram aplicados os bioestimulantes (folhas) mostraram receber maiores estímulos sobre a regulação de genes envolvidos no transporte de potássio e no sistema oxidativo. Por mais que os maiores estímulos sobre a regulação gênica tenham sido observados em folhas, devido à aplicação de todos os bioestimulantes, os efeitos ocorreram de maneira diferenciada de acordo com o tipo de composto aplicado. Independentemente do tratamento aplicado, a regulação dos níveis de potássio visando manter a homeostase parece ocorrer por meio de regulação transcricional, com a contribuição de diversos transportadores e canais de potássio, semelhante ao descrito por outros autores (LI et al., 2020). A aplicação foliar de extrato de *Kappaphycus alvarezii* em plantas de milho mostrou estimular o crescimento do sistema radicular e aumentar a absorção de nutrientes. Esses efeitos parecem estar relacionados à regulação de genes que codificam para a sinalização hormonal, o metabolismo do nitrogênio, a regulação oxidativa e a atividade da peroxidase. (KUMAR et al., 2020). Alguns autores afirmam que a aplicação de substâncias húmicas resultam em um nível de estresse na planta capaz de melhorar as funções metabólicas por meio de regulações dos níveis de EROs e atividade de enzimas associadas ao metabolismo oxidativo (ASLI & NEUMANN, 2010; GARCÍA, et al., 2012; GARCÍA et al., 2014; GARCÍA et al., 2019).

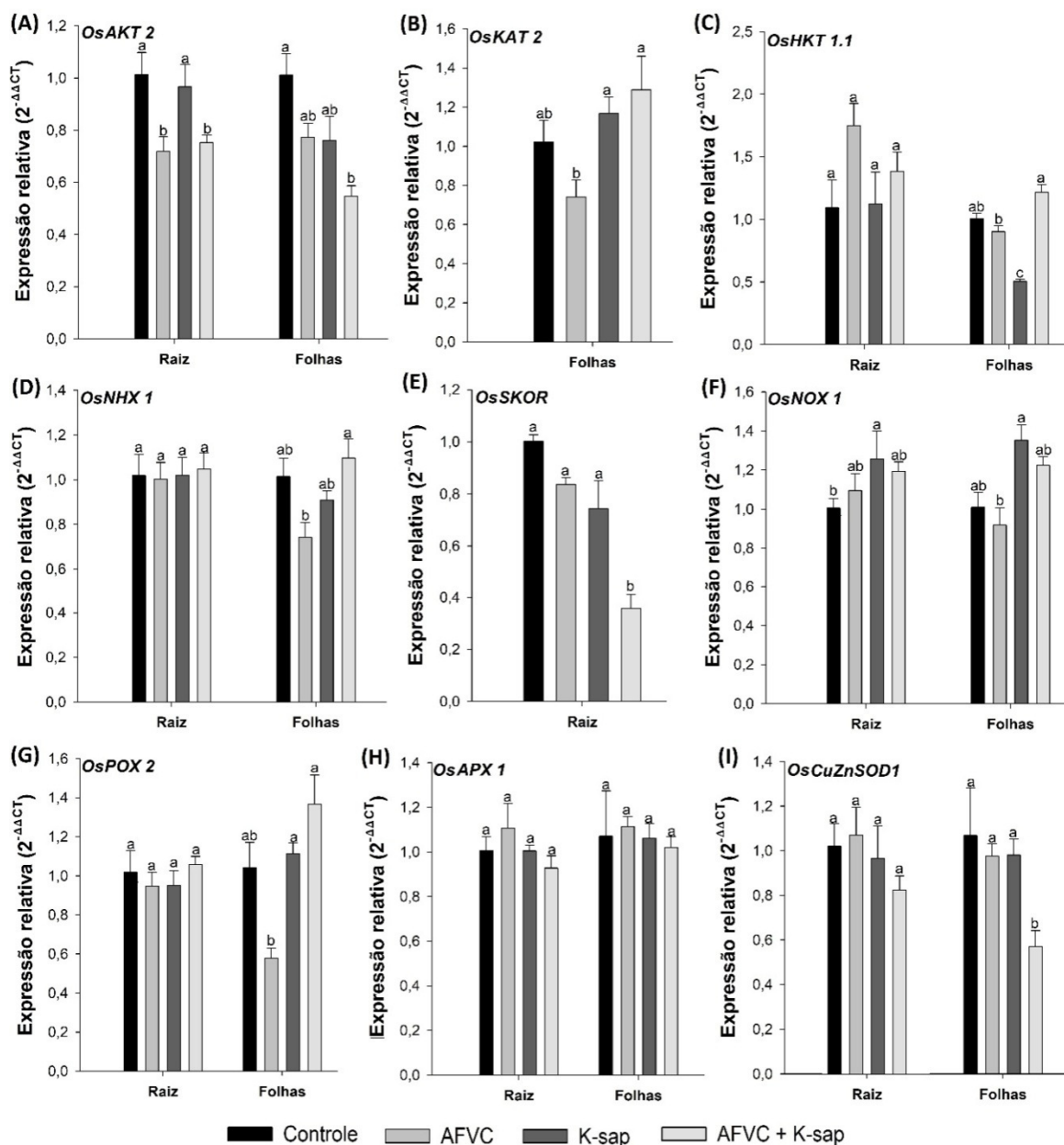


Figure 43. Expressão relativa de genes relacionados a absorção e translocação de potássio e sistema oxidativo em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Barras com a mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com teste de Tukey ($p < .05$), $n=4$.

d) Acúmulo de nitrogênio, fósforo e potássio devido à aplicação de bioestimulantes mistos

A Figura 44 mostra os teores de nitrogênio, fósforo e potássio em raízes, bainhas e folhas de plantas submetidas à pulverização foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap. O teor de N nas raízes foi significativamente menor devido à aplicação separada de AFVC e de K-sap, quando comparado com os demais tratamentos. Nas bainhas, a pulverização com K-sap resultou em teor de N significativamente superior ao de plantas controle e de plantas tratadas com AFVC. A aplicação de AFVC + K-sap não resultou em teores de N na bainha estatisticamente diferente ao encontrado pela aplicação dos demais tratamentos. O teor de N nas folhas foi significativamente superior devido à aplicação de todos os bioestimulantes, quando comparado

ao controle, sendo o AFVC o que resultou em maior aumento, seguido pelo AFVC + K-sap e pelo K-sap, nesta ordem (Figura 44A).

O teor de P nas raízes das plantas foi estatisticamente menor em plantas tratadas com K-sap, em comparação com os outros tratamentos. Na bainha, todos os tratamentos contendo bioestimulantes promoveram diminuição significativa do teor de P, porém com intensidades diferentes. A pulverização foliar com AFVC + K-sap resultou nos menores teores de P nas bainhas, sendo ainda significativamente menor do que o de plantas pulverizadas apenas com K-sap. As bainhas de plantas tratadas com AFVC não mostraram teor de P significativamente diferente ao observado pela aplicação dos demais compostos naturais (Figura 44B). Assim como nas bainhas, o teor de P nas folhas foi significativamente menor devido à aplicação de todos os bioestimulantes, em comparação com o controle, porém com a mesma intensidade, uma vez que não diferiram significativamente entre si.

A Figura 44C mostrou que houve estímulo diferenciado no teor de K⁺ radicular por meio da pulverização foliar dos diferentes bioestimulantes. Quando comparado às raízes de plantas controle, a aplicação de AFVC resultou em aumento significativo dos teores de K⁺, a aplicação de K-sap não resultou em alterações significativas deste teor e a pulverização com AFVC + K-sap foi responsável por redução em nível estatístico. Nas bainhas, apenas a aplicação de AFVC + K-sap resultou em aumento significativo do teor de K⁺, quando comparado ao controle. A aplicação, separadamente, de AFVC e de K-sap não foi responsável por teor de K⁺ nas bainhas estatisticamente diferentes dos demais tratamentos. O teor de K⁺ nas folhas não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos.

Independentemente do tipo de bioestimulante pulverizado por via foliar, foram observadas regulações nos níveis N, P e K em raízes, bainhas e folhas de plantas de arroz. Os resultados estão em consonância com as análises discutidas anteriormente, indicando que os estímulos na expressão dos transportadores de nitrogênio e potássio, resultantes da aplicação de diferentes bioestimulantes, promovem o aumento na absorção destes nutrientes. Garai et al. (2021) observaram aumento da eficiência na absorção de N, P e K devido à aplicação foliar de extratos de *Kappaphycus alvarezii* em plantas de batata. Shah et al. (2013) relataram aumento no acúmulo de K e N de até 5% e 7%, respectivamente, devido à aplicação foliar de extratos de *Kappaphycus alvarezii* em plantas de trigo. Outros autores relataram que as frações húmicas obtidas de diferentes materiais de origens são capazes de melhorar a aquisição e a assimilação de nitrogênio, fósforo e potássio (NIKBAKHT et al., 2008; VERLINDEN et al., 2010; JANNIN et al, 2012; ROSE et al., 2014; TAVARES et al., 2016).

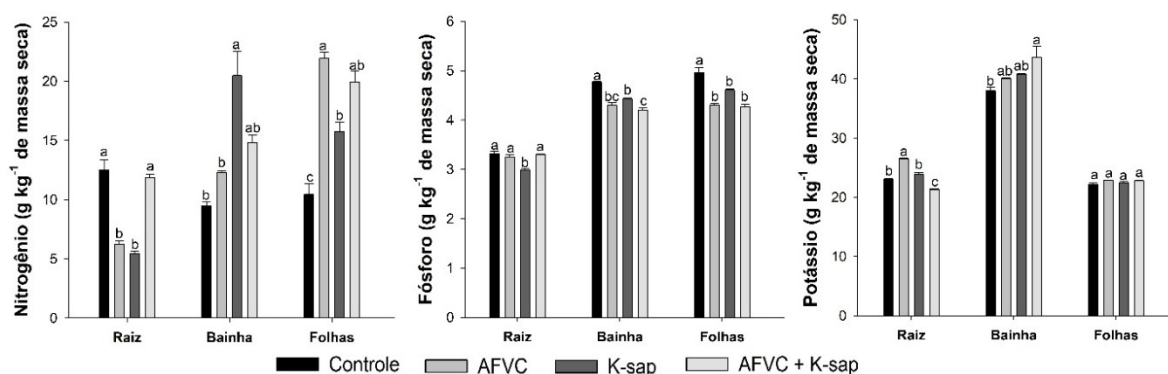


Figura 44. Teor de N, K e P em raízes, bainhas e folhas nas plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=4$.

e) Efeito da aplicação dos bioestimulantes mistos na emissão da fluorescência transiente da clorofila *a*

Os parâmetros fotossintéticos obtidos pela análise JIP da fluorescência transiente da clorofila *a*, normalizados usando como referência o controle, de plantas de arroz tratadas com pulverização foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap, são mostrados na Figura 45 e na Tabela 17 (APÊNDICES). Após 24 horas da aplicação dos tratamentos, ocorreram diferentes respostas fotossintéticas iniciais, de acordo com o tipo de bioestimulante pulverizado. A aplicação de AFVC resultou em incremento nos índices de desempenho fotossintético (PI_{ABS} e PI_{TOTAL}), enquanto as plantas tratadas com K-sap e com AFVC + K-sap mostraram redução inicial no desempenho fotossintético. Neste momento também foi observado que o tratamento com AFVC resultou em redução do fluxo de dissipação de energia por centro de reação (DI_0/RC), enquanto que plantas tratadas com K-sap e com AFVC + K-sap mostraram aumento do DI_0/RC , indicando que houve maior dissipação de energia na forma de calor, estando associado ao desempenho fotossintético das plantas (Figura 45A).

Após 48 horas, as plantas que receberam os bioestimulantes foliares, independentemente do tipo, apresentaram redução na conservação de energia de excitação para redução dos aceptores de elétrons do intersistema (PI_{ABS}), já o índice de desempenho na conservação de energia de excitação para redução dos aceptores finais do PSI (fotossistema I) (PI_{TOTAL}) mostrou diferentes estímulos. Neste momento, as plantas que receberam pulverização foliar com AFVC passaram a mostrar PI_{TOTAL} semelhante ao observado em plantas controle. A aplicação com K-sap resultou em aumento do PI_{TOTAL} após 48 horas, enquanto o tratamento com AFVC + K-sap manteve a redução do PI_{TOTAL} . Em relação ao fluxo de dissipação de energia por centro de reação (DI_0/RC), apenas o AFVC + K-sap resultou em aumento nas plantas, enquanto os demais bioestimulantes mostraram valores semelhantes ao controle (Figura 45B).

Depois de 72 horas a resposta fotossintética das plantas tenderam à normalidade, sendo observada maior estabilidade na etapa fotoquímica da fotossíntese. Porém, ainda assim foram observadas novamente reduções nos índices de desempenho fotossintéticos (PI_{TOTAL} e PI_{ABS}), principalmente pelo tratamento com AFVC + K-sap (Figura 45C). Às 96 horas após aplicação dos tratamentos, todas as plantas que receberam aplicação de bioestimulantes passaram a mostrar incremento expressivo na conservação de energia de excitação para redução dos aceptores de elétrons do intersistema (PI_{ABS}) e no índice de desempenho na conservação de energia de excitação para redução dos aceptores finais do PSI (fotossistema I) (PI_{TOTAL}), sendo mais intenso em plantas pulverizadas com AFVC + K-sap, seguido pelas plantas tratadas com K-sap e pelas tratadas com AFVC, nesta ordem. Neste momento, todos os tratamentos contendo bioestimulantes resultaram em redução do fluxo de dissipação de energia por centro de reação (DI_0/RC), sendo as plantas pulverizadas com AFVC as que apresentaram menor redução (Figura 45D).

Após 120 horas do início da aplicação dos tratamentos, as plantas tratadas com AFVC + K-sap apresentaram estabilidade no desempenho fotossintético, mostrando valores de PI_{ABS} e PI_{TOTAL} semelhantes ao controle, enquanto plantas submetidas à AFVC e à K-sap continuaram apresentando maior desempenho fotossintético do que plantas controle. Após 144 horas todas as plantas pulverizadas com algum tipo de bioestimulante tiveram desempenho fotossintético superior ao de plantas controle, sendo maior em plantas tratadas com AFVC + K-sap, seguido pelas pulverizadas apenas com K-sap e, por fim, pelas tratadas com AFVC.

Os estímulos no desempenho fotossintético na etapa fotoquímica da fotossíntese, ao longo de seis dias após início da aplicação foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap ocorreram de maneira diferenciada. Foram observadas respostas logo após 24 horas da aplicação havendo aumento do desempenho fotossintético pela aplicação AFVC e redução devido à aplicação dos

demais tratamentos. Às 48 e 72 horas, a aplicação de AFVC + K-sap continua mostrando redução no desempenho fotossintético, assim como os demais tratamentos também apresentaram ligeiras reduções no desempenho fotossintético às 72 horas. No entanto, às 120 horas todos os bioestimulantes resultaram em aumento do desempenho fotossintético, sendo mais intenso pela pulverização de AFVC + K-sap, sendo estes resultados repetidos ao final do experimento (144 horas).

De maneira geral, a aplicação de AFVC + K-sap resultou, nos momentos mais tardios, em maior eficiência fotossintética, enquanto nos momentos iniciais desencadeou respostas que reduziram o desempenho fotossintético. Nas primeiras 24 horas há aumento da eficiência fotossintética pela aplicação de AFVC, enquanto apenas às 48 horas esse aumento é observado de maneira mais nítida pela aplicação de K-sap. Apesar dos estímulos iniciais ocorrerem de maneira e intensidades diferentes, todos os bioestimulantes resultaram, com suas devidas proporções, o aumento do desempenho fotossintético.

Em estudo realizado por Castro et al. (2021), os autores observaram que a aplicação de ácidos húmicos de diferentes origens resultou inicialmente em estresse leve na etapa fotoquímica da fotossíntese. Nos momentos mais tardios foi detectado aumento do desempenho fotossintético pela aplicação de AH. Esses autores associaram esse efeito a uma condição de eustresse exercida pelo AH, funcionando como um sinal para alterações fotossintéticas que resultaram em maior desenvolvimento vegetal. No presente trabalho a aplicação de AHVC + K-sap mostrou estímulos semelhantes na fotossíntese aos observados por Castro et al. (2021).

Wang et al. (2019) realizaram aplicação foliar de ácido fúlvico em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.), observando aumento do desempenho fotossintético na etapa fotoquímica da fotossíntese e redução na perda de energia na forma de calor. Rosa et al. (2021) observaram que a utilização de um bioestimulante de pulverização foliar, composto por extrato de alga *Ascophyllum nodosum* L. e ácidos fúlvicos, resultou em uma recuperação mais eficiente das plantas de soja após um período de escassez de água, devido ao restabelecimento mais rápido da atividade fotossintética, dentre outros fatores.

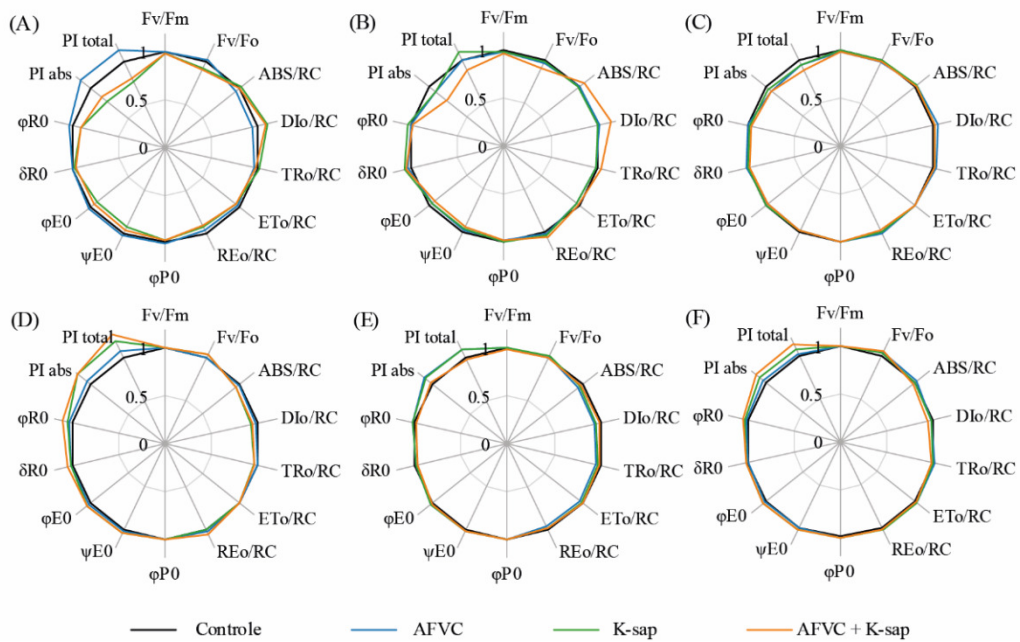


Figura 45. Parâmetros fotossintéticos de plantas de arroz (*Oryza Sativa L.*) cultivadas sob pulverização foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap, pela análise do teste JIP de transientes de fluorescência normalizados usando o controle como referência. Índice de desempenho fotossintético (PIABS), índice de desempenho fotossintético total (PITOTAL), rendimento quântico máximo da fotoquímica primária ($\phi P0$), rendimento quântico do transporte de elétrons de Q ($\phi R0$), rendimento quântico do transporte de elétrons ($\phi E0$), eficiência com a qual um elétron pode mover o intersistema de aceptores de elétrons reduzidos em o intersistema para o receptor final de elétrons FSI (δRv), eficiência com a qual um éxciton capturado no centro de reação (RC) pode mover um elétron de QA – para o intersistema de aceptores de elétrons (OE0), redução do receptor final de elétrons no elétron FSI lado do receptor por RC ($RE0/RC$), fluxo de transporte de elétrons por RC ($ET0/RC$), fluxo de energia dissipada por RC ($DI0/RC$), fluxo de absorção por RC (ABS/RC), fluxo de energia aprisionada por RC ($TR0/RC$), complexo de evolução de oxigênio (OEC). (A) 24 horas; (B) 48 horas; (C) 72 horas; (D) 96 horas; (E) 120 horas; (F) 144 horas. n=5.

