

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

TESE

Vias de Sinalização Envolvidas no Estímulo do
Crescimento Radicular em Plantas de Arroz
Ativadas por Ácidos Húmicos

Andressa Fabiane Faria de Souza

2022



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

**VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO ESTÍMULO DO
CRESCIMENTO RADICULAR EM PLANTAS DE ARROZ ATIVADAS
POR ÁCIDOS HÚMICOS**

ANDRESSA FABIANE FARIA DE SOUZA

Sob a Orientação do professor
Leandro Azevedo Santos

e Coorientação do professor
Andrés Calderín García

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora**, no
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Ciência do Solo, Área de
Concentração em Fertilidade do Solo e
Nutrição de Plantas.

Seropédica, RJ
Novembro de 2022

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

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

S725v	<p>Souza, Andressa Fabiane Faria de, 1993- Vias de sinalização envolvidas no estímulo do crescimento radicular em plantas de arroz ativadas por ácidos húmicos / Andressa Fabiane Faria de Souza. – Seropédica, 2022. 79 f.: il.</p> <p>Orientador: Leandro Azevedo Santos. Tese (Doutorado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, 2022.</p> <p>1. Bioatividade. 2. Raiz. 3. Inibidores. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Oryza sativa. I. Santos, Leandro Azevedo, 1981-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo. III. Título.</p>
-------	--

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Projeto JCNE - E-26/202.767/2019.

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



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 22 / 2022 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.073798/2022-55

Seropédica-RJ, 01 de dezembro de 2022.

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

ANDRESSA FABIANE FARIA DE SOUZA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas.

TESE APROVADA EM 29/11/2022.

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Ricardo Luiz Louro Berbara. Dr. UFRRJ
Orlando Carlos Huertas Tavares. Dr. UFRRJ
Marcia Soares Vidal. Dra. EMBRAPA
Leonardo Barros Dobbss. Dr. UFVJM

(Assinado digitalmente em 02/12/2022 09:57)
LEANDRO AZEVEDO SANTOS
COORDENADOR CURS/POS-GRADUACAO - TITULAR
CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)
Matrícula: 2626406

(Assinado digitalmente em 02/12/2024 09:00)
RICARDO LUIZ LOURO BERBARA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptS (12.28.01.00.00.00.33)
Matrícula: 387406

(Assinado digitalmente em 01/12/2022 16:50)
ORLANDO CARLOS HUERTAS TAVARES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 098.383.947-69

(Assinado digitalmente em 01/12/2022 16:50)
LEONARDO BARROS DOBBSS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 081.037.887-67

(Assinado digitalmente em 01/12/2022 17:04)
MARCIA SOARES VIDAL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 026.210.947-67

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **22**, ano: **2022**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, datade emissão: **01/12/2022** e o código de verificação: **3399175f93**

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese a todos aqueles que têm o mundo vegetal
como fonte de inspiração tecnológica.*

*Il futuro non potrà che far propria la metafora vegetale.
Dovremo per forza ispirarci alle piante per ricominciare a "muoverci".
La rivoluzione è già in atto anche se non ce ne accorgiamo.*

Plant revolution: Le piante hanno già inventato il nostro futuro

Stefano Mancuso, 2019.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer de maneira especial ao meu orientador, professor Leandro Azevedo Santos, por me conceder a liberdade de buscar minhas próprias questões de pesquisa e confiar em mim para levar adiante este projeto, por compartilhar suas ideias inspiradoras ajudando a moldar meu pensamento científico e por ser muito flexível na minha trajetória acadêmica. Também agradeço pelos onze anos de convivência e ensinamentos que me proporcionaram concluir o doutorado.

Agradeço ao meu coorientador, professor Andrés Calderín García, pelas contribuições substanciais e intelectuais ao meu trabalho. Pelo conhecimento científico compartilhado durante a disciplina de Química da Matéria Orgânica do Solo, me abrindo novos horizontes.

Aos professores Manlio Silvestre Fernandes e Carlos Alberto Bucher por todo o conhecimento transmitido. Nossas antigas reuniões semanais contribuíram para moldar meu pensamento crítico.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por toda a minha formação acadêmica, me proporcionando construir um conhecimento sólido e ampliar minhas perspectivas, pelos laços criados com pessoas inspiradoras.

Ao Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (LNMP), onde tive a oportunidade de gerar e compartilhar o conhecimento prático da ciência. Agradecimentos especiais à: Nivaldo Sátiro, André Nogueira, Clenya Oliveira, Rakiely Martins e Ariel Ribeiro. Deixo aqui também meu agradecimento a todo o suporte recebido de outros laboratórios, em especial Tancio Gutier, Sandra Lima e Marinete Rodrigues.

Gostaria também de agradecer aos meus amigos: Marcondes Coelho, Douglas Gomes, Martha Elisa, Janne Kety e Júlio César. Sem vocês teria sido bem mais difícil! Em especial meu amigo Eduardo Neto, com quem compartilho meus medos e meus anseios desde o primeiro ano na universidade. Enfrentamos anos desafiadores e por vezes frustrantes durante o doutorado, mas me aliviava ao saber que tínhamos um ao outro.