Os gráficos de análise de emissão de fluorescência transiente da clorofila *a* normalizada como curva de fluorescência variável relativa OJIP são apresentados na Figura 46 (pontos marcados no gráfico: $O_{50\mu s}$, J_{2ms} , I_{30ms} , e P_{1s}) (Wt) (Figuras 46A, 46D, 46G, 46J, 46M e 46P), assim como os gráficos de fluorescência variável relativa normalizados entre os pontos $O_{50\mu s}$ e I_{30ms} (W_{OI}) (Figuras XB, XE, XH, XK, XN e XQ), e os gráficos de fluorescência variável relativa normalizados entre os pontos I_{30ms} e P_{1s} (W_{IP}) (Figuras 46C, 46F, 46I, 46L, 46O e 46R). Os gráficos W_{IP} demonstram a sequência de eventos de transferência de elétrons a partir do PSI (começando em PQH_2) para os aceptores finais desse fotossistema da planta.

A Figura 51 (APÊNDICES) mostra que as plantas tratadas com os diferentes bioestimulantes foliares apresentaram aumento na sequência da transferência de elétrons conduzida pelo PSI para os aceptores finais de elétrons. As avaliações de cinética não demonstraram a presença de bandas-L (ΔW_{OK}). Segundo Souza et al. (2020), a ausência de banda-L positiva sugere a estabilidade do sistema com a manutenção da conectividade energética e um consumo eficiente da energia de excitação. Variações nas bandas-K (ΔW_{OJ}) estão associados ao desacoplamento do complexo de evolução do oxigênio (DABROWSKI et al., 2016).

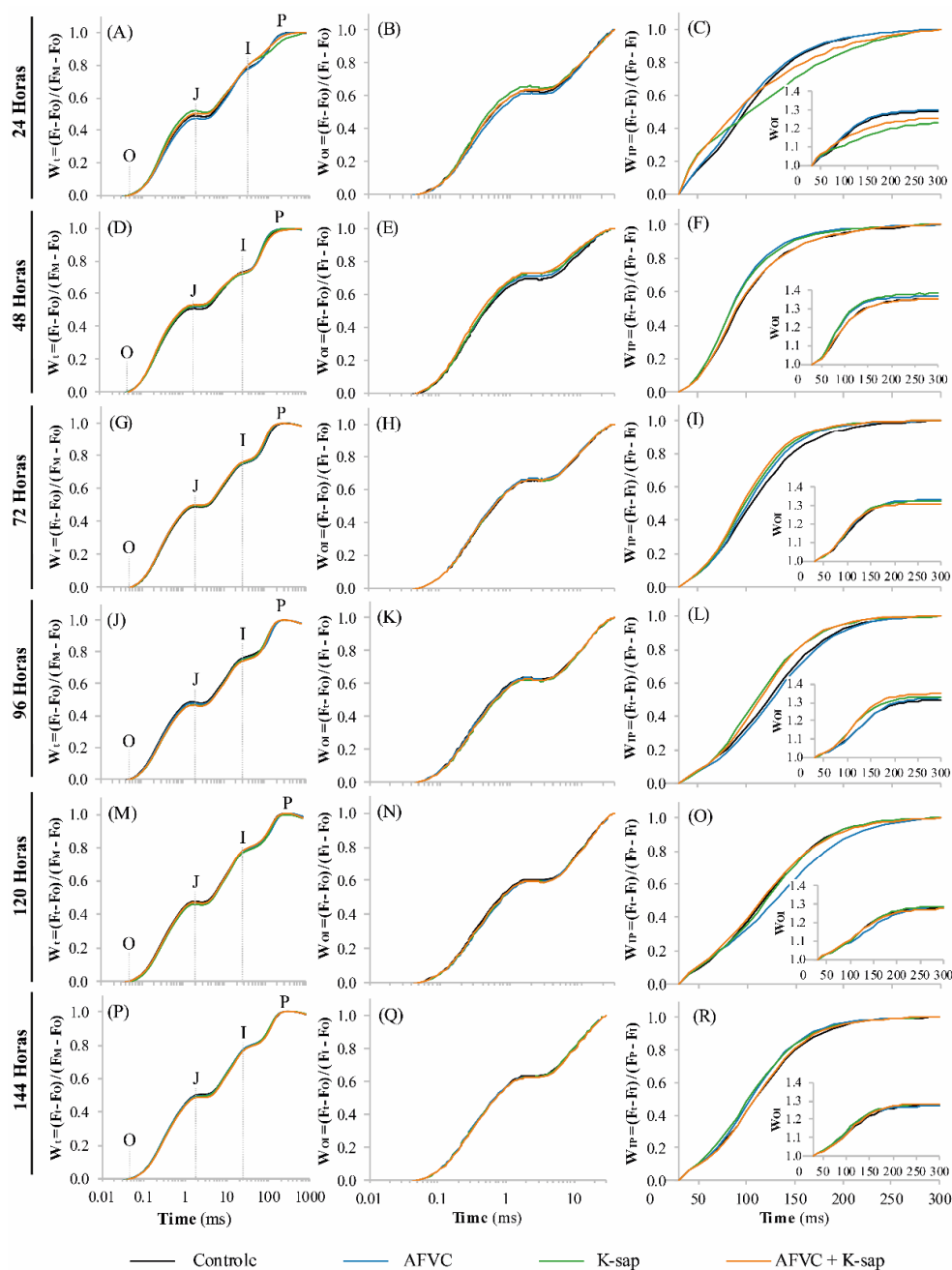


Figura 46. Fluorescência transiente da clorofila α em folhas adaptadas ao escuro de plantas de arroz (*Oryza Sativa L.*) cultivadas sob pulverização foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap. Fluorescência variável relativa entre o O e P (W_t ; A, D, G, J, M, P) em escala logarítmica; Fluorescência variável relativa entre o O e I (W_{OI} ; B, E, H, K, N, Q) em escala logarítmica; Fluorescência variável relativa entre o I e P (W_{IP} ; C, F, I, L, O, R) e W_{OI} no gráfico. $n = 5$.

f) Estímulo dos diferentes bioestimulantes na morfologia radicular

A pulverização foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap estimulou a arquitetura radicular de plantas de arroz (Figura 47). A área radicular não sofreu alterações significativas devido à aplicação dos bioestimulantes (Figura 47A). A aplicação de K-sap e de AFVC + K-sap resultou em raízes com redução significativa de volume, quando comparado ao observado

pela aplicação dos demais tratamentos, que não diferiram significativamente entre si (Figura 47B). A Figura 47C mostra que pulverização de todos os bioestimulantes resultou em aumento significativo de mesmo nível, em comparação com o controle.

A aplicação de K-sap e de AFVC + K-sap foi responsável por significativa redução do diâmetro médio radicular, quando comparado com as raízes dos outros tratamentos, justificando o menor volume radicular observado anteriormente. A aplicação de AFVC não resultou em raízes com diâmetro significativamente diferente do controle (Figura 47D). O número de bifurcações radiculares aumentou significativamente, em relação ao controle, apenas pela pulverização foliar de K-sap, no entanto não diferiu significativamente do estímulo resultante da aplicação de AFVC + K-sap (Figura 47E). A quantidade total de raízes de plantas tratadas com AFVC + K-sap foi significativamente maior do que de plantas controle. A aplicação, separadamente, de AFVC e de K-sap não resultou em número de raízes estatisticamente diferentes dos demais tratamentos (Figura 47F).

A Figura 47G mostra que a quantidade de raízes finas foi significativamente maior em plantas pulverizadas com K-sap e com AFVC + K-sap do que em plantas controle. A aplicação de AFVC não resultou em número de raízes finas estatisticamente diferente do controle e nem dos demais tratamentos com bioestimulantes. O número de raízes médias foi significativamente menor em plantas tratadas com AFVC + K-sap, quando comparado ao observado em plantas controle e às pulverizadas com AFVC, que não diferiram estatisticamente entre si. A aplicação de K-sap foi responsável por número de raízes médias significativamente igual ao de plantas submetidas à AFVC + K-sap, assim como também não diferiu em nível de significância dos demais tratamentos (Figura 47H). O número de raízes grossas foi significativamente menor em plantas submetidas à aplicação de K-sap e de AFVC + K-sap, sendo ainda menor em plantas tratadas com AFVC + K-sap, do que o observado em plantas controle. A aplicação de AFVC não foi responsável por quantidade de raízes grossas estatisticamente diferente do controle e de plantas pulverizadas com K-sap (Figura 47I).

A aplicação de todos os tipos de bioestimulantes resultou em aumento semelhante do comprimento radicular. O número total de raízes foi mais estimulado pela aplicação de AFVC + K-sap, enquanto o número de bifurcações pela pulverização com K-sap. A quantidade de raízes de diferentes classes de diâmetro mostrou respostas diferentes, havendo maior quantidade de raízes finas pela aplicação dos dois bioestimulantes contendo K-sap (K-sap e AFVC + K-sap), e maior quantidade de raízes médias e grossas devido à aplicação de AFVC. Os estímulos na quantidade de raízes de diferentes classes de diâmetro são os principais responsáveis pelas raízes de plantas pulverizadas com K-sap e AFVC+K-sap apresentarem menor diâmetro médio radicular e, conseqüentemente, menor volume radicular.

Não são muitos os estudos que investiguem os efeitos da aplicação de bioestimulantes foliares na morfologia radicular das plantas. Castro et al. (2023) demonstraram que a aplicação foliar de K-sap em plantas de arroz apresenta efeitos estimulantes em diversos parâmetros morfológicos, os quais variam de acordo com as concentrações aplicadas. A aplicação de substâncias húmicas aumenta a quantidade, comprimento e espessamento das raízes, alterando o volume e área radicular (GARCÍA et al., 2016; GARCÍA et al., 2019; TAVARES et al., 2020; DE HITA et al., 2020; CASTRO et al., 2021). A aplicação foliar de AFVC, de K-sap e de AFVC + K-sap resultou em desenvolvimento radicular, influenciando na absorção de água e nutrientes pelas plantas.

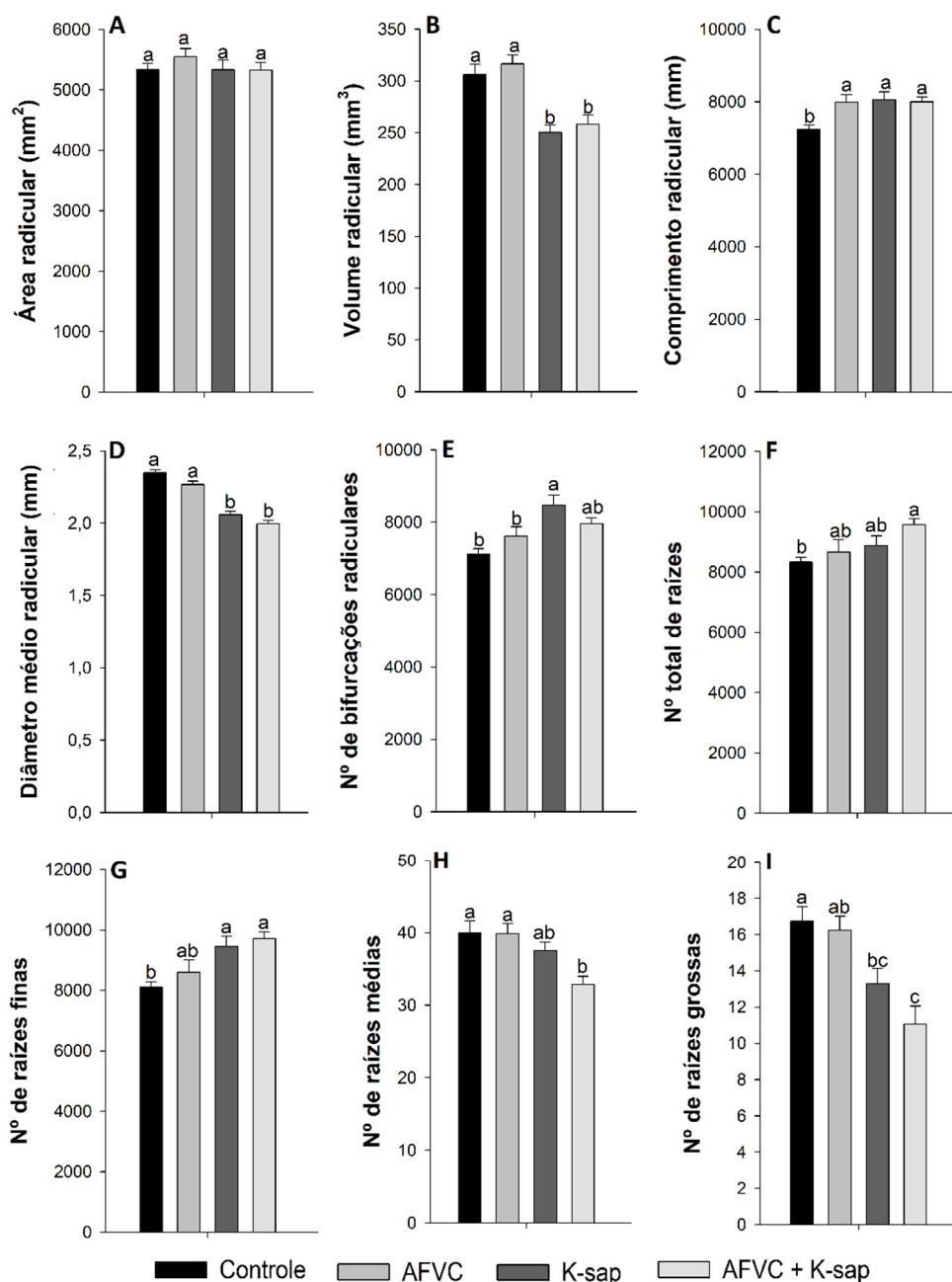


Figura 47. Parâmetros radiculares modificados em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Área (A), volume (B), comprimento (C), diâmetro (D), bifurcações (E), quantidade total de raízes (F), quantidade de raízes finas (G), quantidade de raízes médias (H) e quantidade de raízes grossas (I). Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n = 20$.

g) Produção de biomassa fresca e seca, número de folhas e alturas das plantas por efeito da aplicação foliar de diferentes bioestimulantes mistos

O acúmulo de biomassa fresca e seca em plantas de arroz foi alterado de forma diferenciada devido à aplicação foliar de AFVC, K-sap e AFVC + K-sap (Figura 48) A Figura 48A mostra que a aplicação de todos os tipos de bioestimulantes resultou em aumento significativo da massa fresca de raízes, bainhas e folhas, quando comparado com plantas controle. A acúmulo de massa fresca radicular foi maior em plantas tratadas com AFVC + K-sap, sendo ainda significativamente superior ao observado pela pulverização de K-sap. A

biomassa fresca de raízes de plantas sob aplicação de AFVC não diferiu significativamente do observado pela aplicação dos demais tratamentos com bioestimulantes. A massa fresca da bainha apresentou valores estatisticamente semelhantes devido à aplicação dos diferentes bioestimulantes. Nas folhas, o acúmulo de biomassa fresca foi mais intenso por meio da aplicação AFVC + K-sap, sendo significativamente superior ao observado pela pulverização com AFVC. O tratamento com K-sap não resultou em produção de biomassa fresca foliar significativamente diferente do observado em plantas tratadas com AFVC e com AFVC + K-sap.

A produção de biomassa seca de raízes, bainhas e folhas de plantas de arroz foi estimulada pela aplicação de todos os tipos de bioestimulantes, porém em alguns casos sem diferir estatisticamente do controle. A massa seca radicular foi significativamente maior em plantas tratadas com AFVC e AFVC + K-sap, quando comparado com o controle. A aplicação foliar de K-sap não resultou em massa seca de raízes significativamente diferente do que o observado em plantas controle. A massa seca das bainhas foi significativamente maior do que a de plantas controle devido à aplicação de todos os tipos de bioestimulantes, no entanto, com intensidades diferentes. A aplicação de AFVC resultou na maior produção de biomassa seca das bainhas, sendo significativamente superior ao observado em plantas tratadas com K-sap. A pulverização com AFVC + K-sap mostrou valores de massa seca das bainhas estatisticamente semelhantes aos demais tratamentos com bioestimulantes. A biomassa seca das folhas foi significativamente maior em plantas tratadas com K-sap e AFVC + K-sap, quando comparado com o controle. A pulverização foliar de AFVC não resultou em massa seca de folhas significativamente diferente do que o observado em plantas controle, porém também não teve diferença significativa com plantas tratadas com K-sap (Figura 48B).

A Figura 48C mostra que a aplicação de AFVC + K-sap resultou em plantas significativamente maiores do que o controle. A pulverização com AFVC e com K-sap, separadamente, não resultou em altura das plantas estatisticamente diferente aos demais tratamentos. O número de folhas por planta mostrou superioridade significativa ao controle em plantas tratadas com K-sap e com AFVC + K-sap, sendo este último tratamento o que mais estimulou o aumento. A aplicação de AFVC não resultou em plantas com número de folhas significativamente diferente do observado em plantas controle, assim como também não diferiu estatisticamente de plantas pulverizadas com K-sap (Figura 48D).

De modo geral, aplicação foliar de todos os tipos de bioestimulantes resultou em aumento na produção de massa fresca e seca de plantas de arroz, porém, os resultados mostram que a mistura contendo os dois bioestimulantes (AFVC + K-sap) foi responsável pelo maior acúmulo de biomassa em todos os órgãos vegetais, pela maior altura das plantas e número de folhas por planta. Ao comparar isoladamente os estímulos desencadeados pelo AFVC e pelo K-sap, observamos que a pulverização com AFVC favoreceu com maior intensidade a produção de biomassa radicular, enquanto a aplicação de K-sap resultou em maior produção de biomassa foliar, provavelmente associado ao maior número de folhas por planta observados neste tratamento.