Agradeço à minha família pelo incomensurável apoio. Em especial minha mãe, Andréa Maria Faria, e ao meu pai, Fabiano Raymundo de Souza, que sempre me incentivaram a estudar, trabalhar e me encorajam a nunca desistir dos meus objetivos. Nossas longas conversas por telefone me fazem sentir mais “em casa” mesmo estando longe.

E por fim, agradeço ao Arthur de Souza, por todo amor, carinho, companheirismo, pela sua extrema paciência com todos os meus estresses, principalmente nos momentos finais de finalização da tese. Não tenho palavras suficientes para agradecer todo o seu apoio ao longo desses anos. Que possamos ainda compartilhar muitos momentos juntos.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

SOUZA, Andressa Fabiane Faria de. **Vias de sinalização envolvidas no estímulo do crescimento radicular em plantas de arroz ativadas por ácidos húmicos**. 2022. 79f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

O uso de bioestimulantes está ganhando uma significativa visibilidade científica e comercial, e é considerada uma técnica promissora na melhoria da sustentabilidade ecológica da produção agrícola. Dentre as substâncias bioestimulantes, inúmeros estudos relatam o efeito dos ácidos húmicos (AH) como promotor do crescimento radicular melhorando a aquisição e o uso eficiente de nutrientes, aumento da tolerância à estresses abióticos e produtividade. Apesar das evidências estabelecidas dos efeitos bioestimulante, muitos aspectos funcionais ainda precisam ser elucidados. A pesquisa desenvolvida nessa tese busca contribuir para o entendimento dos mecanismos fisiológicos por trás dessas respostas utilizando abordagens fenotípicas e moleculares associadas ao uso de inibidores de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de vias hormonais. Nesse contexto, foram estabelecidas as seguintes hipóteses: (i) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular via regulação oxidativa; (ii) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular via regulação hormonal; (iii) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular por meio da interação entre regulação das ERO e regulação hormonal. Para verificar essas hipóteses, o objetivo geral da pesquisa foi elucidar os mecanismos de sinalização pelo qual o ácido húmico estimula o crescimento do sistema radicular em plantas de arroz. Assim, a Tese foi dividida em 2 capítulos, sendo o objetivo do Capítulo I confirmar o efeito bioestimulante proporcionado pela aplicação do AH em raízes de plantas de arroz aliado a técnicas espectroscópicas para relacionar as propriedades do AH a sua bioatividade. Para isso, foi utilizado o vermicomposto para extração e purificação do AH e realizada espectroscopia RMN de ^{13}C via CP/MAS e ATR-FTIR, e foram realizadas curvas de calibração para o AH e os inibidores (*scavengers*). Os dados obtidos sugerem que o AH oriundo do vermicomposto possui maior predomínio de fragmentos alifáticos e carbono carboxílico, que contribuem para o aumento da bioatividade. O objetivo do Capítulo II foi elucidar os mecanismos de sinalização responsáveis pela indução do crescimento do sistema radicular em resposta à aplicação de AH. Para isso, foi realizado um experimento de *time-course* para verificar o efeito da aplicação dos inibidores sobre o sistema radicular ao longo do tempo e realizada a aplicação combinada do AH e inibidor para verificar seu efeito sobre a morfologia radicular e expressão gênica. Através da abordagem fenotípica foi possível verificar os efeitos da aplicação de AH sobre as características morfológicas de plântulas de arroz, sugerindo que a promoção do crescimento radicular é um mecanismo dependente da produção de ERO, e o efeito estimulatório do AH parece ser dependente da produção de HO^* , O_2^{-*} e H_2O_2 . Através da abordagem molecular foi possível observar alterações na regulação gênica ocasionadas pela aplicação do AH, sendo mais expressiva em genes relacionados a enzimas antioxidantes. As conclusões gerais deste estudo foram que AH extraídos de vermicomposto desempenham um papel no estímulo do crescimento radicular em plantas de arroz e sinalizam para o crescimento do sistema radicular via regulação oxidativa e hormonal, apresentando um efeito protetivo no crescimento das plantas, explicando em parte os mecanismos fisiológicos do AH por trás das respostas na promoção do crescimento radicular.

Palavras-chave: Bioatividade. Raiz. Inibidores. Espécies reativas de oxigênio. *Oryza sativa*.

GENERAL ABSTRACT

SOUZA, Andressa Fabiane Faria de. **Signaling pathways involved in root growth stimulation in rice plants activated by humic acids**. 2022. 79p. Thesis (Doctor in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

The use of biostimulants is gaining significant scientific and commercial visibility and is considered a promising technique for improving the ecological sustainability of agricultural production. Among biostimulant substances, numerous studies report the effects of humic acids (HA) as promoters of root growth, improving nutrient acquisition and use efficiency, increasing tolerance to abiotic stresses, and enhancing productivity. Despite the established evidence of the biostimulant effects, many functional aspects remain to be elucidated. This thesis aims to contribute to the understanding of the physiological mechanisms behind these responses by using phenotypic and molecular approaches associated with the use of reactive oxygen species (ROS) and hormonal pathway inhibitors. In this context, the following hypotheses were established: (i) HA isolated from vermicompost signal root system growth via oxidative regulation; (ii) HA isolated from vermicompost signal root system growth via hormonal regulation; (iii) HA isolated from vermicompost signal root system growth through the interaction between ROS regulation and hormonal regulation. To test these hypotheses, the general objective of the research was to elucidate the signaling mechanisms by which humic acid stimulates root system growth in rice plants. Thus, the thesis was divided into two chapters, with Chapter I aimed at confirming the bio-stimulant effect provided by HA application in rice plant roots combined with spectroscopic techniques to relate HA properties to its bioactivity. For this, vermicompost was used for HA extraction and purification, and ^{13}C NMR via CP/MAS and ATR-FTIR spectroscopy were performed, along with calibration curves for HA and inhibitors (scavengers). The data suggest that HA from vermicompost has a greater predominance of aliphatic fragments and carboxylic carbon, which contribute to increased bioactivity. Chapter II aimed to elucidate the signaling mechanisms responsible for the induction of root system growth in response to HA application. For this, a time-course experiment was conducted to verify the effect of inhibitors on the root system over time, and combined application of HA and inhibitors was performed to assess their effects on root morphology and gene expression. The phenotypic approach revealed the effects of HA application on the morphological characteristics of rice seedlings, suggesting that root growth promotion is a mechanism dependent on ROS production, and the stimulatory effect of HA appears to depend on the production of HO^* , O_2^{-*} , and H_2O_2 . The molecular approach observed changes in gene regulation caused by HA application, being more expressive in genes related to antioxidant enzymes. The overall conclusions of this study were that HA extracted from vermicompost play a role in stimulating root growth in rice plants and signal root system growth via oxidative and hormonal regulation, presenting a protective effect on plant growth and partially explaining the physiological mechanisms of HA behind the responses in promoting root growth.

Key words: Bioactivity. Root. Scavengers. Reactive Oxygen Species. *Oryza sativa*.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade relativa (%) dos tipos de carbono em amostra de AH proveniente de vermicomposto.	17
Tabela 2. Valores de estabilidade dos genes de referência obtidos através da análise realizada no software Normfinder. Ubiquitina (<i>OsUBC</i>), ubiquitina 5 (<i>OsUBQ5</i>) e actina (<i>OsACT</i>).	32
Tabela 3. Sequências dos primers forward e reverse usados nas reações de RT-PCR semiquantitativa em tempo real.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de cultivo das plantas de arroz da variedade Nipponbare que foram submetidas a diferentes concentrações de AH com suprimento de 2mM de N (1,5 mM de N-NO_3^- e 0,5 mM de N-NH_4^+). Aos 12 DAG foi realizada a coleta três horas após o início do período de luz para excluir variações diurnas. DAG: dias após a germinação, FI: força iônica, AH: ácido húmico.	13
Figura 2. Esquema de cultivo das plantas de arroz da variedade Nipponbare que foram submetidas a diferentes concentrações dos inibidores, com suprimento de 2 mM de N (1,5 mM de N-NO_3^- e 0,5 mM de N-NH_4^+). Aos 12 DAG foi realizada a coleta três horas após o início do período de luz para excluir variações diurnas. DAG: dias após a germinação, FI: força iônica.....	15
Figura 3. Espectro na região do infravermelho transformada de Fourier com reflectância atenuada (ATR-FTIR) do ácido húmico proveniente de vermicomposto. Dado publicado recentemente pela autora em Souza et al. (2021).	16
Figura 4. Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C RMN CP/MAS do ácido húmico proveniente de vermicomposto. Dado publicado recentemente pela autora em Souza et al. (2021).....	17
Figura 5. Curva de calibração das concentrações de AH. As plantas foram coletadas aos 12 DAG e foram realizadas duas aplicações de AH, aos 6 e aos 9DAG. (a-c) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao AH. (d-h). Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (i) Plantas crescidas nas diferentes concentrações de AH. AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 2, 5, 10, 30, 50, 80, 100 e 150 mg de AH.L^{-1}	18
Figura 6. Esquema de cultivo das plantas de arroz da variedade Nipponbare que foram submetidas aos diferentes tratamentos com inibidor, e suprimento de 2mM de N (1,5 mM de N-NO_3^- e 0,5 mM de N-NH_4^+). Foram realizadas coletas nos tempos de 0 horas (h), 24 h, 48 h e 72 h. DAG: dias após a germinação, FI: força iônica.	28
Figura 7. Esquema de cultivo das plantas de arroz da variedade Nipponbare que foram submetidas aos diferentes tratamentos com AH e inibidor com suprimento de 2 mM de N (1,5 mM de N-NO_3^- e 0,5 mM de N-NH_4^+). Aos 12 DAG foi realizada a coleta três horas após o início do período de luz para excluir variações diurnas. DAG: dias após a germinação, FI: força iônica, AH: ácido húmico.	29
Figura 8. Efeito da aplicação combinada entre AH e SB, inibidor de HO^* . As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e SB. (d-i) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e SB. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (j) Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. SB: benzoato de sódio, HO^* : hidroxila, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.....	36
Figura 10. Efeito da aplicação combinada entre AH e DMTU, inibidor de H_2O_2 . As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e DMTU. (d-i) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e DMTU. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (j) Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. DMTU: $\text{N N}'$ -Dimethylthiourea, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.....	37