A literatura relata que a aplicação de ácidos húmicos e fúlvico aumentou a absorção de nutrientes e a produção de biomassa em plantas de gérbera, berinjela tomate, pimenta e alface (NIKBAKHT et al., 2008; KAMEL et al., 2014; SUH et al., 2014; AKLADIOUS & MOHAMED, 2018; WANG et al., 2019). Outros estudos mostram que a aplicação foliar de extratos de *Kappaphycus alvarezii* contribuiu para o aumento do crescimento e rendimento em cultivos de banana, arroz, batata e cana-de-açúcar (KARTHIKEYAN & SHANMUGAM., 2014; DEVI & MANI, 2015; KARTHIKEYAN & SHANMUGAM, 2017; PRAMANICK et al., 2017). Alguns autores relataram que aplicação de conjunta de substâncias húmicas e extratos de algas marinhas desencadearam diferentes estímulos em plantas de colza, batata,

trigo e soja (BILLARD et al., 2013; WADAS & DZIUGIL, 2019; NAZIROLESMANI et al., 2021; ROSA et al., 2021).

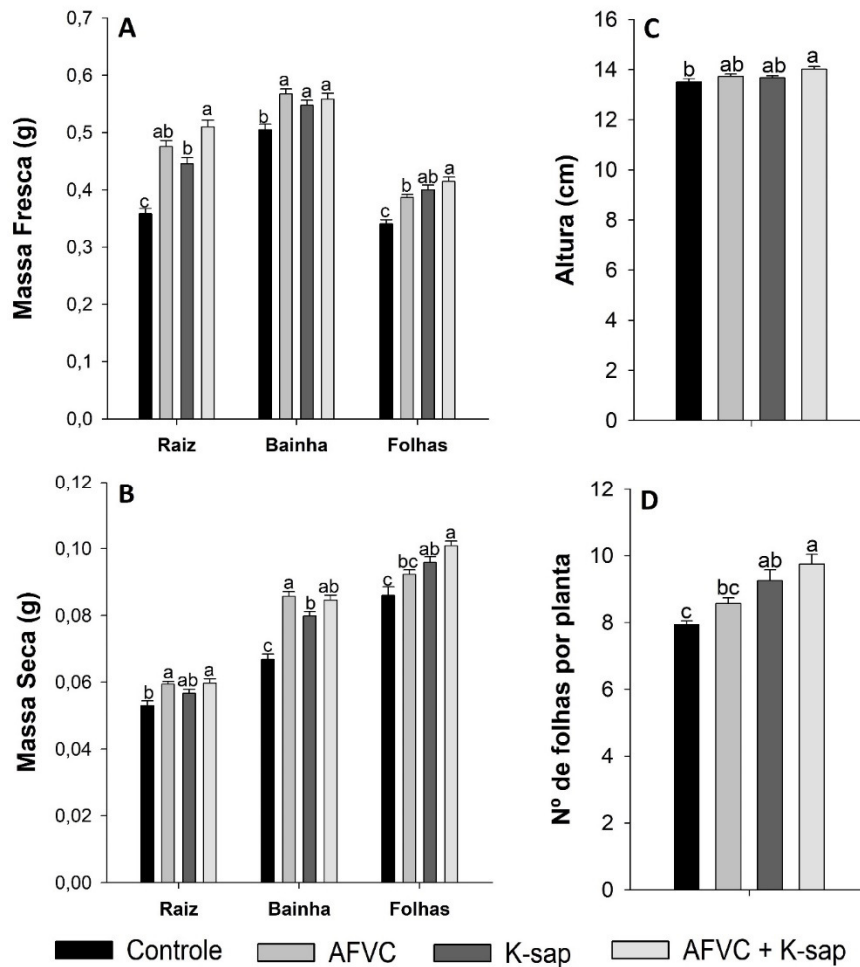


Figura 48. Produção de biomassa fresca (A) e seca (B), altura das plantas (C) e número de folhas por planta (D) de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas com diferentes bioestimulantes foliares. Barras com a mesma letra não diferiram significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), $n=20$.

h) Análise de componentes principais

A análise de componentes principais baseada nos parâmetros morfológicos radiculares e na biomassa fresca e seca de raízes, bainhas e folhas, explicou 88% da variabilidade total nas duas primeiras componentes, sendo que 66,7% da variância foi explicada pela componente principal 1 (Dim1), estando positivamente associada à todas variáveis. A componente principal 2 (Dim2) explicou 21,3% da variabilidade dos dados, sendo o diâmetro médio radicular (DMR), volume radicular (VR), número de raízes grandes (N°RG), número de raízes média (N°RM), área radicular (AR) e massa seca radicular (MR), positivamente correlacionado à esta componente (Figura 49).

Analisando os resultados é possível observar que os estímulos sobre a arquitetura radicular e produção de biomassa foram maiores em plantas pulverizadas com AFVC + K-sap, havendo correlação positiva com os estímulos desencadeados pela aplicação somente de K-sap, resultando em plantas mais desenvolvidas. No entanto, em relação a produção de biomassa seca radicular, a aplicação de AFVC resultou em maior acúmulo, justificado pelo maior número de raízes médias e grossas, assim como pelo maior diâmetro médio, área e volume radicular.

Sendo assim, plantas de arroz submetidas à pulverização foliar de AFVC + K-sap tiveram maior desenvolvimento radicular e produção de biomassa, seguidas pelas tratadas com K-sap e, por fim, pelas pulverizadas com AFVC. O maior desenvolvimento das plantas tratadas com o bioestimulante misto é resultado do maior desempenho fotossintético, da regulação gênica diferenciada e de alterações nos teores de metabólitos solúveis e nutrientes na planta.

Em estudo realizado por Olaetxea et al. (2018), os autores destacaram que os efeitos benéficos dos bioestimulantes aplicados nas folhas provavelmente são regulados por mecanismos distintos daqueles desencadeados pela aplicação radicular desses compostos naturais. De acordo com Chen & Aviad (1990), a pulverização foliar de bioestimulantes tem a capacidade de estimular o desenvolvimento tanto das raízes quanto da parte aérea das plantas tratadas, e esse método pode ser mais econômico em comparação à aplicação ao solo, devido à demanda de quantidades relativamente pequenas de produtos. Além disso, um estudo conduzido por Kishor et al. (2020) constatou que a aplicação combinada de substâncias húmicas via foliar e ao solo, juntamente com 100% da dose recomendada de fertilizante (NPK), representou o tratamento mais eficiente e rentável em plantas de café, resultando em um aumento significativo no rendimento.

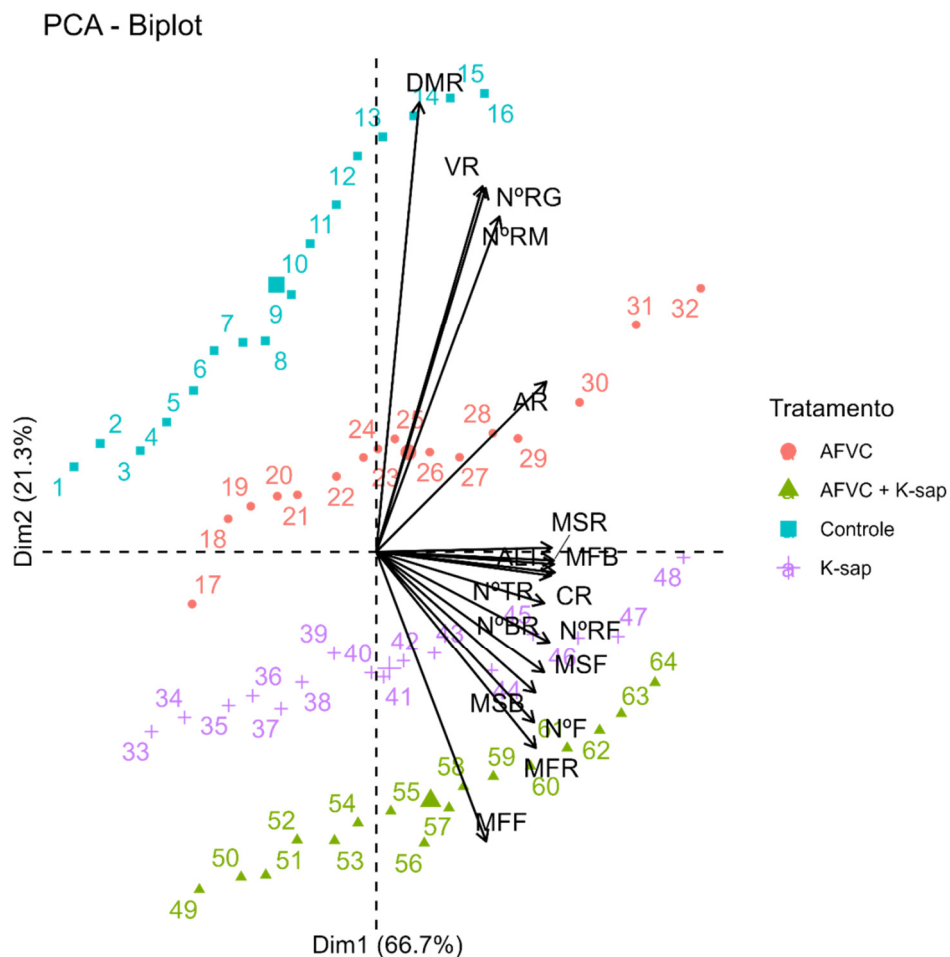


Figura 49. Análise das componentes principais da produção de biomassa fresca e seca de raízes, bainhas e folhas, altura das plantas, número de folhas por planta e morfologia radicular de plantas de arroz sob aplicação de diferentes bioestimulantes foliares.

5.6 CONCLUSÕES

A aplicação de todos os bioestimulantes resultou em plantas mais desenvolvidas, porém, a pulverização foliar do bioestimulante misto composto por AHVC + K-sap estimulou em maior intensidade o crescimento e produção vegetal. O aumento da produção de biomassa vegetal foi resultado de efeitos sobre o incremento do desempenho fotossintético, regulação gênica, absorção de nutrientes, metabolismo de N e C e desenvolvimento radicular.

Os estímulos iniciais na etapa fotoquímica da fotossíntese e de regulações a nível fisiológico foram diferentes devido à aplicação de cada bioestimulante. A aplicação de K-sap resultou em plantas com maior acúmulo de biomassa foliar, enquanto a aplicação de AFVC foi responsável por plantas com maior acúmulo de biomassa radicular, quando comparadas entre si. Já a aplicação de AFVC + K-sap resultou em plantas com a maior produção de biomassa radicular e de parte aérea entre todas. O modo de ação desencadeado pelos bioestimulantes aplicados foliarmente parece ser diferente do que é relatado na literatura como resultado de aplicações radiculares, sendo necessárias mais investigações.

A pulverização foliar de AFVC, K-sap e AFVC +K-sap mostrou potencialidades em ter seu uso como bioestimulantes vegetais, aumentando tanto o desenvolvimento de raízes quanto da parte aérea, podendo ser mais econômico do que a aplicação ao solo, e aumentando a eficiência na absorção e assimilação de nutrientes, o que pode resultar em menor consumo de fertilizantes durante o ciclo da cultura.

6. CONCLUSÕES GERAIS

As características físico-químicas das substâncias húmicas e dos extratos de *Kappaphicus alvarezii* resultaram em diferentes propriedades e bioatividade exercida em plantas, havendo diferenças sobre a expressão de genes, regulação hormonal, fotossíntese, absorção de nutrientes, quantidades de metabólitos, arquitetura radicular e acúmulo de biomassa. De maneira geral, a aplicação de todos os compostos naturais resultou em plantas com maior desenvolvimento, porém de forma diferenciada dependendo de suas características estruturais.

A aplicação radicular e foliar de AFVC e de K-sap resultou em estímulos diferenciados sobre o crescimento radicular e produção de biomassa, sendo as doses de melhor resposta diferentes para cada composto e forma de aplicação. Tanto para AFVC quanto para K-sap, foram necessárias aplicações em concentrações menores nas raízes do que nas folhas.

Os custos associados à produção e comercialização destes bioestimulantes foliares são considerados baixos, uma vez que são extraídos de compostos naturais e pulverizados em doses consideradas baixas, além do potencial para serem utilizadas na conservação e no manejo de ecossistemas naturais e agrícolas, pois são biodegradáveis e não-tóxicos.

O bioestimulante foliar misto com AFVC à 80 mg L⁻¹ + K-sap à 2% mostrou potencialidades para ser usado comercialmente em cultivo de plantas de arroz, sendo necessários novos estudos em que haja realização de cultivos mais longos e contínuos, visando a validação final do produto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-BAKY, Y. R.; ABOUZIENA, H. F.; AMIN, A. A. Improve quality and productivity of some faba bean cultivars with foliar application of fulvic acid. **Bull Natl Res Cent**, v. 43, p. 2, 2019.
- ADRIANO, D. C.; PAULSEN, G. M.; MURPHY, L. S. Phosphorus-iron and phosphorus-zinc relationship in corn (*Zea mays* L.) seedlings as affected by mineral nutrition. **Agronomy Journal**, v. 63, p. 36-39, 1971.
- AGUIAR, N. O.; MEDICI, L. O.; OLIVARES, F. L.; DOBBS, L. B.; TORRES-NETTO, A.; SILVA, S. F.; NOVOTNY, E. H.; CANELLAS, L. P. Metabolic profile and antioxidante responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. **Annals of Applied Biology**, v. 168, p. 203-213, 2016.
- AGUIAR, N. O.; NOVOTNY, E. H.; OLIVEIRA, A. L.; RUMJANEK, V. M.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, p. 95-102, jun. 2013.
- AGUIRRE, E.; LEMÉNAGER, D.; BACAICOA, E.; FUENTES, M.; BAIGORRI, R.; ZAMARREÑO, A.M.; GARCÍA-MINA, J. M. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. **Plant Physiol. Biochem**, v. 47, p. 215-223, 2009.
- AHMAD, I.; MIAN, A.; MAATHUIS, F. J. Overexpression of the rice AKT1 potassium channel affects potassium nutrition and rice drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 67(9), p. 2689-2698, 2016.
- AKLADIOUS, S. A.; MOHAMED, H. I. Ameliorative effects of calcium nitrate and humic acid on the growth, yield component and biochemical attribute of pepper (*Capsicum annum*) plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 236, p. 244-250, 2018.
- ALEMÁN, F.; NIEVES-CORDONES, M.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. Root K(+) acquisition in plants: the *arabidopsis thaliana* model. **Plant Cell Physiol.**, v. 52, p. 1603-1612, 2011.
- ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 2, p. 105-117, 2011.
- ALVAREZ, M. A. B.; GAGNÉ, S.; ANTOUN, H. Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on the incidence of plant growth-promoting rhizobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 194-199, 1995.
- ALY, M. S.; ESAW, M. A. Evaluation of *Spirulina Platensis* as Bio Stimulator for Organic Farming Systems. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2008.
- AMERI, A.; TEHRANIFAR, A. Effect of humic acid on nutrient uptake and physiological characteristic *Fragaria ananassa* var: *camarosa*. **Journal of Biological Environmental Science**, v. 6, p. 77-79, jul. 2013.

AMERI, A.; TEHRANIFAR, A. Effect of humic acid on nutrient uptake and physiological characteristic *Fragaria ananassa* var: camarosa. **Journal of Biological Environmental Science**, v. 6, p. 77-79, 2012.

AMMAR, E. E.; AIOUB, A. A.; ELESAWY, A. E.; KARKOUR, A. M.; MOUHAMED, M. S.; AMER, A. A.; EL-SHERSHABY, N. A. Algae as bio-fertilizers: Between current situation and future prospective. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, p. 3083-3096, 2022.

ANWAR, A.; LI, Y.; HE, C. 24-Epibrassinolide promotes NO_3^- and NH_4^+ ion flux rate and NRT1 gene expression in cucumber under suboptimal root zone temperature. **BMC Plant Biol**, v. 19, p. 225, 2019.

ARANCON, N. Q.; EDWARDS, C. A.; LEE, S.; BYRNE, R. Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. 65-69, nov. 2006.

ARECES, A. J. Cultivo comercial de carragenofitas del gênero *Kappaphycus*. In: ALVEAL, K.; FERRARIO, E.; OLIVEIRA, E. C.; SAR, E. (Eds.). **Manual de métodos ficológicos**. Universidad de Concepción, Concepción, p. 529-550, 1995.

ASIK, B.; TURAN, M.; ÇELIK, H.; KATKAT, A. Effects of Humic Substances on Plant Growth and Mineral Nutrients Uptake of Wheat (*Triticum durum* cv. Salihli) Under Conditions of Salinity. **Asian Journal of Crop Science**, 2009.

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

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

AZCONA, I.; PASCUAL, I.; AGUIRREOLEA, J.; FUENTES, M.; GARCIA-MINA, J.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Growth and development of pepper are affected by humic substances derived from composted sludge. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 174, p. 916-924, 2011.

AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas**: Estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. UFRJ, 2012. 171p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 979-990, 2009.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; SOARES, R. R.; MARTINEZ, H. E. P.; VENEGAS, V. H. A. Adventitious rooting in cuttings of croton and hibiscus in response to indolbutyric acid and humic acid. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 4, p. 476-483, jul./ago. 2012.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 7, p. 856-881, nov./dez. 2014.

BALDOTTO, M. A.; MUNIZ, R. C.; BALDOTTO, L. E. B.; DOBBSS, L. B. Root growth of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. treated with humic acids isolated from typical soils of Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista Ceres**, v. 58, n. 4, p. 504-511, 2011.

BALDOTTO, M. A.; CANELLAS L. P.; CANELA M. C.; REZENDE C. E.; VELLOSO, A. C. X. Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de solo cultivado com cana-de-açúcar por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 3, p. 1043-1052, 2008.

BAO, A.; ZHAO, Z.; DING, G.; SHI, L.; XU, F.; CAI, H. Accumulated expression level of cytosolic glutamine synthetase 1 gene (OsGS1;1 or OsGS1;2) alter plant development and the carbon-nitrogen metabolic status in rice. **PLoS One**, v. 9, e95581, 2014.

BASAVARAJA, P. K.; YOGENDRA, N. D.; ZODAPE, S. T.; PRAKASH, R.; GHOSH, A. Effect of seaweed sap as foliar spray on growth and yield of hybrid maize. **J. Plant Nutr.**, v. 41, p. 1851-1861, 2018.

BERBARA, R. L.; GARCÍA, A. C. Humic substances and plant defense metabolism. In: AHMAD, P.; WANI, M. R. (Eds). **Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment**. Springer, New York, v. 1, p. 297-319, 2014.

BHATTACHARYA, D.; QIU, H.; PRICE, D. C. Why we need more algal genomes. **J. Phycol.**, v. 51, p. 1-5. 7, 2015.

BHUPENCHANDRA, I.; DEVI, S. H.; BASUMATARY, A.; DUTTA, S.; SINGH, L. K.; KALITA, P.; BORAH, K. Biostimulants: Potential and Prospects in Agriculture. **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, p. 20-35, 2020.

BILLARD, V.; ETIENNE, P.; JANNIN, L.; GARNICA, M.; CRUZ, F.; GARCIA-MINA, J. M. Two biostimulants derived from algae or humic acid induce similar responses in the mineral content and gene expression of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). **J. Plant Growth Regul.**, v. 33, p. 305-316, 2013.

BIXLER, H.J.; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 321-335, 2011.

BLANK, C. E.; HINMAN, N. W. Cyanobacterial and algal growth on chitin as a source of nitrogen; ecological, evolutionary, and biotechnological implications. **Algal Research**, v. 15, p.152-163, 2016.