- Figura 11.** Efeito da aplicação combinada entre AH e DPIC, inibidor de NADPH oxidase. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-c)** Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e DPIC. **(d-i)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e DPIC. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(j)** Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. DPI: Diphenyleneiodonium chloride, NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.38
- Figura 12.** Efeito da aplicação combinada entre AH e PCIB, inibidor da auxina. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-c)** Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e PCIB. **(d-i)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e PCIB. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(j)** Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. PCIB: Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.38
- Figura 13.** Efeito da aplicação combinada entre AH e FLD, inibidor de ABA. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-c)** Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e FLD. **(d-i)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e FLD. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(j)** Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. FLD: fluridone, ABA: ácido abscísico, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.39
- Figura 14.** Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene BAS1 relacionado a enzimas antioxidantes. **(a)** SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). **(b)** TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). **(c)** DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). **(d)** DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). **(e)** PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). **(f)** FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).40
- Figura 15.** Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene GPX relacionado a enzimas antioxidantes. **(a)** SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). **(b)** TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). **(c)** DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). **(d)** DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). **(e)** PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). **(f)** FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).40
- Figura 16.** Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene PRX112 relacionado a enzimas antioxidantes. **(a)** SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). **(b)** TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). **(c)** DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). **(d)** DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). **(e)** PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). **(f)** FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).41
- Figura 17.** Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene CuZnSOD1 relacionado a enzimas antioxidantes. **(a)** SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). **(b)** TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). **(c)** DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). **(d)** DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de

nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).41

Figura 18. Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene TOR relacionado a regulação do crescimento radicular. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO*: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂*: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).42

Figura 19. Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene IAA11 relacionado a regulação do crescimento radicular. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO*: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂*: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).43

Figura 20. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene OsCPK7. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO*: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂*: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).44

Figura 21. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene OsTPC1. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO*: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂*: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).44

Figura 22. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene OsA7. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO*: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂*: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).45

Figura 23. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene HXK5. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO*: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂*: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-

chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).45

Figura 24. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene TOM1. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).46

Figura 25. Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene SEC1B relacionado a regulação do crescimento radicular. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).46

Figura 26. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene OsNRT2.1. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).47

Figura 27. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene PHS1. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).48

Figura 28. Curva de calibração das concentrações de AH. As plantas foram coletadas aos 13 DAG e foi realizada somente uma aplicação de AH aos 10 DAG. (a-c) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao AH. (d-h). Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (i) Plantas crescidas nas diferentes concentrações de AH. AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 2, 5, 10, 30, 50, 80, 100 e 150 mg de AH.L⁻¹.66

Figura 29. Curva de calibração das concentrações de AH. As plantas foram coletadas aos 16 DAG e foram realizadas duas aplicações de AH, aos 10 e aos 13 DAG. (a-c) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao AH. (d-h). Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (i) Plantas crescidas nas diferentes concentrações de AH. AH:

ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 2, 5, 10, 30, 50, 80, 100 e 150 mg de AH.L⁻¹..... 67

Figura 30. Curva de calibração das concentrações de SB, inibidor de HO*. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao SB. (d-h). Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao SB. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (i) Plantas crescidas nas diferentes concentrações de SB. SB: benzoato de sódio, HO*: hidroxila, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 0,05, 0,5, 1, 1,5, 3, 5, 10, 50 mM de SB.L⁻¹. 68

Figura 31. Curva de calibração das concentrações de TIRON, inibidor de O₂^{-*}. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao TIRON. (d-h). Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao TIRON. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (i) Plantas crescidas nas diferentes concentrações de TIRON. TIRON: Ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, O₂^{-*}: superóxido, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 50, 100, 300, 500, 800, 1000, 1500, 2000 µM de TIRON.L⁻¹..... 69

Figura 32. Curva de calibração das concentrações de DMTU, inibidor de H₂O₂. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao DMTU. (d-h). Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao DMTU. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (i) Plantas crescidas nas diferentes concentrações de DMTU. DMTU: N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20 e 50, 100 mM de DMTU.L⁻¹..... 70

Figura 33. Curva de calibração das concentrações de DPIC, inibidor de NADPH oxidase. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao DPIC. (d-h). Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao DPIC. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (i) Plantas crescidas nas diferentes concentrações de DPIC. DPI: Diphenyleneiodonium chloride, NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0 (controle absoluto), 0 (controle contendo solvente, DMSO), 1, 5, 10, 25, 30 µM de DPIC.L⁻¹ 71

Figura 34. Curva de calibração das concentrações de PCIB, inibidor de ação da auxina. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao PCIB. (d-h). Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao PCIB. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (i) Plantas crescidas nas diferentes concentrações de PCIB. PCIB: Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0 (controle absoluto), 0 (controle contendo solvente, DMSO), 5, 10, 25, 50, 100, 200 µM de PCIB . L⁻¹. 72

Figura 35. Curva de calibração das concentrações de FLD, inibidor de ABA. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao FLD. (d-h). Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao FLD. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (i) Plantas crescidas nas diferentes concentrações de FLD. FLD: Fluridone, ABA: ácido abscísico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