BLUNDEN, G. Agricultural uses of seaweeds and seaweed extracts. In: GUIRY, M. D.; BLUNDEN, G. (Eds.) **Seaweed Ressources in Europe: Uses and Potential**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, p. 65-81, 1991.

BLUNDEN, G.; JENKINS, T.; LIU, Y. W. Enhanced leaf chlorophyll levels in plants treated with seaweed extract. **J Appl Phycol**, v. 8, p. 535-543, 1996.

BOCANEGRA, M. P.; LOBARTINI, J. C.; ORIOLI, G. A. Plant uptake of iron chelated by humic acids of different molecular weights. **Commun. Soil Sci. Plan.**, v. 37, p. 239-248, 2006.

BOTERO, W. G. **Substâncias húmicas: interações com nutrientes e contaminantes**. 2010. 75 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

BULGARI, R.; COCETTA, G.; TRIVELLINI, A.; VERNIERI, P.; FERRANTE, A. Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems*, v. 31, p. 1-17, 2015.

BUSCHMANN, A. H.; CAMUS, C.; INFANTE, J.; NEORI, A.; ISRAEL, Á.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C.; PEREDA, S. V.; GOMEZ-PINCHETTI, J. L.; GOLBERG, A.; TADMOR-SHALEV, N.; CRITCHLEY, A. T. Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity. *Eur J Phycol* 52, p. 391-406, 2017.

BUSTAMANTE EGUIGUREN, S.; ANNGUYEN, H.; CALDWELL, A.; NOLIN, K. A.; WU, C. A. Convergence of glandular trichome morphology and chemistry in two montane monkeyflower (*Mimulus*, Phrymaceae) species. *Flora*, v. 151, p. 567, 2020.

CAKMAK, E. K.; HARTL, M.; KISSER, J.; CETECIOGLU, Z. Phosphorus mining from eutrophic marine environment towards a blue economy: The role of bio-based applications. *Water Research*, v. 219, p. 118-505, 2022.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, v. 383, n. 1-2, p. 3-41, 2014.

CAMPBELL, M. T.; BANDILLO, N.; AL SHIBLAWI, F. R. A.; SHARMA, S.; LIU, K.; DU, Q.; SCHMITZ, A. J.; ZHANG, C.; VÉRY, A. A.; LORENZ, A. J.; WALIA, H. Allelic variants of OsHKT1;1 underlie the divergence between indica and japonica subspecies of rice (*Oryza sativa*) for root sodium content. *PLoS Genet.*, v. 13, 2017.

CAMPBELL, R.; HOTCHKISS, S. Chapter 13: Carrageenan industry market overview. In: A. Q. HURTADO, A. Q.; CRITCHLEY, A. T.; NEISH, I. C. (Eds.) **Tropical seaweed farming trends, problems and opportunities**. Springer International Publishing, p. 193-205, 2017.

CANELLAS, L. P.; DANTAS, D. J.; AGUIAR, N. O.; PERES, L. E. P.; ZSOGON, A.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; FAÇANHA, A. R.; NEBBIOSO, A.; PICCOLO, A. Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *Annals of Applied Biology*, v. 159, p. 202-211, 2011.

CANELLAS, L. P.; DOBBSS, L. B.; OLIVEIRA, A. L.; CHAGAS, J. G.; AGUIAR, N. O.; RUMJANEK, V. M.; NOVOTNY, E. H.; OLIVARES, F. L.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *European Journal of Soil Science*, p. 1-10, abr. 2012.

CANELLAS, L. P.; MARTÍNEZ-BALMORI, D.; MÉDICI, L.O.; AGUIAR, N.O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R.C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F.L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*, v. 366, p. 119-132, mai. 2013.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; JONES, D. L.; NEBBIOSO, A.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, v. 196, p. 15-27, nov. 2015.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. **Humosfera**: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. 1. ed. Campo dos Goytacazes: UENF, 309 p. 2005.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; FAÇANHA, A. R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiol**, v. 4, p. 1951-1957, 2002.

CANELLAS, L. P.; PICCOLO, A.; DOBBSS, L. B.; SPACCINI, R.; OLIVARES, F. L.; ZANDONADI, D. B.; FAÇANHA, A. R. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. **Chemosphere**, v. 78, n° 4, p. 457-466, 2010.

CAO, Y.; CHANG, Z.; WANG, J.; MA, Y.; YANG, H.; FU, G. Potential use of anaerobically digested manure slurry to suppress *Phytophthora* root rot of chilli pepper. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 124-131, 2014.

CASTRO, T. A. V. T.; TAVARES, O. C. H.; OLIVEIRA TORCHIA, D. F.; SILVA, H. F. O.; MOURA, O. V. T.; CANTARINO, R. E.; ABREU LOPES, S.; VIÊGAS, C. V.; AMARAL VENDRAMINI, A. L.; SANTOS, L. A.; BERBARA, R. L. L. Organic fragments of k-carrageenan, lipids and peptides plus K-rich inorganic fraction in *Kappaphycus alvarezii* biomass are responsible for growth stimulus in rice plant when applied both foliar and root pathway. **Algal Res**, v. 71, 2023.

CASTRO, T. A.V. T.; BERBARA, R. L. L.; TAVARES, O. C. H.; MELLO, D. F. G.; PEREIRA, E. G.; SOUZA, C. C. B.; ESPINOSA, L. M.; GARCÍA, A. C. Humic acids induce a eustress state via photosynthesis and nitrogen metabolism leading to a root growth improvement in rice plants. **Plant Physiol Biochem**, v.162, p. 171-84, 2021.

CASTRO, T. A. V. T.; GARCÍA, A. C.; TAVARES, O. C.; PEREIRA, E. G; SOUZA, C. C. B; TORCHIA, D. F. O.; PINHO, C. F.; CASTRO, R. N. Humic acids affect photosynthetic quantum efficiency in rice under water deficit. *Theor. Exp. Plant Physiol.*, v. 34, p. 463-483, 2022.

CECCARELLI, A.V.; MIRAS-MORENO, B.; BUFFAGNI, V.; SENIZZA, B.; PII, Y.; CARDARELLI, M.; LUCINI, L. Foliar application of different vegetal-derived protein hydrolysates distinctively modulates tomato root development and metabolism. **Plants**, v. 10, p. 326, 2021.

CHANG, Y. L.; LI, W. Y.; MIAO, H.; YANG, S. Q.; LI, R.; WANG, X.; LI, W. Q.; CHEN, K. M. Comprehensive genomic analysis and expression profiling of the NOX gene families under abiotic stresses and hormones in plants. **Genome Biol. Evol.**, v. 8, p. 791–810, 2016.

CHE, Y.; FAN, D.; WANG, Z.; XU, N.; ZHANG, H.; SUN, G.; CHOW, W. S. Potassium mitigates salt-stress impacts on photosynthesis by alleviation of the proton diffusion potential in thylakoids. **Environ. Exp. Bot.**, v. 194, 2022.

CHEN, Y.; AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. In: MACCARTHY, P. (Ed.) **Humic substances in soil and crop science**: selected readings. SSSA and ASA, Madison, Wisconsin, USA, p. 161-186, 1990.

CHOJNACKA, K.; SAEID, A.; MICHALAK, I. The possibilities of the application of algal biomass in the agriculture. **Chemik**, v. 66, n. 11, p. 1235-1248, 2012.

CHOUDHARY, P.; KHADE, M.; SAVANT, S.; MUSALE, A.; CHELLIAH, M. S.; DASGUPTA, S. Empowering blue economy: from underrated ecosystem to sustainable industry. **J. Environ. Manag.**, v. 291, 2021.

COLLA, G.; NARDI, S.; CARDARELLI, M.; ERTANI, A.; LUCINI, L.; CANAGUIER, R. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. **Sci. Hortic**, v. 196, p. 28-38, 2015.

COLLA, G.; ROUPHAEL, Y. Bio-stimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 1-2, 2015.

CONSELVAN, G. B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; DI FOGGIA, M.; NARDI, S.; CARLETTI, P. Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites. **Plant Soil**, v. 420(1-2), p. 1-16, 2017.

COTTIER-COOK, E. J.; NAGABHATLA, N.; BADIS, Y. **Safeguarding the future of the global seaweed aquaculture industry**. United Nations University (INWEH) and Scottish Association for Marine Science Policy Brief, 2016.

CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **J. Appl. Phycol.**, v. 23, p. 371-393, 2011.

CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2011.

CROUCH, I.J.; VAN STADEN, J. Effect of seaweed concentrate on the establishment and yield of greenhouse tomato plants. **J Appl Phycol**, v.4, p. 291-296, 1992.

DAL FERRO, N.; BERTI, A.; FRANCIOSO, O.; FERRARI, E.; MATTHEWS, G. P.; MORARI, F. Investigating the effects of wettability and pore size distribution on aggregate stability: The role of soil organic matter and the humic fraction. **European Journal of Soil Science**, v. 63, p. 152-164, abr. 2012.

DAL FERRO, N.; BERTI, A.; FRANCIOSO, O.; FERRARI, E.; MATTHEWS, G. P.; MORARI, F. Investigating the effects of wettability and pore size distribution on aggregate stability: The role of soil organic matter and the humic fraction. **European Journal of Soil Science**, v. 63, p. 152-164, 2012.

DE HITA, D.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ, V.; ZAMARREÑO, A. M.; OLAETXEA, M.; GARCÍA-MINA, J. M. Discriminating the Short-Term Action of Root and Foliar Application of Humic Acids on Plant Growth: Emerging Role of Jasmonic Acid. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

DE PASCALE, S.; ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Plant biostimulants: innovative tool for enhancing plant nutrition in organic farming. **Eur. J. Hortic. Sci.**, v. 82, p. 277-285, 2018.

DEVI, N. L.; MANI, S. Effect of seaweed saps *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria* on growth, yield and quality of rice. **Indian J. sci. Technol.**, v. 8, p. 1-6, 2015.

DICK, D. P.; GOMES, J.; ROSINHA, P. B. Caracterização de substâncias húmicas extraídas de solos e de lodo orgânico. **Rev Bras Cienc Solo**, v. 22, 603-611, 1998.

DJAJADI; ABBOTT, L. K.; CHRISTOPH HINZ. Synergistic impacts of clay and organic matter on structural and biological properties of a sandy soil. **Geoderma**, v. 183-184, p. 19-24, ago. 2012.

DJAJADI; ABBOTT, L. K.; CHRISTOPH HINZ. Synergistic impacts of clay and organic matter on structural and biological properties of a sandy soil. **Geoderma**, v. 183-184, p. 19-24, 2012.

DOANE, T. A.; HORWÁTH, W. R. Spectrophotometric Determination of Nitrate with a Single Reagent. **Analytical Letters**, v. 36, n. 12, p. 2713-2722, 2003.

DOBBSS, L.; MEDICI, L.; PERES, L.; PINO-NUNES, L.; RUMJANEK, V.; FAÇANHA, A.; CANELLAS, L. Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols. **Annals of Applied Biology**, v. 151, p. 199-211, jul. 2007.

DOBBSS, L. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N.O.; PERS, L. E. P.; AZEVEDO, M.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; FAÇANHA, A.R. 2010. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3681-3688, 2010.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Sci. Hortic**, v. 196, p. 3-14, 2015.

DU JARDIN, P. **The Science of Plant Biostimulants - A bibliographic analysis**. Ad hoc Study Report to the European Commission DG ENTR. 2012.

DWIVEDI, S. K.; MESHARAM, M.; PAL, A.; PANDEY, N.; GHOSH, A. Impact of natural organic fertilizer (seaweed saps) on productivity and nutrient status of blackgram. **The bioscan**, v. 9, p. 1535-1539, 2014.

EHA, K.; PEHK, T.; HEINMAA, I.; KALEDA, A.; LAOS, K. **Impact of short-term heat treatment on the structure and functional properties of commercial furcellaran compared to commercial carrageenans**. *Heliyon*, v. 7, 2021.

EL-GHAMRY, A. M.; KAMAR, M. A. E.; GHONEEM, K. M. **Amino and humic acids promote growth, yield and disease resistance of Faba bean cultivated in clayey soil**. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 3, p. 731-739, 2009.

ERTANI, A.; SCHIAVON, M.; ALTISSIMO, A.; FRANCESCHI, C.; NARDI, S. Phenol-containing organic substances stimulate phenylpropanoid metabolism in *Zea mays*. **J Plant Nutr Soil Sci.**, v. 174, p. 496-503, 2011.

ERTANI, A.; SCHIAVON, M.; MUSCOLO, A. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. **Plant Soil**, v. 364, p. 145-158, 2013.

ERTHAL, V. J. T.; FERREIRA, P. A.; PEREIRA, O. G.; MATOS, A. T. Características fisiológicas, nutricionais e rendimento de forrageiras fertigadas com água residuária de bovinocultura. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, Campina Grande, v. 14, n. 5, p. 458-466, mai. 2010.

ESBENSEN, K. H.; GUYOT, D.; WESTAD, F.; HOUMOLLER, L. P. Multivariate data analysis: inpractice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design. In: **Multivariate Data Analysis**, 2002.

ESWARAN, K; GHOSH, P. K.; SIDDHANTA, A. K.; PATOLIA. J. S.; PERIASAMY, C.; MEHTA, A. S.; MODY, K. H.; RAMAVAT, B. K.; PRASAD, K.; RAJYAGURU, M. R.; REDDY, C. R. K.; PANDYA, J. B.; TEWARI, A. **Intregated method for production of carrageenan and liquid fertilizer from fresh seaweeds**, US Patent No. 6893479, 2005.

EYHERAGUIBEL, B.; SILVESTRE, J.; MORARD, P. Effects of humic substances from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4206, 2008.

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

FAN, X.; FENG, H.; TAN, Y.; XU, Y.; MIAO, Q.; XU, G. A. Putative 6-transmembrane nitrate transporter OsNRT1.1b plays a key role in rice under low nitrogen. **J. Integr. Plant Biol.**, v. 58, p. 590-599, 2016.

FAO Food and Agriculture Organization. **The Future of Food And Agriculture -Alternative Pathways to 2050**. Rome. 2018.

FAO Food and Agriculture Organization. **The State of World Fisheries And Aquaculture 2020**. Sustainability in action, Rome, 2020.

FAO Food and Agriculture Organization. **The State of World Fisheries And Aquaculture - Meeting the Sustainable Development Goals**. Rome. 2018.

FAO Food and Agriculture Organization. **Yearbook of fishery statistics**. Rome: Food and Agricultural Organization of United Nations, 2006.

FAO, WHO. **Report of the expert meeting on food safety for seaweed-current status and future perspectives**. Rome, 28-29 October 2021. Food safety and quality series no. 13. Rome. 2021.

FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v. 49, 1977.

FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba**, v. 34, p. 9-18, 1984.

FERREIRA, L. M. **Características morfológicas, fisiológicas e transcriptoma em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) contrastantes quanto a tolerância ao estresse hídrico.** 2017. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2017.

FORDE, B. G.; LEA, P. J. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. **J Exp Bot**, v. 58, p. 2339-2358, 2007.

FUKUDA, A.; NAKAMURA, A.; HARA, N.; TOKI, S.; TANAKA, Y. Molecular and functional analyses of rice NHX-type Na⁺/H⁺ antiporter genes. **Planta**, v. 233, p. 175-188, 2011.

FUNAYAMA, K.; KOJIMA, S.; TABUCHI-KOBAYASHI, M.; SAWA, Y.; NAKAYAMA, Y.; HAYAKAWA, T.; YAMAYA, T. Cytosolic glutamine synthetase1;2 is responsible for the primary assimilation of ammonium in rice roots. **Plant Cell Physiol.**, v. 54, p. 934-943, 2013.

GOMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food Hydrocoll.**, v. 25, p. 1514-1520, 2011.

GAJC-WOLSKA, J.; SPIZEWSKI, T.; GRABOWSKA, A. The effect of seaweed extracts on the yield and quality parameters of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *cymosa* L.) in open field production. **Acta Hort.**, v. 1009, p. 83-891, 2013.

GANESAN, P.; NODA, K.; MANABE, Y.; OHKUBO, T.; TANAKA, Y.; MAOKA, T.; SUGAWARA, T.; HIRATA, T. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1810, p. 497-503, 2011.

GARAI, S.; BRAHMACHARI, K.; SARKAR, S.; MONDAL, M.; BANERJEE, H.; NANDA, M. K.; CHAKRAVARTY, K. Impact of seaweed sap foliar application on growth, yield, and tuber quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). **J. Appl. Phycol.** v. 33, p. 1893-1904, 2021.

GARCÍA, A. C. **Frações sólidas humidificadas de vermicomposto: seus efeitos em plantas e capacidade de retenção de metais pesados.** 2013. 130 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

GARCÍA, A. C.; CASTRO, T. A. V. T.; SANTOS, L. A.; TAVARES, O. C. H.; CASTRO, R. N.; BERBARA, R. L. L.; GARCÍA-MINA, J. M. Structure-Property-Function Relationship of Humic Substances in Modulating the Root Growth of Plants: A Review. **Journal of Environmental Quality**, v. 48, p. 1622-1632, 2019.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; RUMJANEK, V. M.; CASTRO, R. N.; SANTOS, F. S.; SOUZA, L. G. A.; BERBARA, R. L. L. Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). **Journal of Geochemical Exploration**, v. 136, p. 48-54, 2014.

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

GARCÍA, A. C.; SOUZA, L. G. A.; PEREIRA, M. G.; CASTRO, R. N.; GARCÍA-MINA, J. M.; ZONTA, E.; LISBOA, F. J. G.; BERBARA, R. L. L. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. **Scientific Reports**, n.º. 6, fev. 2016a.

GARCÍA, A. C.; TAVARES, O. C. H.; BALMORI, D. M.; ALMEIDA, V. S.; CANELLAS, L. P.; GARCÍA-MINA, J. M.; BERBARA, R. L. L. Structure-function relationship of vermicompost humic fractions for use in agriculture. **Journal of Soils and Sediments**, 2016 b.

GARCÍA, A. C.. Substâncias húmicas e seus efeitos sobre a nutrição de plantas. In: FERNANDES, M. S., SOUZA, S. R. SANTOS, L. A. (Eds.). **Nutrição Mineral de Plantas**. 2. Ed., Viçosa, MG: SBCS, p. 228-266, 2018.

GARCIA-GONZALEZ J.; SOMMERFELD M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. **J Appl Phycol**, v. 28, p.1051-1061, 2016.

GAYMARD, F.; PILOT, F.; LACOMBE, B.; BOUCHEZ, D.; BRUNEAU, D.; BOUCHEREZ, J.; MICHAUX-FERRIERE, N.; THIBAUD, J. B.; SENTENAC, H. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. **Cell**, v. 94, p. 647-655, 1998.

GERARDIN, T.; DOUTHE, C.; FLEXAS, J.; BRENDDEL, O. Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 153, p. 188-197, 2018.

GHOLAMI, H.; GHANI, A.; FARD, F.; HAZRATI, H. Changes in photosynthetic pigments and uptake of some soil elements by chicory supplied with organic fertilizers. **Acta Ecologica Sinica**, 2018.