- Concentrações utilizadas: 0 (controle absoluto), 0 (controle contendo solvente, DMSO), 5, 10, 25, 50, 100, 200 μM de FLD . L^{-1}73
- Figura 36.** *Time-course* do inibidor SB, inibidor de HO^* . As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-b) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao SB. (c-h) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição SB. (i) Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. SB: benzoato de sódio, HO^* : hidroxila, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.....74
- Figura 37.** *Time-course* do inibidor TIRON, inibidor de O_2^* . As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-b) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao TIRON. (c-h) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição TIRON. (i) Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. TIRON: Ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, O_2^* : superóxido, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.....75
- Figura 38.** *Time-course* do inibidor DMTU, inibidor de H_2O_2 . As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-b) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao DMTU. (c-h) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição DMTU. (i) Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. DMTU. DMTU: N N'-Dimethylthiourea, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.....76
- Figura 39.** *Time-course* do inibidor DPIC, inibidor de NADPH oxidase. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-b) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao DPIC. (c-h) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição DPIC. (i) Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. DPI: Diphenyleneiodonium chloride, NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.77
- Figura 40.** *Time-course* do inibidor PCIB, inibidor de ação da auxina. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-b) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao PCIB. (c-h) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição PCIB. (i) Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. PCIB: Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.78
- Figura 41.** *Time-course* do inibidor FLD, inibidor de ABA. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-b) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao FLD. (c-h) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição FLD. (i) Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. FLD: Fluridone, ABA: ácido abscísico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.....79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA GERAL	2
2.1 Importância da Cultura do Arroz para os Estudos Biotecnológicos	2
2.2 Papel do Ácido Húmico como Bioestimulante para as Plantas	3
2.3 Papel Regulatório das ERO nas Vias de Sinalização em Plantas	5
3. CAPÍTULO I CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS AH EM PLANTAS DE ARROZ	7
3.1 RESUMO	8
3.2 ABSTRACT	9
3.3 INTRODUÇÃO	10
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.4.1 Extração e purificação do ácido húmico	11
3.4.2 Espectroscopia mediante ATR-FTIR	11
3.4.3 Espectroscopia mediante RMN de ¹³ C via CP/MAS	12
3.4.4 Curva de calibração das concentrações do ácido húmico e inibidores	12
3.4.5 Análise da morfologia radicular	15
3.4.6 Análise estatística	15
3.5 RESULTADOS	16
3.5.1 Espectroscopia do AH usando ATR- FTIR-e RMN de ¹³ C via CP/MAS	16
3.5.2 Efeito da aplicação de AH e inibidores sobre o crescimento do sistema radicular	17
3.6 DISCUSSÃO	20
3.7 CONCLUSÕES	22
4. CAPÍTULO II MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO DO AH QUE PROMOVEM O CRESCIMENTO RADICULAR EM PLANTAS DE ARROZ SÃO DEPENDENTES DAS ERO, ABA E AUXINA	23
4.1 RESUMO	24
4.2 ABSTRACT	25
4.3 INTRODUÇÃO	26
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.4.1 Efeito da aplicação dos inibidores ao longo do tempo	27
4.4.2 Aplicação combinada de AH e inibidor	28
4.4.3 Análise da morfologia radicular	30
4.4.4 Estudo da expressão gênica	30
4.4.5 Análise estatística	33
4.5 RESULTADOS	34
4.5.1 Time-course dos inibidores	34
4.5.2 Aplicação de AH ocasiona melhorias nas características morfológicas de plantas de arroz	35
4.5.3 AH contribui para aumento de expressão de genes relacionados as vias de sinalização de ERO que são essenciais na promoção do crescimento radicular	39

4.5.4 AH possui ação sobre o crescimento radicular e é regulado através de vias de sinalização hormonal.....	42
4.6 DISCUSSÃO	49
4.7 CONCLUSÕES	54
5. CONCLUSÕES GERAIS	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7 APÊNDICES	66

1 INTRODUÇÃO GERAL

Devido ao crescente aumento no consumo global de cereais nos últimos anos, os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável 2 e 12 da Organização das Nações Unidas preveem que até 2030 será necessário dobrar a produtividade agrícola, tornando-se crucial a adoção de novas técnicas no cultivo de arroz para aumentar sua produção de forma sustentável (SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS, 2015). Tendo em vista esse cenário, o uso de bioestimulantes está ganhando uma significativa visibilidade científica e comercial, e é considerada uma técnica promissora na melhoria da sustentabilidade ecológica da produção agrícola por contribuir significativamente na redução de fertilizantes e pesticidas (EUROPEAN BIOSTIMULANT INDUSTRY COUNCIL, 2020; ROUPHAEL & COLLA, 2020). Dentre as substâncias bioestimulantes, diversos estudos mostram que a aplicação exógena de substâncias húmicas (SH) tem efeito direto na produtividade das plantas, bem como, no metabolismo primário e secundário, desencadeando complexa interação entre vias de sinalização hormonal e o metabolismo das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (NARDI et al., 2007; TREVISAN et al., 2011; ROOMI et al., 2018; NUNES et al., 2019). Apesar das evidências estabelecidas dos efeitos bioestimulante, muitos aspectos funcionais das SH ainda precisam ser elucidados. Assim, surge o seguinte questionamento: quais são os mecanismos atuantes por trás dessas respostas que promovem o crescimento radicular?

Baseado nesse contexto, nessa tese se buscou contribuir para entendimento dos mecanismos fisiológicos por trás dessas respostas usando abordagens fenotípicas e moleculares associadas ao uso de inibidores de ERO e de vias hormonais. Os seguintes pressupostos foram levantados: (i) se o AH for capaz de estimular o crescimento do sistema radicular na presença de um inibidor específico, é porque a rota interrompida pelo determinado inibidor não é a rota preferencial no mecanismo de ação do AH; (ii) por outro lado, se o AH não estimular o crescimento do sistema radicular na presença de determinado inibidor, é porque essa rota é a preferencial no mecanismo de ação do AH. As seguintes hipóteses foram levantadas: (i) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular via regulação oxidativa; (ii) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular via regulação hormonal; (iii) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular por meio da interação entre regulação das ERO e regulação hormonal.