GHOSH, A.; ANAND, K. G. V.; SETH, A. Life cycle impact assessment of seaweed based biostimulant production from onshore cultivated *Kappaphycus alvarezii* (Doty) doty ex silva - Is it environmentally sustainable? **Algal Res.**, v. 12, p. 513-521, 2015.

GONI, P. QUILLE, O.; O'CONNELL, S. Seaweed carbohydrates. In: **The Chemical Biology of Plant Biostimulants**, p. 57-95, 2020.

GONZALEZ, A.; CASTRO, J.; VERA, J.; MOENNE, A. Seaweed oligosaccharides stimulate plant growth by enhancing carbon and nitrogen assimilation, basal metabolism, and cell division. **J. Plant Growth Regul.**, v. 32, p. 443-448, 2013.

GONZALEZ, A.; CONTRERAS, R. A.; ZÚÑIGA, G.; MOENNE, A. Oligo-carrageenan kappainduced reducing redox status and activation of TRR/TRX system increase the level of indole-3-acetic acid, gibberellin A3 and trans-zeatin in *Eucalyptus globulus* trees. **Molecules**, v. 19, p. 12690-12698, 2014.

GUINAN, K. J.; SUJEETH, N.; COPELAND, R. B.; JONES, P. W.; O'BRIEN, N. M.; SHARMA, H. S. S.; PROUTEAU, P. F. J.; O'SULLIVAN, J. T. Discrete roles for extracts of *Ascophyllum nodosum* in enhancing plant growth and tolerance to abiotic and biotic stresses. **Acta Hort.**, v. 1009, p. 127-136, 2013.

GUO, J.; JIA, Y.; CHEN, H.; ZHANG, L.; YANG, J.; ZHANG, J.; HU, X.; YE, X.; LI, Y.; ZHOU, Y. Growth, photosynthesis, and nutrient uptake in wheat are affected by differences in nitrogen levels and forms and potassium supply. **Sci. Rep.**, v. 9, p. 1248, 2019.

GUO, X. X.; LIU, H. T.; WU, S. B. Humic substances developed during organic waste composting: Formation mechanisms, structural properties, and agronomic functions. **Science of the Total Environment**, v. 662, p. 501-510, 2019.

GUO, Z.; WEI, Y.; ZHANG, Y.; XU, Y.; ZHENG, L.; ZHU, B.; YAO, Z. Carrageenan oligosaccharides: a comprehensive review of preparation, isolation, purification, structure, biological activities and applications. **Algal Res.**, v. 61, 2022.

HADDAD, G.; ALI, F. E.; MOUNEIMNE, A. H. Humic matter of compost: determination of humic spectroscopic ratio (E4/E6). **Current Science International**, v. 4 (1), p. 56-72, 2015.

HAMZA, B.; SUGGARS, A. Biostimulants: myths and realities. **Turfgrass Trends**, v. 10, p. 6-10, 2001.

HASHMI, N.; KHAN, M. M. A.; IDREES, M.; KHAN, Z. H.; ALI, A.; VARSHNEY L. Depolymerized carrageenan ameliorates growth, physiological attributes, essential oil yield and active constituents of *Foeniculum vulgare* mill, *Carbohydr. Polym.*, v. 90, p. 407-412, 2012.

HECKMAN, J. R. Effect of an organic bio-stimulant on cabbage yield. **J Home Consum Hort.**, v. 1, p. 11-113, 1994.

HENRY, A. IRRI's drought stress research in rice with emphasis on roots: accomplishments over the last 50 years. **Plant Root**, v. 7, p. 5-19, 2013.

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

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station, Berkeley, Calif., US., p. 347, 1950.

HSIAO, Y. C.; YAMADA, M. The roles of peptide hormones and their receptors during plant root development. **Genes**, v. 12, p. 22, 2020.

HU, C. H.; WANG, P. Q.; ZHANG, P. P.; NIE, X. M.; LI, B. B.; TAI, L.; LIU, W. T.; LI, W. Q.; CHEN, K. M. NADPH oxidases: the vital performers and center hubs during plant growth and signaling. **Cells**, v. 9, p. 437, 2020.

HURTADO, A.; CRITCHLEY, A. A review of multiple biostimulant and bioeffector benefits of AMPEP, an extract of the brown alga *Ascophyllum nodosum*, as applied to the enhanced cultivation and micropropagation of the commercially important red algal carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* and its selected cultivars. **Journal of Applied Phycology**, 2018.

IMRAN, S.; HORIE, T.; KATSUHARA, M. Expression and ion transport activity of rice OsHKT1;1 variants. **Plants (Basel)**, v. 9, p. 16, 2019.

IQBAL, S.; RIAZ, U.; MURTAZA, G.; JAMIL, M.; AHMED, M.; HUSSAIN, A.; ABBAS, Z. Chemical fertilizers, formulation, and their influence on soil health. In: **Microbiota And Biofertilizers**, p. 1-15, 2021.

JAIN, D.; STARK, A. Y.; NIEWIAROWSKI, P. H.; MIYOSHI, T.; DHINOJWALA, A. NMR spectroscopy reveals the presence and association of lipids and keratin in adhesive gecko setae. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 1-8, 2015.

JANICKA-RUSSAK, M.; KABAŁA, K.; BURZYŃSKI, M. Different effect of cadmium and copper on H⁺-ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 11, p. 4133-4142, 2012.

JANNIN, L.; ARKOUN, M.; ETIENNE, P.; LAÎNÉ, P.; GOUX, D.; GARNICA, M.; García-Mina, J. M. Brassica napus growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L). Le Jol. seaweed extract: microarray analysis and physiological characterization of N, C, and S metabolisms. **J. Plant Growth Regul.**, v. 32, p. 31-52, 2013.

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

JI, Y.; HUANG, W.; WU, B.; FANG, Z.; WANG, X. The amino acid transporter AAP1 mediates growth and grain yield by regulating neutral amino acid uptake and reallocation in *Oryza sativa*. **J Exp Bot.**, v. 71(16), p. 4763-4777, 2020.

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

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

JINDO, K.; SOARES, T. S.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, I. G.; AGUIAR, N. O.; MAZZEI, P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; OLIVARES, F.L.; CANELLAS, L. P. Phosphorus speciation and high-affinity transporters are influenced by humic substances. **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, v.179, p. 206-214, 2016.

JOHNSON, R.; VISHWAKARMA, K.; HOSSEN, M. S.; KUMAR, V.; SHACKIRA, A. M.; PUTHUR, J. T.; HASANUZZAMAN, M. Potassium in plants: growth regulation, signaling, and environmental stress tolerance. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 172, p. 56-69, 2022.

KAMEL, S. M; AFIFI, M. M. I; EL-SHORAKY, F. S.; EL-SAWY, M. M. Fulvic acid: A tool for controlling powdery and downy mildews in cucumber plants. **Int. J. Phytopathol.**, v. 3(2), p. 101-108, 2014.

KAMYABA, A.; SAFFARI, V. R.; FARAHMAND, H. Effects of foliar application of humic acid on photosynthetic pigments, visual quality and height of three cool-season turfgrass species. **Acta Horticulturae** 1131, 2016.

KANABAR, P.; NANDWANI, D. Effect of fulvic acid on yield performance of organic bell pepper (*Capsicum annuum* L.) under open-field conditions in Tennessee. **Org. Agr.**, v. 13, p. 431-441, 2023.

KANG, O. L.; RAMLI, N.; SAID, M.; AHMAD, M.; YASIR, S. M.; ARIFF A. *Kappaphycus alvarezii* waste biomass: a potential biosorbent for chromium ions removal. **Res. J. Environ. Sci.**, v. 23, p. 918-922, 2011.

KAPOORE, R. V.; WOOD, E. E.; LLEWELLYN, C. A. Algae biostimulants: a critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. **Biotechnol. Adv.**, v. 49, p. 107, 2021.

KARTHIKEYAN, K., SHANMUGAM, M. Enhanced yield and quality in some banana varieties applied with commercially manufactured biostimulant Aquasap from sea plant *Kappaphycus alvarezii*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 4, p. 621-631, 2014.

KARTHIKEYAN, K.; SHANMUGAM, M. The effect of potassium-rich biostimulant from seaweed *Kappaphycus alvarezii* on yield and quality of cane and cane juice of sugarcane var. Co 86032 under plantation and ratoon crops. **Journal of Applied Phycology**, v. 29(6), p. 3245-3252, 2017.

KAUFFMAN, G. L.; KNEIVEL, D. P.; WATSCHKE, T. L. Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. **Crop Sci.**, v. 47, p. 261-267, 2007.

KEELER, C.; KELLY, E. F.; MACIEL, G. E. Chemical-structural information from solid-state ¹³C NMR studies of a suite of humic materials from a lower montane forest soil. Colorado, USA, **Geoderma**, v. 130, p. 124-140, 2006.

KHALED, H.; FAWY, H. A. Effect of different levels of humic acids on the nutrient content, plant growth, and soil properties under conditions of salinity. **Soil & Water Res.**, v. 6, p. 21-29, 2011.

KHAN, W.; RAYIRATH, U. P.; SUBRAMANIAN, S. Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. **J Plant Growth Regul**, v. 28, p. 386-399, 2009.

KHOLSSI, R.; LOUGRAIMZI, H.; GRINA, F.; LORENTZ, J. F.; SILVA, I.; CASTAÑO-SÁNCHEZ, O.; MARKS, E. A. Green agriculture: a review of the application of micro-and macroalgae and their impact on crop production on soil quality. **J. Soil Sci. Plant Nutr.**, p. 1-15, 2022.

KIM, H. Y.; CHOI, E. H.; MIN, M. K.; HWANG, H.; MOON, S. J.; YOON, I.; KIM, B. G. Differential gene expression of two outward-rectifying shaker-like potassium channels OsSKOR and OsGORK in rice. **Journal of plant biology**, v. 58, p. 230-235. 2015.

KISHOR, M.; JAYAKUMAR, M.; GOKAVI, N.; MUKHARIB, D. S.; RAGHURAMULU, Y.; UDAYAR PILLAI, S. Humic acid as foliar and soil application improve the growth, yield and quality of coffee (cv. C × R) in Western Ghats of India. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2020.

KOOPAL, L. K.; VAN RIEMSDIJK, H. W.; KINNIBURGH, D. G. Humic matter and contaminants. General aspects and modeling metal ion binding. **Pure Appl. Chem.**, v. 73, n°. 12, p. 2005-2016, 2001.

KRITZINGER, I.; LÖTZE, E. Quantification of lenticels in Japanese plum cultivars and their effect on total fruit peel permeance. **Scientia Horticulturae**, v. 254, p. 35-39. 2019.

KULIKOVA, N. A.; ABROSKIN, D. P.; BADUN, G. A.; CHERNYSHEVA, M. G.; KOROBKOV, V. I.; BEER, A. S.; TSVETKOVA, E. A.; SENIK, S. V.; KLEIN, O. I.; PERMINOVA, I. V. Label Distribution in Tissues of Wheat Seedlings Cultivated with Tritium-Labeled Leonardite Humic Acid. **Sci Rep.**, v. 6, p. 28869, 2016.

KUMAR, R.; TRIVEDI, K.; ANAND, K. G.; GHOSH, A. Science behind biostimulant action of seaweed extract on growth and crop yield: Insights into transcriptional changes in roots of maize treated with *Kappaphycus alvarezii* seaweed extract under soil moisture stressed conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 599-613. (2020).

KUMAR, R.; TRIVEDI, K.; ANAND, K. G.; GHOSH, A. Science behind biostimulant action of seaweed extract on growth and crop yield: insights into transcriptional changes in roots of maize treated with *Kappaphycus alvarezii* seaweed extract under soil moisture stressed conditions. **J. Appl. Phycol.**, v. 32, p. 599-613, 2020.

KUNICKI, E.; GRABOWSKA, A.; SEKARA, A.; WOJCIECHOWSKA, R. The effect of cultivar type, time of cultivation, and biostimulant treatment on the yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Folia Horti**, v. 22, p. 9-13, 2010.

KUREPIN, L. V., ZAMAN, M., AND PHARIS, R. P. Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators. **J. Sci. Food Agric.** 94, 2014.

LANGOWSKI, Ł.; GOŃI, O.; QUILLE, P. A plant biostimulant from the seaweed *Ascophyllum nodosum* (Sealicit) reduces podshatter and yield loss in oilseed rape through modulation of *IND* expression. **Sci Rep.**, v. 9, 2019.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

LAYEK, J.; DAS, A.; RAMKRUSHNA, G. I.; TRIVEDI, K.; YESURAJ, D.; CHANDRAMOHAN, M.; GHOSH, A. Seaweed sap: a sustainable way to improve productivity of maize in North-East India. **Int. J. Environ. Stud.**, v. 72, p. 305-315, 2015.

LAYEK, J.; DAS, A.; RAMKRUSHNA, G.I.; TRIVEDI, K.; YESURAJ, D.; CHANDRAMOHAN, M.; KUBAVAT, D.; AGARWAL, P.K.; GHOSH, A. Seaweed sap potential towards sustainable improvement of maize productivity: a dominant staple food crop of the North-east India. **Int J Environ Stud**, v. 72, p. 305-315, 2015.

- LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge, New York, Cambridge University Press, 2008.
- LEINDAH, N.D.; MANI, S. Effect of seaweed saps *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria* on growth yield and quality of rice. **Indian J. Sci. & Technol.**, v. 8, p. 1-6, 2015.
- LEMONNIER-LE PENHUIZIC, C.; CHATELET, C.; KLOAREG, B.; POTIN, P. Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. *italica*. **Plant Sci.**, v. 160, p. 1211-1220, 2001.
- LI, S. J.; WU, G. Q.; LIN, L. Y. AKT1, HAK5, SKOR, HKT1;5, SOS1 and NHX1 synergistically control Na⁺ and K⁺ homeostasis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings under saline conditions. **J. Plant Biochem. Biotechnol.**, v. 31, p. 71-84, 2022.
- LI, X.; ZHU, J.; HU, F. Single-base resolution maps of cultivated and wild rice methylomes and regulatory roles of DNA methylation in plant gene expression. **BMC Genomics**, v. 13, p. 300, 2012.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in Enzymology 148**, Academic Press, p. 350-382, 1987.
- LOUREIRO, R. R.; HURTADO, A. Q.; CRITCHLEY, A. T. Impacts of AMPEP on Epiphytes and Diseases in *Kappaphycus* and *Eucheuma* Cultivation. In: HURTADO, A.; CRITCHLEY, A.; NEISH, I. (eds) *Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities. Developments in Applied Phycology*, v. 9, 2017.
- LU, Y.; SONG, Z.; LÜ, K.; LIAN, X.; CAI, H. Molecular characterization, expression and functional analysis of the amino acid transporter gene family (OsAATs) in rice. **Acta Physiol Plant**, v. 34(5), p. 1943-1962, 2012.
- LYMPERATOU, A.; ENGELSEN, T. K.; SKIADAS, I. V.; GAVALA, H. N. Different pretreatments of beach-cast seaweed for biogas production. **J. Clean. Prod.**, 2022.
- MAGHIAOUI, A.; GOJON, A.; BACH, L. NRT1.1-centered nitrate signaling in plants. **J. Exp. Bot.**, v. 71, p. 6226-6237, 2020.
- MAJUMDAR, A.; KAR, R. K. Congruence between PM H(+)-ATPase and NADPH oxidase during root growth: a necessary probability. **Protoplasma**, v. 255, p. 1129-1137, 2018.
- MAO, J.; CORY, R. M.; MCKNIGHT, D. M.; SCHMIDT-ROHR, K. Characterization of a nitrogen-rich fulvic acid and its precursor algae from solid state NMR. **Org. Geochem.**, v. 38, p. 1277-1292, 2007.
- MARCINCZYK, M.; OLESZCZUK, P. Biochar and engineered biochar as slow-and controlled-release fertilizers. **J. Clean. Prod.**, 2022.
- MARSCHNER, H. (Ed.) **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. Academic press, 2011.

MARSHAM, S.; SCOTT, G.W.; TOBIN, M. L. Comparison of nutritive chemistry of a range of temperate seaweeds. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1331-1336, 2007.

MARTINS, G. **Diagnóstico sobre sistemas de dados agrícolas do Brasil para um sistema nacional de avaliação de danos e perdas por desastres na agricultura**, FAO, Brasília, 2021.

MASARIN, F.; CEDENO, F. R. P.; CHAVEZ, E. G. S.; DE OLIVEIRA, L. E.; GELLI, V. C.; MONTI, R. Chemical analysis and biorefinery of red algae *Kappaphycus alvarezii* for efficient production of glucose from residue of carrageenan extraction process. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, p. 1-12, 2016.

MENEGALE, M. L. C.; CASTRO, G. S. A.; MANCUSO, M. A. C. Silício: interação com o sistema solo-planta. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 4, n. especial, p. 435-454, 2015.

MENG, F.; XIANG, D.; ZHU, J.; LI, Y; MAO, C. Molecular mechanisms of root development in rice. **Rice**, v. 12, p. 1-10, 2019.

MENG, L.; BUCHANAN, B. B.; FELDMAN, L. J.; LUAN, S. CLE-like (CLEL) peptides control the pattern of root growth and lateral root development in Arabidopsis. **PNAS**, v. 109, p. 1760-1765, 2012.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; SAEID, A. Plant growth biostimulants, dietary feed supplements and cosmetics formulated with supercritical CO₂ algal extracts. **Molecules**, v. 22, p. 1-17, 2017.

MIRANDA, K.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric oxide: biology and chemistry. **Official Journal of the Nitric Oxide Society** v. 5, p. 62-71, 2001.

MONDAL, D.; GHOSH, A.; PRASAD, K.; SINGH, S.; BHATT, N.; ZODAPE, S. T.; GHOSH, P. K. Elimination of gibberellin from *Kappaphycus alvarezii* seaweed sap foliar spray enhances corn Stover production without compromising the grain yield advantage. **Plant Growth Regul.**, v. 75, p. 657-666, 2015.

MONDAL, M., GOSWAMI, S., GHOSH, A. Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. **Biotech**, v.7, p. 99, 2017.

MOON, S. J.; KIM, H. Y.; HWANG, H.; KIM, J. A.; LEE, Y.; MIN, M. K.; KIM, B. G. A dominant negative OsKAT2 mutant delays light-induced stomatal opening and improves drought tolerance without yield penalty in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 772, 2017.

MORA, V.; BACAICOA, E.; BAIGORRI, R.; ZAMARRENO, A.M.; GARCÍA-MINA, J.M.N.O. NO and IAA Key Regulators in the Shoot Growth Promoting Action of Humic Acid in *Cucumis sativus* L. **J Plant Growth Regul.**, v. 33, p. 430-439, 2014.

MORA, V.; BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, AM.; AGUIRRE, E.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; GARCÍA-MINA, J. M. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of

cytokinins, polyamines and mineral nutrients. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 633-642, 2010.

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

MOURA, O. V. T.; BERBARA, R. L. L.; TORCHIA, D. F. O.; SILVA, H. F. O.; CASTRO, T. A. V. T.; TAVARES, O. C. H.; RODRIGUES, N. F.; ZONTA, E.; SANTOS, L.A; GARCÍA, A. C. Humic foliar application as sustainable technology for improving the growth, yield, and abiotic stress protection of agricultural crops. A review. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2023.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M. Carboxyl and phenolic humic fractions affect *Pinus nigra callus* growth and metabolism. **Soil Science Society of America Journal**, v. 73, n. 4, p. 1119-1129, 2009.

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

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

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

NADARAJAN, S.; SUKUMARAN, S. Chemistry and toxicology behind chemical fertilizers. In: **Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture**, p. 195-229, 2011.

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

NARDI, S.; CARLETTI, P.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A. Biological activities of humic substances. In: SENESI, N.; XING, B.; HUANG, P. M. (Eds) **Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems**. Wiley, Hoboken, p. 305-339, 2009.

NARDI, S.; CARLETTI, P.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A. Biological activities of humic substances. **Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems**, v. 2, p. 305-340, 2009.

NARDI, S.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; BAIANO, S.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 3138-3146, 2007.

NARDI, S.; CARLETTI, P.; ERTANI, A.; PIZZEGHELLO, D. Knowledge and evaluation of plant growth stimulants. **Inform Agrario**, v. 45, p. 41-44, 2006.

NASIROLESAMI, E.; MOZAFARI, H.; SADEGHI-SHOAE, M. Changes in yield, protein, minerals, and fatty acid profile of wheat (*Triticum aestivum* L.) under fertilizer management involving application of nitrogen, humic acid, and seaweed extract. **J Soil Sci Plant Nutr.**, v. 21, p. 2642-2651, 2021.

NEUMANN, G.; OMHELD, V. R. Rhizosphere chemistry in relation to plant nutrition. In: **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. Academic Press, p. 347-368, 2012.

NIKBAKHT, A.; KAFI, M.; BABALAR, M.; ETEMADI, N.; EBRAHIMZADEH, H.; XIA, Y. P. Effect of Humic Acid on Calcium Absorbtion and Postharvest Behaviour of *Gerbera jamesonii* L. Iranian. **Journal of Horticultural Science And Technology**, 2008.

NORRIE, J.; KEATHLEY, J. P. Benefits of *Ascophyllum nodosum* marine-plant extract applications to 'Thompson seedless' grape production. **Acta Hortic.**, v. 727, p. 243-247, 2006.

OBATA, T.; KITAMOTO, H. K.; NAKAMURA, A.; FUKUDA, A.; TANAKA, Y. Rice shaker potassium channel OsKAT1 confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells. **Plant Physiol.**, v. 144, p. 1978-1985, 2007.

OJWANG, L. M.; COOK, R. L. Environmental conditions that influence the ability of humic acids to induce permeability in model biomembranes. **Environ Sci Technol**, v. 47, p. 8280-8287, 2013.

OLAETXEA, M.; DE HITTA, D.; GARCIA, C. A.; FUENTES, M.; BAIGORRI, R.; MORA, V.; GARNICA, M.; URRUTIA, O.; ERRO, J.; ZAMARREÑO, A. G.; BERBARA, R. L.; GARCIA-MINA, J. M. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root- and shoot-growth. **Applied Soil Ecology**, v. 123, p. 521-537, 2017.

OLAETXEA, M.; HITTA, D.; CALDERÍN, A. G.; FUENTES, M.; BAIGORRI, R.; MORA, V.; GARNICA, M.; URRUTIA, O.; ERRO, J.; ZAMARRENO, A. M.; BERBARA, R. L. L.; GARCIA-MINA, J. M. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root-and shoot-growth. **Applied Soil Ecology**, v. 123, p. 521-537, 2018.

OLAETXEA, M.; MORA, V.; BACAICOA, E.; BAIGORRI, R.; GARNICA, M.; FUENTES, M. Root ABA and H⁺-ATPase are key players in the root and shoot growth promoting action of humic acids. **Plant Direct**, v. 3, p. 1-12, 2019.

OLAETXEA, M.; MORA, V.; BACAICOA, E.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; CASANOVA, E.; ZAMARREÑO, A.M.; IRIARTE, J. C.; ETAYO, D.; EDERRA, I.; GONZALO, R.; BAIGORRI, R.; GONZALO, R.; GARCIA-MINA, J. M. Abscisic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused byrhizosphere humic acids. **Plant Physiol.**, v. 169, p. 2587-2596, 2015.

PAHALVI, H. N.; RAFIYA, L.; RASHID, S.; NISAR, B.; KAMILI, A. N. Chemical fertilizers and their impact on soil health. In: **Microbiota and Biofertilizers 2**, p. 1-20, 2021.

PAKSOY, M.; TÜRKMEN, Ö.; DURSUN, A. Effects of potassium and humic acid on emergence, growth and nutrient contents of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedling under saline soil conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 33, p. 5343-5346, ago. 2010.

PAL, A.; DWIVEDI, S. K.; MAURYA, P. K.; KANWAR, P. Effect of seaweed saps on growth, yield, nutrient uptake and economic improvement of maize (sweet corn). **J. Appl. Nat. Sci.**, v. 7, p. 970-975, 2015.

PARADIKOVIĆ, N., VINKOVIĆ, T., VINKOVIĆ VRČEK, I., ŽUNTAR, I., BOJIĆ, M., AND MEDIĆ-ŠARIĆ, M. Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. **J. Sci. Food Agric.**, v. 91, p. 2146-2152, 2011.

PARADIKOVIC, N.; TEKLIC, T.; ZELJKOVIC, S.; LISJAK, M.; SPOLJAREVIC, M. Biostimulants research in some horticultural plant species - A review. **Food and Energy Security**, v. 8(2), 2019.

PARMAR, P.; KUMARI, N.; SHARMA, V. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. **Botanical Studies**, v. 54, p. 45-51, 2013.

PATEL, J. S.; SELVARAJ, V.; MORE, P.; BAHMANI, R.; BORZA, T.; PRITHIVIRAJ, B. A Plant Biostimulant from *Ascophyllum nodosum* Potentiates Plant Growth Promotion and Stress Protection Activity of *Pseudomonas protegens* CHA0. **Plants**, v. 12, p. 1208, 2023.

PATEL, K.; AGARWAL, P.; AGARWAL, P. K. *Kappaphycus alvarezii* sap mitigates abiotic-induced stress in *Triticum durum* by modulating metabolic coordination and improves growth and yield. **J. Appl. Phycol.**, v. 30, p. 2659-2673, 2018.

PAUDEL, Y. P.; PRADHAN, S.; PANT, B.; PRASAD, B. N. Role of blue green algae in rice productivity. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 3, n. 8, p. 332-335, 2012.

PENG, L.; WANG, F.; WANG, Z.; TAN, J.; HUANG, L.; TIAN, X. Cell-cell communication inference and analysis in the tumour microenvironments from single-cell transcriptomics: data resources and computational strategies. **Brief. Bioinform.**, v. 23, p. 234, 2022.

PEREIRA, L.; AMADO, A. M.; CRITCHLEY, A. T.; VAN DE VELDE, F.; RIBEIRO-CLARO, P. J. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). **Food Hydrocoll.**, v. 23, p. 1903–1909, 2009.

PEREIRA, L.; GHEDA, S. F.; RIBEIRO-CLARO, P. J. Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries. **Int. J. Carbohydr. Chem.**, 2013.

PETROV, V.; HILLE, J.; MUELLER-ROEBER, B.; GECHEV, T. S. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-16, 2015.

PETROZZA, A.; SUMMERER, S.; DI TOMMASO, G.; DI TOMMASO, D.; PIAGGESI, A. Evaluation of the effect of Radifarmw treatment on the morpho-physiological characteristics of root systems via image analysis. **Acta Hortic**, v. 1009, p. 149-153, 2013.

PEZESHK, F.; BABAEI, S.; ABEDIAN KENARI, A.; HEDAYATI, M.; NASERI, M. The effect of supplementing diets with extracts derived from three different species of macroalgae on growth, thermal stress resistance, antioxidant enzyme activities and skin colour of electric yellow cichlid (*Labidochromis caeruleus*). **Aquacult Nutr**, v. 25, p. 436-443, 2018.

PICCOLO, A. In memoriam Prof. F. J. Stevenson and the Question of humic substances in soil. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, 2016.

PICKERING, T. D.; SKELTON, P.; SULU, J. R. Intentional introductions of commercially harvested alien seaweeds. **Bot Mar** v. 50, p. 338-350, 2007.

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

PONISIO, L. C.; M'GONIGLE, L. K.; MACE, K. C.; PALOMINO, J.; DE VALPINE, P.; KREMEN, C. Diversification practices reduce organic to conventional yield gap. **Proc. R. Soc. B.**, v. 282, 2015.

PORTU, J.; GONZÁLEZ-ARENZANA, L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; SANTAMARÍA, P.; GARDE-CERDÁN, T. Phenylalanine and urea foliar applications to grapevine: Effect on wine phenolic content. **Food Chemistry**, v. 180, p. 55-63, 2015.

PRADO, M. R.; WEBER, O. L. D. S.; MORAES, M. F., DOS SANTOS; C. L., TUNES, M. S. Liquid organomineral fertilizer containing humic substances on soybean grown under water stress. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 5, p. 408-414, 2016.

PRAMANICK, B.; BRAHMACHARI, K.; KAR, S.; MAHAPATRA, B. S. Can foliar application of seaweed sap improve the quality of rice grown under rice-potato-greengram crop sequence with better efficiency of the system? **J. Appl. Phycol.**, v. 32, p. 3377-3386, 2020.

PRAMANICK, B.; BRAHMACHARI, K.; MAHAPATRA, B. S.; GHOSH, A.; GHOSH, D.; KAR, S. Growth, yield and quality improvement of potato tubers through the application of seaweed sap derived from the marine alga *Kappaphycus alvarezii*. **J. Appl. Phycol.** v. 29, p. 3253-3260, 2017.

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

PUGLISI, E.; FRAGOULIS, G.; DEL RE, A. A.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; GIGLIOTTI, G.; SAID-PULLICINO, D.; TREVISAN, M. Carbon deposition in soil rhizosphere following amendments with compost and its soluble fractions, as evaluated by combined soil-plant rhizobox and reporter gene systems. **Chemosphere**, v. 73, p. 1292-1299, nov. 2008.

QIN, K.; LESKOVAR, D. **Humic substances improve vegetable seedling quality and post-transplant yield performance under stress conditions.** Agriculture, 2020.

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

RADY, M. M.; EL-MAGEED, T.; ABDURRAHMAN, H.; MAHDI, A. Humic acid application improves field performance of cotton (*Gossypium barbadense* L.) under saline conditions. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 26, p. 487-493, 2016.

RAGEL, P.; RADDATZ, N.; LEIDI, E. O.; QUINTERO, F. J.; PARDO, J. M. Regulation of K(+) nutrition in plants. **Front. Plant Sci.**, v. 10, p. 281, 2019.

RATHORE, S. S.; CHAUDHARY, D. R.; BORICHA, G. N.; GHOSH, A.; BHATT, B. P.; ZODAPE, S. T.; PATOLIA, J. S. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. **South African Journal of Botany**, v. 75, p. 351-355, 2009.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The Acid Growth Theory of auxin induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v. 99, p. 1271-1274, ago. 1992.

RIOUX L-E, TURGEON SL, BEAULIEU M. Effect of season on the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1069-1075, 2009.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; FURLAN, M. An alternative methodology for the extraction of humic substances from organic soils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p.51-56, 1998.

ROSA, A. H. **Substâncias húmicas:** extração, caracterização, novas perspectivas e aplicações. 2001. 87 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

ROSA, V. R.; SANTOS, A. L. F.; SILVA, A. A.; SAB, M. P. V.; GERMINO, G. H.; CARDOSO, F. B.; SILVA, M. A. Increased soybean tolerance to water deficiency through biostimulant based on fulvic acids and *Ascophyllum nodosum* (L.) seaweed extract. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, p. 228-243, 2021.

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

ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. **Front. Plant Sci.**, v. 9, 2018.

ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Toward a Sustainable Agriculture Through Plant Biostimulants: From Experimental Data to Practical Applications. **Agronomy**, v. 10(10), p. 1461, 2020.

ROUPHAEL, Y.; FRANKEN, P.; SCHNEIDER, C.; SCHWARZ, D.; GIOVANNETTI, M.; AGNOLUCCI, M. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. **Sci. Hortic**, v. 196, p. 91-108, 2015.

RUDKE, A. R.; DE ANDRADE, C. J.; FERREIRA, S. R. S. *Kappaphycus alvarezii* macroalgae: an unexplored and valuable biomass for green biorefinery conversion. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 103, p. 214-224, 2020.

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

SANTOS, C. A. **Substância húmica e seu efeito em atributos químicos e biológicos do solo e na produção vegetal**. 2014. 92 p. Tese (Doutorado em Ciências- Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2014.

SARDANS, J.; PEÑUELAS, J. Potassium control of plant functions: ecological and agricultural implications. **Plants (Basel)** v. 10, p. 419, 2021.

SAVY, D.; COZZOLINO, V. Fertilising products from lignin and its derivatives to enhance plant development and increase the sustainability of crop production. **J. Clean. Prod.**, 2022.

SAVY, D.; COZZOLINO, V. Novel fertilising products from lignin and its derivatives to enhance plant development and increase the sustainability of crop production. **J. Clean. Prod.**, p. 366, 2022

SCAGLIA, B.; NUNES, R.R.; REZENDE, MOO; TAMBONE, F.; ADANI, F. Investigating organic molecules responsible of auxin-like activity of humic acid fraction extracted from vermicompost. **Sci Total Environ**, v. 562, p. 289-295, 2016.

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

SCHMITZ, R.; MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista Ciências Exatas Aplicadas e Tecnológicas**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

SCHNITZER, M. Humic Substances: chemistry and reactions. In: SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. (Eds.). **Soil Organic Matter**. Elsevier, Amsterdam, 1978.

SERGIEV, I.; TODOROVA, D.; MOSKOVA, I.; GEORGIEVA, N.; NIKOLOVA, A.; SIMOVA, S.; POLIZOEV, D.; ALEXIEVA, V. **Protective effect of humic acids against heavy metal stress in triticale**. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, v. 66, n. 1, p. 53-60, out. 2013.

SHAH, M. T., ZODAPE, S. T., CHAUDHARY, D. R., ESWARAN, K., CHIKARA, J. Seaweed sap as an alternative liquid fertilizer for yield and quality improvement of wheat. **Journal of plant Nutrition**, v. 36, p. 192-200, 2013.

SHALABY, T. A.; EL-RAMADY, H. Effect of foliar application of bio-stimulants on growth, yield, components, and storability of garlic (*Allium sativum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 2, p. 271-275, 2014.

SHARMA, H. S. S.; FLEMING, C.; SELBY, C.; RAO, J. R., MARTIN, T. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. **J. Appl. Phycol**, v. 26, p. 465-490, 2014.

SHARMA, S. H. S.; LYONS, G.; MCROBERTS, C. Biostimulant activity of brown seaweed species from Strangford Lough: compositional analyses of polysaccharides and bioassay of extracts using mung bean (*Vigna mungo* L.) and pak choi (*Brassica rapa chinensis* L.). **J Appl Phycol** v. 24, p. 1081-1091, 2012.

SHERIN, G.; ASWATHI, K. R.; PUTHUR, J. T. Photosynthetic functions in plants subjected to stresses are positively influenced by priming. **Plant Stress**, 2022.

SHUKLA, P. S.; NIVETHA, N.; NORI, S. S.; BOSE, D.; KUMAR, S.; KHANDELWAL, S.; CRITCHLEY, A.; SURYANARAYAN, S. Understanding the mode of action of AgroGain(®), a biostimulant derived from the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* in the stimulation of cotyledon expansion and growth of *Cucumis sativa* (cucumber). **Front. Plant Sci.**, v. 14, 1136563, 2023.

SILVA, F. L. B.; LACERDA, C. F. de; NEVES, A. L. R.; SOUSA, G. G. de; SOUSA, C. H. C. de; FEERIRA, F. J. Irrigation with saline water plus bovine biofertilizer in the gas exchanges and productivity of cowpea. **Irriga**, Botucatu, v. 18, n. 2, p. 304-317, abr.-jun. 2013.

SILVA, M. L. S.; VITTI, G. C.; TREVIZAM, A. R. Heavy metal toxicity in rice and soybean plants cultivated in contaminated soil. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 2, p. 248-254, abr. 2014.

SIMPSON, A. J.; SONG, G.; SMITH, E.; LAM, B.; NOVOTNY, E. H.; HAYES, M. H. B. Unravelling the structural components of soil humin by use of solution-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Environment Science Technology**, v. 41, p. 883, 2007.

SINGH, K. G. I.; ANAND, V.; SOLOMON, S.; KUMAR S. S.; RAI, R.; ZODAPE, S.; GHOSH, A. Can we not mitigate climate change using seaweed based biostimulant: A case study with sugarcane cultivation in India. **Journal of Cleaner Production**, v. 204, p. 992-1003, 2018.

SINGH, R.; UPADHYAY, A. K.; CHANDRA, P.; SINGH, D. P. Sodium chloride incites reactive oxygen species in green algae *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*: implication on lipid synthesis, mineral nutrients and antioxidant system. **Bioresour. Technol**, v. 270, p. 489-497, 2018.

SINGH, S.; SINGH, M. K.; PAL, S. K.; TRIVEDI, K.; YESURAJ, D.; SINGH, C. S.; GHOSH, A. Sustainable enhancement in yield and quality of rain-fed maize through *Gracilaria edulis* and *Kappaphycus alvarezii* seaweed sap. **J. Appl. Phycol.**, v. 28, p. 2099-2112, 2016.

SOFI, A.; EBRAHIMI, M.; SHIRMOHAMMADI, E. Effect of Humic Acid on Germination, Growth, and Photosynthetic Pigments of *Medicago sativa* L. under Salt Stress. **Ecopersia**, v. 6, p. 21-30, 2018.

- SOLORZANO-CHAVEZ, E. G.; PAZ-CEDENO, F. R.; DE OLIVEIRA, L. E.; GELLI, V. C.; MONTI, R.; DE OLIVEIRA, S. C.; MASARIN, F. Evaluation of the *Kappaphycus alvarezii* growth under different environmental conditions and efficiency of the enzymatic hydrolysis of the residue generated in the carrageenan processing. **Biomass and Bioenergy**, v. 127, p. 105254, 2019.
- SPACCINI, R.; COZZOLINO, V.; DI MEO, V.; SAVY, D.; DROSOS, M.; PICCOLO, A. Bioactivity of humic substances and water extracts from compost made by ligno-cellulose wastes from biorefinery. **Science of The Total Environment**, v. 646, p. 792-800, jul. 2018.
- SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; FERNANDES, M. S.; DE SOUZA, S. R. Isoforms of plasma membrane H⁺-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO₃⁻ or NH₄⁺. **Plant Sci.**, v. 180, p. 251-258, 2011.
- SPERANDIO, M.; SANTOS, L.; ARAÚJO, O.; BRAGA, R.; PEREIRA COELHO, C.; NOGUEIRA, E.; SOUZA, S. Response of nitrate transporters and PM H⁺-ATPase expression to nitrogen flush on two upland rice varieties contrasting in nitrate uptake kinetics. **Aust. J. Crop Sci.**, v. 8, p. 568-576, 2014.
- SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. 2nd ed. New York, Oxford, 330p. 2008.
- SRILATHA, M.; RAO, P. C.; SHARMA, S. H. K.; PADMAJA, G. Physico - chemical characterization of humic substances under long – term application of fertilizers and manures in rice – rice cropping sequence in an Inceptisol. **International Journal of Advanced Research**, v. 1 (10), p. 343-348, 2013.
- STEVENSON, F. J. In: **Humus Chemistry: Genesis, Composition and Reaction**, 1^a Ed., John Wiley & Sons, New York, 1982.
- STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental question: The JIP test. In: MATHIS, P. (Ed.) **Photosynthesis: From Light to Biosphere**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, vol. V, p. 977-980, 1995.
- SUH, H. Y.; YOO, K. S.; SUH, S. G. Effect of foliar application of fulvic acid on plant growth and fruit quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Hortic. Environ. Biotechnol.**, v. 55, p. 455-461, 2014.
- SUMAYYA, S. S.; MURUGAN, K. Phytochemical screening, RP-HPLC and FTIR analysis of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty EX PC Silva: macro red algae. **J. Pharmacogn. Phytochem.**, v. 6, p. 325-330, 2017.
- SUMMA, D.; LANZONI, M.; CASTALDELLI, G.; FANO, E. A.; TAMBURINI, E. Trends and opportunities of bivalve shells' waste valorization in a prospect of circular blue bioeconomy. **Resources**, v. 11, p. 48, 2022.
- SUSTR, M.; SOUKUP, A.; TYLOVA, E. **Potassium in root growth and development**, **Plants**, v. 8, p. 435, 2019.