Para verificar essas hipóteses, o objetivo geral foi elucidar os mecanismos de sinalização pelo qual o ácido húmico estimula o crescimento do sistema radicular em plantas de arroz. Os objetivos específicos foram: a) estabelecer a concentração ótima de ácido húmico para o maior estímulo ao crescimento do sistema radicular; b) estabelecer a concentração ideal dos inibidores (*scavengers*) de espécies reativas de oxigênio e inibidores de ação hormonal que resultem em prejuízo ao desenvolvimento do sistema radicular, sem contudo, apresentar toxidez severa as plantas; c) combinar a aplicação dos inibidores e ácido húmico e verificar o efeito sobre o desenvolvimento do sistema radicular de plantas de arroz. Nesse caso será possível verificar qual ERO e/ou hormônio é a via preferencial de ação dos ácidos húmicos; d) por meio da abordagem fenotípica e molecular, elucidar os mecanismos de sinalização ativados pela aplicação do AH.

A tese foi dividida em 2 capítulos, sendo o objetivo do Capítulo I confirmar o efeito bioestimulante proporcionado pela aplicação do AH em raízes de plantas de arroz aliado a técnicas espectroscópicas para relacionar as propriedades do AH a sua bioatividade. E o objetivo do Capítulo II foi elucidar os mecanismos de sinalização responsáveis pela indução do crescimento do sistema radicular em resposta à aplicação de AH.

2 REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1 Importância da Cultura do Arroz para os Estudos Biotecnológicos

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais consumidos e produzidos ao redor do mundo (FAO, 2022), sendo o cereal de maior importância econômica e social para muitos países em desenvolvimento, constituindo a alimentação básica de mais da metade da população mundial. É um cereal de grande importância na dieta alimentar da população brasileira, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína total necessária (LAM-SÁNCHEZ et al., 1994).

Recentemente foi publicado *World Population Prospects* (2022) em que as Nações Unidas estimam um aumento populacional de cerca de 1,7 bilhões até 2050, podendo atingir 9,7 bilhões de pessoas no planeta, sendo esperado que mais da metade desse aumento ocorra principalmente em países em desenvolvimento como Índia, Nigéria, Paquistão e Filipinas, que de acordo com Zhang et al. (2020) são locais onde o arroz é o alimento básico para a população, colocando assim uma pressão para atender a demanda não somente em quantidade mas também em qualidade nutricional do grão.

Dados publicados recentemente pela FAO (2022) estimam que ocorrerá um aumento global no consumo de cereais acompanhando o aumento contínuo da população mundial, porém as perspectivas para a produção de cereais em 2022 apontam um decréscimo de 16 milhões de toneladas, sendo o primeiro declínio em quatro anos. Entre os principais cereais, o maior declínio está previsto para o milho, seguido pelo trigo e arroz em decorrência da guerra da Ucrânia, escassez hídrica e o elevado custo de insumos.

Devido ao crescente consumo nos últimos anos, o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2 e 12 preveem que até 2030 será necessário dobrar a produtividade agrícola, tornando-se necessário o emprego de técnicas mais adequadas no cultivo de arroz, com o intuito de melhorar a qualidade e aumentar a sua produção de forma mais sustentável (Sustainable Development Goals, 2015).

Ciência e tecnologia podem contribuir significativamente para a segurança alimentar, incluindo melhorias no rendimento da cultura, abordagens ecologicamente corretas para proteção das culturas, e o uso eficiente de água e fertilizantes (WAN, 2018). Nas últimas três décadas, diversos institutos de pesquisa/universidades em todo o mundo publicaram inúmeras pesquisas realizadas com arroz, e a maior parte delas tinha como premissa principal a melhoria no rendimento de forma sustentável frente o desafio dos estresses abióticos (BIN RAHMAN & ZHANG, 2022), que pode piorar com as mudanças climáticas.

A plasticidade fenotípica é uma habilidade das plantas em mudar seu fenótipo em resposta as variações ambientais, podendo ser uma resposta de curta ou longa duração (TOPP, 2016). Dependendo das condições ambientais, plantas que apresentam características de maior plasticidade em fisiologia e morfologia podem ter maior acesso a recursos limitantes ou melhorar seu uso eficiente (HODGE, 2004).

A distribuição espacial da arquitetura do sistema radicular depende da distribuição da água e nutrientes no solo, e possui grandes implicações na performance das plantas quanto a tolerância a estresses abióticos, e específicos componentes da arquitetura podem apresentar uma plasticidade nas respostas as variações ambientais (KOEVOETS et al., 2016). Em condições de seca, a plasticidade do comprimento total das raízes, comprimento das raízes laterais e sua densidade, melhoram a biomassa da parte aérea, absorção de água e fotossíntese em arroz (LOBET et al., 2019).