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 American, p. 1011-1020, 1996.

TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2319-2327, 2007.

TAHIRI, A.; RICHEL, A.; DESTAIN, J.; DRUART, P.; THONART, P.; ONGENA, M. Comprehensive comparison of the chemical and structural characterization of landfill leachate and leonardite humic fractions. **Annal Boianal Chemistry**, v. 408, p. 1917-1928, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6ª edição. Artmed. 2017.

TAN, E. C.; LAMERS, P. Circular bioeconomy concepts - a perspective. **Frontier Sustain**, v. 2, p. 509, 2021.

TARRAF, S. A.; TALAAT, I. M.; EL-SAYED, AE-K. B.; BALBAA, L. K. Influence of foliar application of algae extract and amino acids mixture on fenugreek plants in sandy and clay soils. **Nusantara Bioscience**, v. 7, n. 1, p. 33-37, 2015.

TAVARES, O. C. H. **Efeito dos ácidos húmicos sobre as H⁺-ATPASE, transportadores de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺, e sobre o crescimento em arroz**. 2014. 118 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

TAVARES, O. C. H.; SANTOS, L. A.; ARAÚJO, O. J. L.; BUCHER, C. P. C.; GARCÍA, A. C.; ARRUDA, L. N.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Humic acid as a biotechnological alternative to increase N-NO₃⁻ or N-NH₄⁺ uptake in rice plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101-226, 2019.

TAVARES, O.; SANTOS, L.; FERREIRA, L.; SPERANDIO, M.; DA ROCHA, J.; GARCÍA, A.; DOBBS, L.; BERBARA, R.; DE SOUZA, S.; FERNANDES, M. Humic acid differentially improves nitrate kinetics under low- and high-affinity systems and alters the expression of plasma membrane H⁺-ATPases and nitrate transporters in rice. **Ann Appl Biol**, v. 170, p. 89-103, 2016.

TAVARES, O.C.H.; SANTOS, L. A.; FERREIRA, D. F.; FERREIRA, L. M.; GARCÍA, A. C.; CASTRO, T. A. V. T.; ZONTA, E.; PEREIRA, M. G. Response surface modeling of humic acid stimulation of the rice (*Oryza sativa* L.) root system. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 67, 2020.

TEDESCO, M. J.; VOLKWEISS, S. J.; BOHNEN, H. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 188p. 1995.

THYE, K. L.; WAN ABDULLAH, W. M. A. N.; BALIA YUSOF, Z. N.; WEE, C.Y.; ONG-ABDULLAH, J.; LOH, J. Y.; LAI, K. S. λ -Carrageenan promotes plant growth in banana via enhancement of cellular metabolism, nutrient uptake, and cellular homeostasis. **Sci. Rep.**, v. 12, p. 19639, 2022.

TIAN, Q.; SHEN, L.; LUAN, J.; ZHOU, Z.; GUO, D.; SHEN, Y.; ZHANG, W. Rice shaker potassium channel OsAKT2 positively regulates salt tolerance and grain yield by mediating K⁺ redistribution. **Plant, Cell & Environment**, v. 44(9), p. 2951-2965, 2021.

TRAVERSA, A.; LOFFREDO, E.; GATTULLO, C. E.; PALAZZO, A. J.; BASHORE, T. L.; SENESI, N. Comparative evaluation of compost humic acids and their effects on the germination of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Journal Soils Sediments**, v. 14, p. 432-440, 2014.

TRAVERSA, A.; LOFFREDO, E.; GATTULLO, C. E.; SENESI, N. Water-extractable organic matter of different composts: A comparative study of properties and allelochemical effects on horticultural plants. **Geoderma**, v. 156, p. 287-292, 2010.

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

TREVISAN, S.; PIZZEGHELLO, D.; RUPERTI, B.; FRANCIOSO, O.; SASSI, A.; PALME, K.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. **Journal of Plant Biology**, v. 12, p. 604-614, 2009.

TRIVEDI, K.; VIJAY ANAND, K. G.; KUBAVAT, D.; PATIDAR, R.; GHOSH, A. Drought alleviatory potential of *Kappaphycus seaweed* extract and the role of the quaternary ammonium compounds as its constituents towards imparting drought tolerance in *Zea mays* L. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 2001-2015, 2018.

TRIVEDI, K.; ANAND, K. G. V.; VAGHELA, P.; GHOSH, A. Differential growth, yield and biochemical responses of maize to the exogenous application of *Kappaphycus alvarezii* seaweed extract, at grain-filling stage under normal and drought conditions. **Algal Res.**, v. 35, p. 236-244, 2018.

TRIVEDI, K.; GOPALAKRISHNAN, V. A. K.; KUMAR, R.; GHOSH, A. Transcriptional analysis of maize leaf tissue treated with seaweed extract under drought stress. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, pp. 774-978, 2021.

TRIVEDI, K.; KUMAR, R.; VIJAY ANAND, K. G.; BHOJANI, G.; KUBAVAT, D.; GHOSH, A. Structural and functional changes in soil bacterial communities by drifting spray application of a commercial red seaweed extract as revealed by metagenomics. **Arch. Microbiol.** v. 204, p. 1-21, 2022.

TRIVEDI, K.; VIJAY ANAND, K. G.; VAGHELA, P.; GHOSH, A. Differential growth, yield and biochemical responses of maize to the exogenous application of *Kappaphycus alvarezii* seaweed extract, at grain-filling stage under normal and drought conditions. **Algal Res.**, v. 35, p. 236-244, 2018.

URRUTIA, O.; GUARDADO, I.; ERRO, J.; MANDADO, M; GARCÍA-MINA, J.M. Theoretical chemical characterization of phosphate-metal-humic complexes and relationships

with their effects on both phosphorus soil fixation and phosphorus availability for plants. **J. Sci. Food Agric.**, v. 93, p. 293-303, 2013.

USA. **Acid Digestion of Sediments, Sludges And Soils; Method 3050B**. Environmental Protection Agency (EPA), USA, 1996.

VACCARO, S.; MUSCOLO, A.; PIZZEGHELLO, D.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; NARDI, S. Effect of a compost and its water-soluble fractions on key enzymes of nitrogen metabolism in maize seedlings. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 57, p. 11267-11276, 2009.

VAGHELA, P.; DAS, A. K.; TRIVEDI, K.; ANAND, K. V.; SHIND, P.; GHOSH, A. Characterization and metabolomics profiling of *Kappaphycus alvarezii* seaweed extract. **Algal Res.**, v. 66, 2022.

VAGHELA, P.; TRIVEDI, K.; ANAND, K. G. V.; BRAHMBHATT, H.; NAYAK, J.; KHANDHEDIYA, K.; PRASAD, K.; MORADIYA, K.; KUBAVAT, D.; KONWAR, L.J.; VEERAGURUNATHAN, V.; GRACE, P. G.; GHOSH, A. Scientific basis for the use of minimally processed homogenates of *Kappaphycus alvarezii* (red) and *Sargassum wightii* (brown) seaweeds as crop biostimulants. **Algal Res.**, v. 70, 102969, 2023.

VARANINI, Z.; PINTON, R. Plant-soil relationship: Role of humic substances in Iron Nutrition. In: BARTON, L. L.; ABADÍA, J. (Eds.) **Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms**. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 153-168, 2006.

VAUGHAN, D.; MALCOLM, R.E. Influence of humic substances on growth and physiological processes in plants. In: VAUGHAN, D.; MALCOLM, R.E. (Eds.) **Soil organic matter and biological activity**. Springer, p. 37-75.

VELLINI, A. L. T. T.; PAULA, N. F.; ALVES, P. L. C. A.; PAVANI, L. C.; BONINE, C. A. V.; SCARPINATI, E. A.; PAULA, R. C. Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 651-663, 2008.

VERA, J.; CASTRO, J.; CONTRERAS, R. A.; GONZÁLEZ, A.; MOENNE, A. Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. Xanthi). **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 79, p. 31-39, 2012.

VERLINDEN, G.; COUSSENS, T.; DE VliegHER, A.; BAERT, G.; HAESAERT, G. Effect of humic substances on nutrient uptake by herbage and on production and nutritive value of herbage from sown grass pastures. **Grass and Forage Science**, v. 65, p. 133-144, 2010.

VIEIRA, I. G. S. **Cultivo do tomateiro cereja irrigado com águas salinizadas e adubação nitrogenada**. 2014. 66 p. Tese (Dissertação em Horticultura Tropical) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

WADAS, W. Growth and marketable Potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber yield in response to foliar application of seaweed extract and humic acids. **Applied Ecology and Environmental Research**, 2019.

WANG, G. F.; LI, W. Q.; LI, W. Y.; WU, G. L.; ZHOU, C. Y.; CHEN, K. M. Characterization of Rice NADPH oxidase genes and their expression under various environmental conditions. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 9440-9458, 2013.

WANG, H.; ZHANG, M.; GUO, R.; SHI, D.; LIU, B.; LIN, X.; YANG, C. Effects of salt stress on ion balance and nitrogen metabolism of old and young leaves in rice (*Oryza sativa* L.). **BMC Plant Biol.**, v. 12, p. 194, 2012.

WANG, Y.; YANG, R.; ZHENG, J.; SHEN, Z.; XU, X. Exogenous foliar application of fulvic acid alleviate cadmium toxicity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 10-19, 2019.

WATERS, B. M.; LUCENA, C.; ROMERA, F. J.; JESTER, G. G.; WYNN, N. A.; ROJAS, C. L.; ALCÁNTARA, E.; PÉREZ-VICENTE, R. Ethylene involvement in the regulation of the H(+)-ATPase CsHA1 gene and of the new isolated ferric reductase CsFRO1 and iron transporter CsIRT1 genes in cucumber plants. **Plant Physiol Biochem.**, v. 45(5), p. 293-301, 2007.

WEBBER, V.; CARVALHO, S. M.; JORGE, T. D. S.; OGLIARI, P. J.; BARRETO, P. L. Otimização da Extração de carragenana obtida de *Kappaphycus alvarezii* através da metodologia de superfície de resposta. In: Congresso Brasileiro de Polímeros - Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu, PR, 2009.

XU, D.; LIU, D.; TANG, Z.; YU, G.; YUAN, J.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Structure of chemical components in different compost extracts characterized by chromatogram and spectroscopy analysis and its influence on plant growth promotion. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 14, n. 4, p. 325-333, 2012.

YAKHIN, O. I.; LUBYANOV, A. A.; YAKHIN, I. A. Changes in cytokinins, auxin, and abscisic acid contents in wheat seedlings treated with the growth regulator stifun. **Russ. J. Plant Physiol**, v. 59, p. 398-405, 2012.

YAKHIN, O.I.; LUBYANOV, A.A.; YAKHIN, I.A., BROWN, P.H. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. **Front Plant Sci**, v. 26, p. 2049, 2017.

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

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

ZANDONADI, D. B.; SANTOS, M. P.; BUSATO, J.; PERES, L.; FAÇANHA, A. R. Plant physiology as affected by humified organic matter. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, p. 12-25, 2013.

ZANDONADI, D. B.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. **Planta**. v. 6, p. 1583-1595, 2007.

ZANIN, L.; TOMASI, N.; CESCO, S.; VARANINI, Z.; PINTON, R. Humic Substances Contribute to Plant Iron Nutrition Acting as Chelators and Biostimulants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 675,2019.

ZANIN, L.; TOMASI, N.; ZAMBONI, A.; SEGA, D.; VARANINI, Z.; PINTON, R. Water-extractable humic substances speed up transcriptional response of maize roots to nitrate, **Environmental and Experimental Botany**, v. 147, p. 167-178, 2018.

ZHANG, H. J.; HAO, X. Y.; ZHANG, J. J.; WANG, L.; WANG, Y. C.; LI, N. N. Genome-wide identification of SULTR genes in tea plant and analysis of their expression in response to sulfur and selenium. **Protoplasma**, p. 1-14, 2021.

ZHAO, H.; MA, H.; YU, L.; WANG, X.; ZHAO, J. Genome-wide survey and expression analysis of amino acid transporter gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **PLoS One**, v. 7(11), 2012.

ZHOU, Y.; KISHCHENKO, O.; STEPANENKO, A.; CHEN, G.; WANG, W.; ZHOU, J.; PAN, C.; BORISJUK, N. The dynamics of NO₃⁻ and NH₄⁺ uptake in duckweed are coordinated with the expression of major nitrogen assimilation genes. **Plants (Basel)**, v. 11, p. 11, 2021.

ZIMMERMAN A. R.; AHN, M. Y. Organo-Mineral-Enzyme Interaction and Soil Enzyme Activity. In: SHUKLA, G.; VARMA, A. (Eds.) **Soil Enzymology**. Soil Biology, Springer, Berlin, Heidelberg, v. 22, 2010.

ZODAPE, M.; CHAUDHARY, S.; ESWARAN, D.; CHIKARA, K. Seaweed sap as an alternative liquid fertilizer for yield and quality improvement of wheat. **J. Plant Nutr.**, v. 36, p.192-200, 2013.

ZODAPE, S. T.; GUPTA, A.; BHANDAR, I. S. C.; RAWAT, U. S.; CHAUNHARY, D. R.; ESWARAN, K.; CHIKARA, J. Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 70, p. 215-219, 2011.

ZODAPE, S. T.; MUKHOPADHYAY, S.; ESWARAN, K.; REDDY, M. P.; CHIKARA, J. Enhanced yield and nutritional quality in green gram (*Phaseolus radiata* L) treated with seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) extract. **Journal of Scientific and Industrial Research**, Bangladesh, v. 69, p. 468-471, 2010.

8. APÊNDICES

Tabela 10. Parâmetros instrumentais usados para a fonte de íons OptaMax NG para a determinação das concentrações de ABA, IAA, Ácido Salicílico e Ácido.

Parâmetros Instrumentais	Valor
Vazão de gás de bainha	50 au
Taxa de fluxo de gás auxiliar	10 au
Taxa de fluxo de gás de varredura	1 au
Tensão de pulverização	2900 V
Temperatura do tubo de transferência de íons	320 °C
Temperatura do vaporizador	300 °C

Tabela 11. Precisão m/z dos fitohormônios e padrões internos, Energia de Colisão e seus principais fragmentos para determinação das concentrações de ABA, IAA, Ácido Salicílico, Ácido Jasmônico e Jasmonoil Isoleucina.

Analito	[M-H] ⁺ Hormone	CE (V)	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3
IAA	174.05605	8	130.0660	131.0697	128.0506
ABA	263.12888	8	153.0921	219.1389	204.1156
AS	137.02442	18	93.0346	65.0396	75.0240
JÁ	209.11832	10	59.0139	165.1285	97.0661
D-IAA	179.08744	8	135.0976		
D-ABA	269.16654	8	159.1297		
D-AS	141.04952	18	97.0598		
D-JÁ	214.14970	10	62.0327		

Tabela 12. Parâmetros instrumentais usados para a fonte de íons OptaMax NG para a determinação das concentrações de citocinina em tecidos vegetais.

Parâmetros Instrumentais	Valor
Vazão de gás de bainha	46 au
Taxa de fluxo de gás auxiliar	13 au
Taxa de fluxo de gás de varredura	0 au
Tensão de pulverização	3500 V
Temperatura do tubo de transferência de íons	320 °C
Temperatura do vaporizador	320 °C

Tabesa 13. Precisão m/z dos fitohormônios e padrões internos, Energia de Colisão e seus principais fragmentos para determinação das concentrações de citocininas em tecidos vegetais.

Analito	[M-H] ⁺ Hormone	CE (V)	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3
tZ	220.11929	15	136.0618	202.1087	185.0822
cZ	220.11929	15	136.0618	202.1087	185.0822
tZR	352.16155	18	220.1193	136.0618	202.1087
cZR	352.16155	18	220.1193	136.0618	202.1087

Continua...

Continuação da **Tabela 13.**

Analito	[M-H] Hormone	CE (V)	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3
DZ	222.13494	18	136.0618	148.0618	204.1244
DZR	354.17720	20	222.1349	136.0618	148.0618
iP	204.12437	14	136.0618	69.0699	148.0618
iPR	336.16663	18	204.1244	136.0618	148.0618
D-tZ	225.15067	15	137.0681		
D-tZR	357.19293	18	225.1507		
D-iP	210.16203	14	137.0681		
D-iPR	342.20429	18	210.1620		

Tabela 14. Caracterização química composicional da massa íntegra de algas de *Kappaphycus alvarezii*.

Parâmetro	Valores
Material Seco (%)	13,25 (±0,10)
Umidade (%)	86,75 (±0,10)
Cinzas (%)*	25,42 (± 1,73)
MgO	10,27
Al ₂ O ₃	7,17
SiO ₂	32,76
K ₂ O	44,41
CaO	4,10x
Fe ₂ O ₃	1,16
Carboidratos Totais (%)*	57,23 (± 2,45)
Celulose (%)	3,72 (±2,45)
Fração insolúvel em ácido (%) ^a	3,48 (±2,45)
Lipídeos (%)*	0,68 (±0,12)
Material Orgânico (%)	24,43
Carbono total (%)	11,86
Carbono Orgânico (%)	11,68
MO/CO	2,09
Estimativa de N (%)	0,58
C/N	20,30

Tabela 15. Principais parâmetros do teste JIP (Adaptada de YUSUF et al., 2010).

Parâmetros de fluorescência calculados a partir dos dados primários obtidos	
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescência variável
F_V/F_M	Rendimento quântico máximo do FSII
$V_t V_j$	Fluorescência variável relativa em um tempo "t" Fluorescência variável relativa em relação ao nível J
V_i	Fluorescência variável relativa em relação ao nível I
$M_0 = 4(F_{300\mu s} - F_0)/(F_M - F_0)$	Declive inicial aproximado (em ms ⁻¹) da fluorescência transiente $V = f(t)$
$S_s = V_j/M_0$	Área total normalizada complementar correspondente apenas a fase OJ (reflete um único volume de eventos de redução de Q_A)

Contiuna...

Continuação da **Tabela 15.**

Parâmetros de fluorescência calculados a partir dos dados primários obtidos	
$S_m = (\text{Area}) / (F_M - F_0)$	Área total normalizada complementar acima da curva OJIP (reflete múltiplos eventos de redução da Q_A)
$N = S_m / S_s$	Número total de elétrons transferidos para a cadeia de transporte de elétrons entre o tempo de 0 et (necessário para atingir F_M)
Atividade específica por centro de reação (RC)	
$ABS/RC = M_0 (1/V_j) (1/\phi P_0)$	Medida do tamanho aparente do sistema antena ou o fluxo de absorção por RC
$TR_0/RC = M_0 (1/V_j)$	Máxima taxa pela qual um éxciton é capturado pelo RC resultando em uma redução da plastoquinona (Q_A^-)
$ET_0/RC = M_0 (1/V_j) \Psi_0$	Reoxidação da Q_A^- via transporte de elétrons em um RC ativo
$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	Razão de dissipação total de energia de excitação não capturada do total de RC, sendo a dissipação neste caso à perda de energia na forma de calor
RE_0/RC	Redução do acceptor final de elétrons no lado do acceptor de elétrons do FSI por RC
Rendimentos energéticos ou taxas de fluxo	
$\phi P_0 = TR_0/ABS = F_v/F_M$	Rendimento quântico máximo fotoquímico
$\phi E_0 = ET_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons
$\phi D_0 = 1 - \phi P_0 = (F_0/F_M)$	Rendimento quântico para dissipação de energia
$\phi R_0 = RE_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de Q_A^- para o acceptor final de elétrons do FSI
Eficiências	
$\psi E_0 = ET_0/TR_0$	Eficiência com que um éxciton capturado no RC pode mover um elétron de Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons
$\rho_0 = RE_0/TR_0$	Eficiência com que um éxciton capturado no RC pode mover um elétron dentro da cadeia de transporte de elétrons de Q_A^- para os aceptores finais de elétrons do FSI
$\delta R_0 = RE_0/ET_0$	Eficiência com que um elétron pode mover o intersistema de aceptores de elétrons reduzidos no intersistema para o acceptor final de elétrons do FSI
Índices de desempenho	
$PI_{ABS} = (RC/ABS) B$ ($\phi P_0/10S\phi P_0$) $0S_i$ ($\Psi_0/10\Psi_0$) $= (RC/ABS) B (TR_0/DI_0) \times (ET_0/1TSET_0)$	Índice de desempenho fotossintético (conservação de energia a partir do éxciton para a redução dos aceptores de elétrons do intersistema)
$PI_{total} = PI_{ABS} BS (\delta_0/1B\delta_0)$	Índice de desempenho fotossintético total (conservação de energia a partir do éxciton para a redução de aceptores finais do FSI)

Tabela 16. Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* de *Oryza Sativa* L. var. nippombare submetida a diferentes doses e formas de aplicação de k-sap.

	Tratamento	ABS/RC	TR₀/RC	ET₀/RC	DI₀/RC	PI_{ABS}	PI_{TOTAL}
24 Horas	Controle	2,29 ^{ns}	1,81 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,48 ^{ns}	2,04 ^{ns}	1,63 ^b
	K-sapR 2%	2,22	1,76	0,98	0,46	2,24	1,95 ^a
	K-sapF 2%	2,25	1,78	0,99	0,46	2,14	1,80 ^{ab}
	K-sapF 10%	2,25	1,79	0,99	0,47	2,12	1,85 ^{ab}
	CV (%)	5,76	5,23	4,97	8,39	1,71	14,78
48 Horas	Controle	2,09 ^{ns}	1,66 ^{ns}	0,97 ^{ns}	0,43 ^{ns}	2,60 ^a	1,84 ^{ns}
	K-sapR 2%	2,21	1,75	0,98	0,46	2,23 ^b	1,75
	K-sapF 2%	2,14	1,70	0,97	0,44	2,39 ^{ab}	1,69

Continua...

Continuação da Tabela 16.

	Tratamento	ABS/RC	TR ₀ /RC	ET ₀ /RC	Di ₀ /RC	PI _{ABS}	PI _{TOTAL}
48 Horas	K-sapF 10%	2,17	1,71	0,97	0,45	2,30 ^b	1,71
	CV (%)	5,07	4,73	5,51	6,70	9,75	16,34
	Controle	2,12 ^{ns}	1,69 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,43 ^{ns}	2,65 ^{ns}	2,04 ^{ns}
72 Horas	K-sapR 2%	2,18	1,72	1,00	0,45	2,41	2,01
	K-sapF 2%	2,15	1,71	0,99	0,44	2,48	1,87
	K-sapF 10%	2,18	1,73	1,00	0,45	2,43	2,00
	CV (%)	5,59	5,16	5,42	7,81	11,67	15,73
96 Horas	Controle	1,98 ^{ns}	1,55 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,43 ^{ns}	2,42 ^{ns}	1,46 ^b
	K-sapR 2%	2,00	1,59	0,92	0,41	2,70	2,26 ^a
	K-sapF 2%	1,99	1,57	0,91	0,42	2,59	1,77 ^b
	K-sapF 10%	1,94	1,53	0,88	0,41	2,65	1,87 ^{ab}
	CV (%)	5,29	4,95	5,66	7,33	13,17	20,65
120 Horas	Controle	2,20 ^{ns}	1,72 ^{ns}	0,93 ^{ns}	0,47 ^{ns}	1,97 ^{ns}	1,75 ^{ns}
	K-sapR 2%	2,08	1,64	0,90	0,44	2,30	1,87
	K-sapF 2%	2,10	1,65	0,92	0,45	2,37	1,93
	K-sapF 10%	2,10	1,65	0,93	0,45	2,31	1,95
	CV (%)	9,40	9,13	5,66	10,61	23,76	14,45
144 Horas	Controle	2,10 ^a	1,65 ^a	0,92 ^a	0,45 ^a	2,23 ^b	1,76 ^{ab}
	K-sapR 2%	1,85 ^b	1,47 ^b	0,87 ^b	0,38 ^b	3,05 ^a	2,07 ^a
	K-sapF 2%	2,08 ^a	1,63 ^a	0,91 ^a	0,45 ^a	2,26 ^b	1,75 ^b
	K-sapF 10%	2,18 ^a	1,70 ^a	0,92 ^a	0,48 ^a	1,96 ^b	1,48 ^b
	CV (%)	5,18	4,54	2,86	8,28	13,81	16,09

* Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, de acordo com teste de Tukey ($p < .05$). * ns = sem diferença estatística, de acordo com teste de Tukey ($p < .05$), $n = 11$.

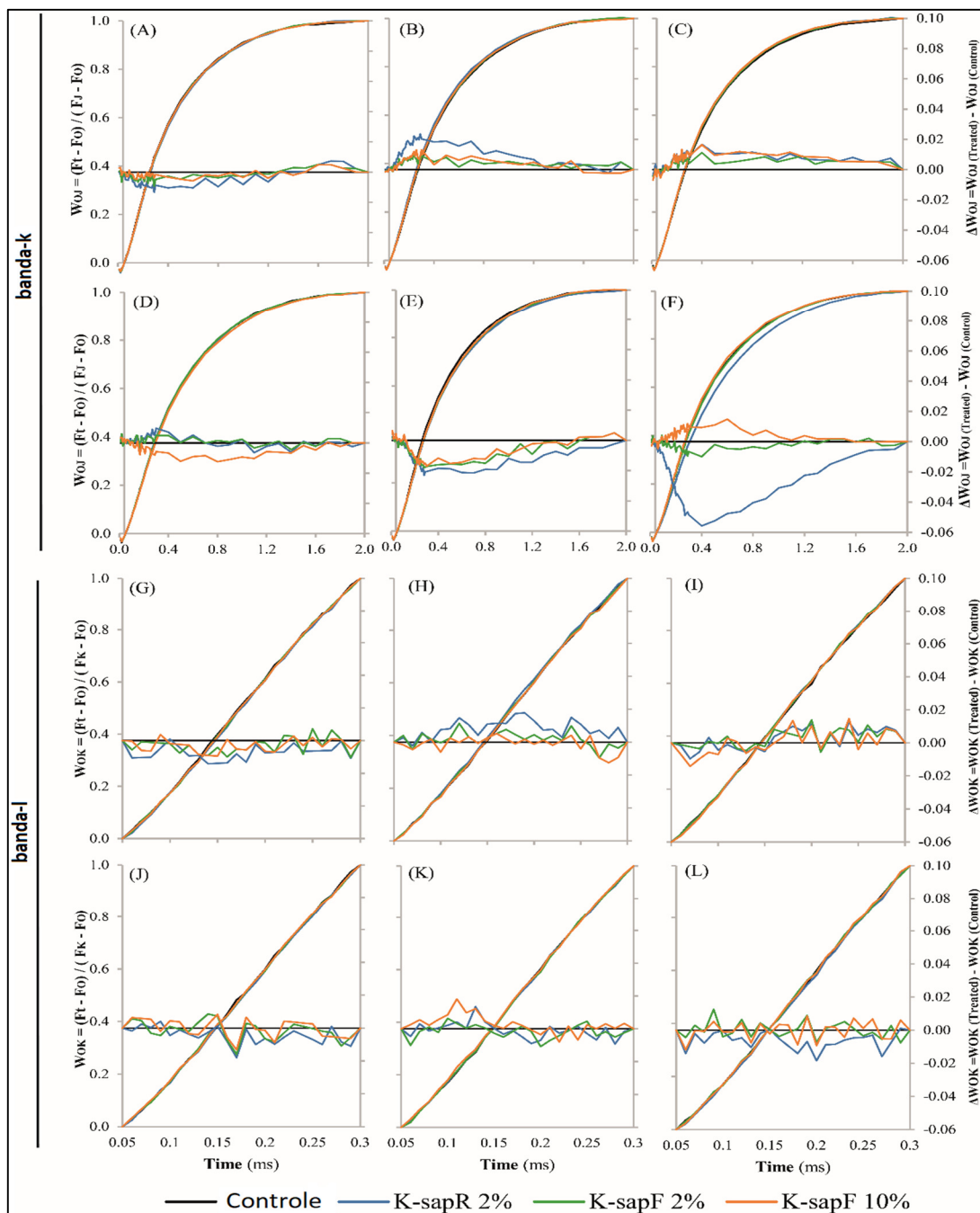


Figura 50. Fluorescência transiente da clorofila α de folhas adaptadas ao escuro de plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) submetida à diferentes doses e formas de aplicação de k-sap. Fluorescência variável relativa entre as etapas O e J (WOJ; A, B, C, D, E, F) e cinética média (eixo vertical direito) representada entre as etapas O e J (Δ WOJ), revelando a banda K; Fluorescência variável relativa entre as etapas O e K (WOK; G, H, I, J, K, L) e cinética média (eixo vertical direito) representada entre as etapas O e K (Δ WOK), revelando a banda L. (A, G) = 24 horas; (B, H) = 48 horas; (C, I) = 72 horas; (D, J) = 96 horas; (E, K) = 120 horas; (F, L) = 144 horas. n = 11.

Tabela 17. Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* de *Oryza Sativa* L. var. nippombare submetida à pulverização foliar de diferentes bioestimulantes.

	Tratamento	ABS/RC	TR ₀ /RC	ET ₀ /RC	Di ₀ /RC	PI _{ABS}	PI _{TOTAL}
24 Horas	Controle	2,71 ^{ns}	2,11 ^{ns}	1,08 ^{ns}	0,60 ^{ns}	1,45 ^{ns}	1,28 ^{ns}
	AFVC	2,57	2,02	1,06	0,55	1,66	1,45
	K-sap	2,78	2,13	1,03	0,65	1,10	0,89
	AFVC + K-sap	2,69	2,06	1,03	0,64	1,24	0,98
	CV (%)	6,46	5,32	6,66	11,52	26,21	52,41
48 Horas	Controle	2,85 ^{ns}	2,21 ^{ns}	1,08 ^{ns}	0,64 ^b	1,18 ^a	1,43 ^{ns}
	AFVC	2,86	2,21	1,06	0,65 ^{ab}	1,09 ^{ab}	1,43
	K-sap	2,83	2,18	1,03	0,65 ^{ab}	1,09 ^{ab}	1,56
	AFVC + K-sap	3,04	2,31	1,07	0,73 ^a	0,91 ^b	1,25
	CV (%)	4,30	3,68	4,56	7,30	13,22	14,01
72 Horas	Controle	2,45 ^{ns}	1,94 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,50 ^{ns}	1,64 ^{ns}	1,60 ^{ns}
	AFVC	2,53	1,99	1,00	0,53	1,50	1,48
	K-sap	2,50	1,99	1,00	0,52	1,56	1,48
	AFVC + K-sap	2,50	1,98	0,98	0,52	1,54	1,42
	CV (%)	5,51	5,23	4,57	7,02	12,09	15,84
96 Horas	Controle	2,74 ^{ns}	2,16 ^{ns}	1,11 ^{ns}	0,57 ^{ns}	1,47 ^b	1,26 ^b
	AFVC	2,71	2,15	1,12	0,56	1,55 ^{ab}	1,37 ^{ab}
	K-sap	2,59	2,07	1,10	0,52	1,73 ^a	1,51 ^{ab}
	AFVC + K-sap	2,63	2,09	1,12	0,54	1,72 ^a	1,60 ^a
	CV (%)	3,98	3,61	3,07	5,44	8,38	11,55
120 Horas	Controle	2,41 ^{ns}	1,93 ^{ns}	1,02 ^{ns}	0,48 ^b	1,87 ^{ns}	1,34 ^{ns}
	AFVC	2,28	1,83	0,99	0,45	2,09	1,49
	K-sap	2,34	1,88	1,01	0,46	2,05	1,46
	AFVC + K-sap	2,39	1,91	1,02	0,48	1,92	1,32
	CV (%)	4,12	3,76	2,90	5,92	9,56	13,00
144 Horas	Controle	2,38 ^{ns}	1,88 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,49 ^{ns}	1,61 ^{ns}	1,22 ^{ns}
	AFVC	2,40	1,92	0,97	0,49	1,67	1,23
	K-sap	2,37	1,88	0,96	0,48	1,74	1,31
	AFVC + K-sap	2,33	1,86	0,96	0,47	1,82	1,38
	CV (%)	3,57	3,27	2,66	4,71	8,61	12,04

* Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, de acordo com teste de Tukey (p < .05). * ns = sem diferença estatística, de acordo com teste de Tukey (p < .05), n =5.

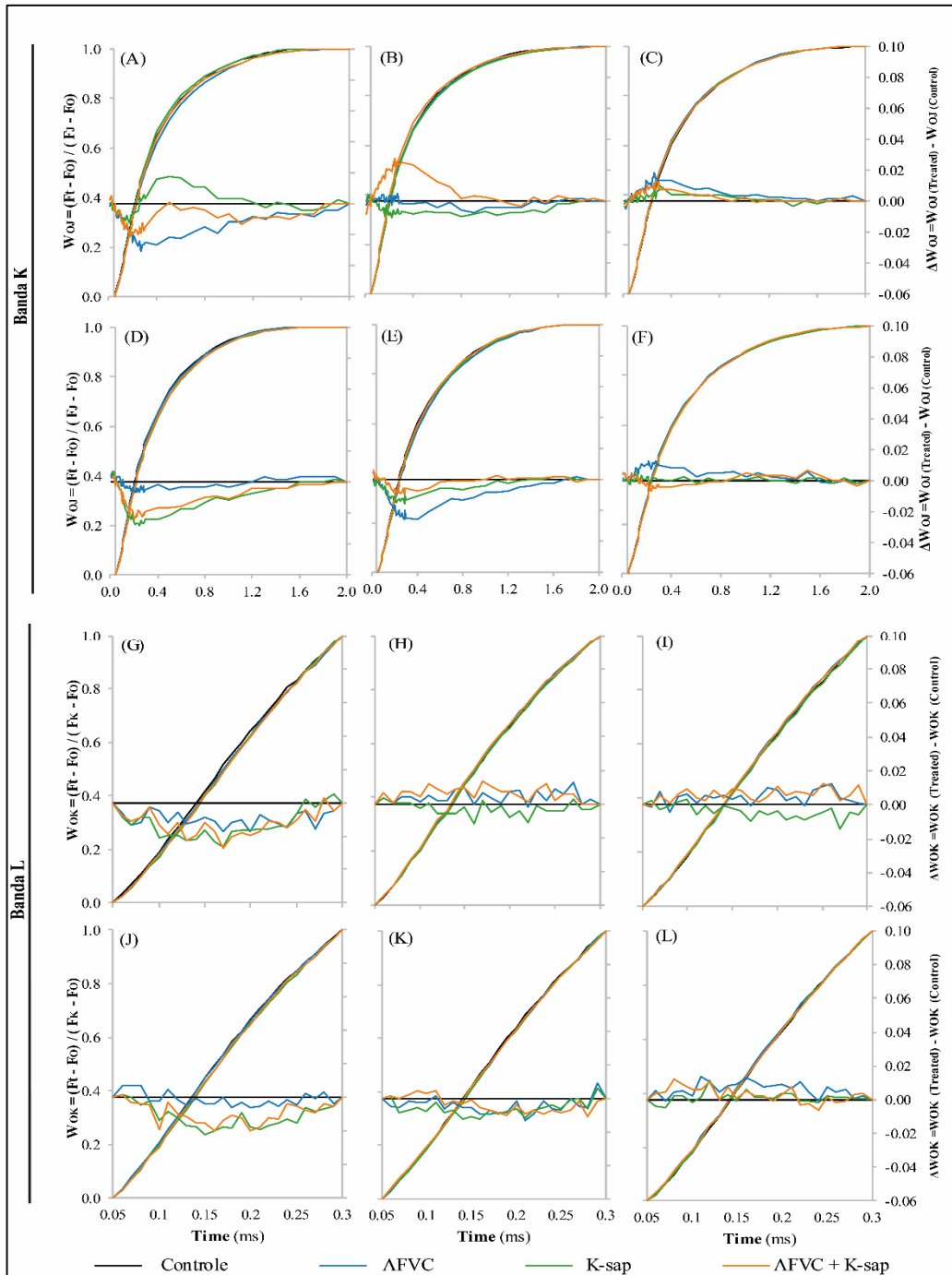


Figura 51. Fluorescência transiente da clorofila α de folhas adaptadas ao escuro de plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) submetida à pulverização foliar de diferentes bioestimulantes. Fluorescência variável relativa entre as etapas O e J (WOJ; A, B, C, D, E, F) e cinética média (eixo vertical direito) representada entre as etapas O e J (Δ WOJ), revelando a banda K; Fluorescência variável relativa entre as etapas O e K (WOK; G, H, I, J, K, L) e cinética média (eixo vertical direito) representada entre as etapas O e K (Δ WOK), revelando a banda L. (A, G) = 24 horas; (B, H) = 48 horas; (C, I) = 72 horas; (D, J) = 96 horas; (E, K) = 120 horas; (F, L) = 144 horas. n = 5.