Por exemplo, um sistema radicular mais profundo pode ser benéfico durante períodos de seca (YU et al., 2013, 2016), além de favorecer na absorção de nitrato, um nutriente que apresenta alta mobilidade, e pode ser facilmente lixiviado para as camadas mais profundas do solo (KIBA & KRAPP, 2016), enquanto que um sistema radicular mais curto favorece a

exploração de nutrientes mais em superfície do solo, investindo em um maior crescimento de raízes laterais, e pode ser útil na absorção de nutrientes com menor mobilidade no solo, especialmente o fósforo (HERRERA et al., 2015).

O sistema radicular da cultura do arroz é moldado de acordo com a textura do solo, a disponibilidade hídrica, compactação do solo, e o método de cultivo, sendo caracterizado por um sistema radicular mais curto comparado com outros cereais (GOWDA et al., 2011). Quando comparado com outras culturas de interesse agrícola, o arroz possui um sistema radicular menos eficiente para captação de água e nutrientes, possivelmente por ser uma cultura considerada semiaquática, condição em que não há limitação hídrica e os nutrientes estão mais homogeneamente distribuídos na solução do solo (EMBRAPA, 2004). Isso explica a baixa produtividade do arroz quando se usa o sistema de cultivo em terras altas (sequeiro). Programas modernos de melhoramento têm buscado a seleção de características radiculares que melhorem a produtividade das plantas se baseando nos fenótipos (TRACY et al., 2020).

Em estudo recente, Zhang et al. (2022) ao avaliar o potencial agrônômico de uma cultivar de arroz perene que passou por sucessivos processos de melhoramento entre uma variedade asiática domesticada (*Oryza sativa* ssp. indica RD23) que foi hibridizada com uma variedade africana perene não domesticada (*Oryza longistaminata*), observaram que após quatro anos de cultivo resultou em um aumento no acúmulo de carbono orgânico no solo, melhoria na absorção de nitrogênio resultando em maiores rendimentos, que pode ter ocorrido devido a um extensivo sistema radicular e maior reserva de fotoassimilados.

Portanto, acredita-se que melhorar o sistema radicular dessa cultura seja relevante para alcançar produtividades satisfatórias no cultivo de sequeiro, método de cultivo que tende a crescer mais que o sistema irrigado, devido a crescente limitação de uso da água na agricultura.

2.2 Papel do Ácido Húmico como Bioestimulante para as Plantas

Devido a crescente preocupação em reduzir o uso de pesticidas e fertilizantes, principalmente os nitrogenados que resultam em aumentos significativos nos custos de produção e nos impactos ambientais, têm sido adotadas novas técnicas no cultivo agrícola para atender a um sistema de produção que seja mais ecologicamente correto.

Tendo em vista esse cenário, o uso de bioestimulantes está ganhando uma significativa visibilidade científica e comercial, e é considerada uma técnica promissora na melhoria da sustentabilidade ecológica da produção agrícola por contribuir significativamente na redução de fertilizantes e pesticidas (European Biostimulant Industry Council, 2020; ROUPHAEL & COLLA, 2020). O mercado global de vendas de bioestimulante atingiu 3,2 bilhões de dólares em 2021, e estima-se que alcance 5,6 bilhões de dólares até 2026, com uma taxa de crescimento anual em torno de 10-12% (Market and Markets, 2021; Market Data Forecast, 2022).

É notório que bioestimulantes elicitam uma resposta nas plantas que pode influenciar características fenotípicas e melhorar o rendimento através da tolerância a estresses abióticos, e absorção e assimilação de nutrientes (ROUPHAEL et al., 2018; 2020). Nas últimas décadas tem sido abordado na literatura os benefícios da aplicação tanto foliar quanto radicular, ocasionando efeitos positivos em muitas espécies no número de folhas e área foliar, eficiência fotossintética, incremento em biomassa de raiz e parte aérea, bem como, na florescência, número de frutos e rendimento de grãos, especialmente sob condições adversas (OLAETXEA et al., 2018; AHMAD et al., 2018; ERTANI et al., 2018; CASTRO et al., 2021).

Dentre as substâncias bioestimulantes, diversos estudos mostram que a aplicação exógena de substâncias húmicas (SH) tem um efeito direto na produtividade das plantas, melhorando a aquisição de nutrientes, aumentando a tolerância à estresses abióticos, e estimulando o crescimento do sistema radicular (CONSELVAN et al., 2017; GARCÍA et al., 2019).

As substâncias húmicas (SH) são as moléculas orgânicas de maior abundância na Terra (SUTTON & SPOSITO, 2005), e correspondem aproximadamente 60-80% da matéria orgânica do solo, sendo consideradas os componentes orgânicos mais estáveis devido os processos de humificação (PICCOLO, 2001; NARDI et al., 2002). Elas são de ocorrência natural nos solos, e surgem da decomposição e transformação de resíduos vegetais, animais e microrganismos, e estão diretamente ligadas à fertilidade do solo, além de melhor crescimento e nutrição mineral das plantas (OLAETXEA et al., 2016).

Notoriamente, as SH influenciam o desenvolvimento de plantas, tanto pelos efeitos diretos na arquitetura e no metabolismo vegetal como pelos efeitos indiretos ocasionados no solo (NARDI et al., 2002). Os efeitos indiretos da aplicação exógena de SH estão relacionados a produtividade de plantas melhorando as características do solo, como estrutura, agregação do solo, melhoria na capacidade de troca de cátions, maior capacidade de retenção de água e disponibilidade de nutrientes imóveis no solo (CHEN et al., 2004; ROSE et al., 2014). Enquanto os efeitos diretos da ação das SH ocorrem sobre a morfologia e arquitetura do sistema radicular (CANELLAS & OLIVARES, 2014; OLAETXEA et al., 2018), fisiologia e metabolismo (VACCARO et al., 2015; CORDEIRO et al., 2017), e na expressão de genes que codificam transportadores de nutrientes nas plantas (TAVARES et al., 2017).

Em trabalho realizado por García et al. (2016b) em plantas de arroz, os autores observaram que estruturas mais lábeis e funcionalizadas das frações húmicas são responsáveis pela emissão de raízes, enquanto as estruturas mais recalcitrantes e menos funcionalizadas estão relacionadas ao crescimento radicular.

Inúmeros trabalhos mostram que a atividade biológica das substâncias húmicas depende do tamanho da molécula, em que fragmentos de baixo peso molecular correspondem a fração mais ativa das SH, com estruturas menos complexas com predomínio de carbonos alifáticos e com elevado grau de substituição (CANELLAS et al., 2010; GARCÍA et al., 2012), enquanto que fragmentos maiores atuam como reguladores do crescimento radicular, isso porque ocorre uma fragmentação da estrutura de SH devido a exsudação de ácidos orgânicos e o decréscimo do pH na rizosfera, favorecendo a entrada de pequenos fragmentos nas plantas exercendo um efeito semelhante ao efeito hormonal, além de regular o conteúdo de ERO (DOBBS et al., 2010; PIZZEGHELLO et al., 2020).

Inúmeros estudos relatam as mudanças que as substâncias húmicas induzem tanto no metabolismo primário quanto secundário, desencadeado por uma complexa interação entre vias de sinalização hormonal e o metabolismo das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (NARDI et al., 2007; TREVISAN et al., 2011; ROOMI et al., 2018; NUNES et al., 2019).

Recentes estudos evidenciam o efeito semelhante das SH ao efeito hormonal, do termo em inglês *hormone-like*, e tem sido relatado diversas evidências de respostas hormonais e estruturas não lignificantes dentro da estrutura das SH, demonstrando que estas podem estimular a atividade e promover a síntese das bombas de prótons na membrana plasmática, intensificando a aquisição de nutrientes pelas plantas (TREVISAN et al., 2010; ZANDONADI et al., 2010; MUSCOLO et al., 2013; TAVARES et al., 2017; NARDI et al., 2018).

Em raízes de *arabidopsis* tratadas com auxina, na mesma concentração encontrada nas substâncias húmicas, Conselvan et al. (2018) verificaram que não induziu a mesma resposta daquelas raízes tratadas somente com substâncias húmicas, confirmando a hipótese que a atividade da SH *hormone-like* não ocorre somente pela presença de auxina nas moléculas da SH, mas também, devido a presença de outras moléculas com atividade similar, justificando o efeito de bioestimulante.

O aumento da emissão de pelos radiculares e raízes laterais em resposta às SH geralmente está relacionado às interações hormonais (TREVISAN et al., 2010; OLAETXEA et al., 2015, 2018; SOUZA et al., 2022) e espécies reativas de oxigênio (García et al., 2016a; CORDEIRO et al., 2017). Evidências recentes mostram a relação entre a aplicação de ácido

húmico e o aumento da produção interna de ERO (ROOMI et al., 2018; NUNES et al., 2019), indicando uma possível ação dessas ERO como moléculas sinalizadoras no mecanismo de ação das substâncias húmicas.

Diversos estudos relatam que as SH podem regular os níveis endógenos de ERO em plantas de arroz (GARCÍA et al., 2016a; GARCÍA et al., 2018). A aplicação exógena de SH no sistema radicular pode ativar enzimas do sistema antioxidativo, como APX, CAT, POX e SOD, que atuam no citosol das células das raízes controlando os níveis de ERO, diminuindo a peroxidação de lipídeos favorecendo na conservação da permeabilidade da membrana (GARCÍA et al., 2016a; CORDEIRO et al., 2017; HERNÁNDEZ et al., 2018).

O início da interação SH-plantas tem sido explicado como sendo uma aglomeração dos fragmentos húmicos nas superfícies das raízes, que ocasiona um possível entupimento dos poros radiculares, modificando a condutividade hidráulica e o funcionamento das raízes (ASLI & NEUMANN, 2010; GARCÍA et al. 2012; OLAETXEA et al., 2015). Essa aglomeração de AH em raízes de plantas de arroz tem mostrado regular o metabolismo oxidativo, em que fragmentos húmicos de AH de vermicomposto ao se aglomerarem nas raízes, formando uma espécie de incrustação húmica radicular, causam um tipo de “pseudoestresse” ou “euestresse” que leva um aumento na concentração de ERO, desencadeando também um aumento na atividade de enzimas do metabolismo oxidativo (GARCÍA et al. 2012, 2016a). Contudo, esse mecanismo de atuação das enzimas antioxidantes dependerá do tipo de planta avaliada, o tempo de exposição ao AH e diferentes concentrações do AH. Aguiar et al. (2016) ao avaliarem plantas de cana submetidas ao déficit hídrico relataram uma baixa atividade das enzimas antioxidantes, exceto naqueles tratamentos que foram expostos ao AH, sendo necessário mais estudos para um melhor entendimento desse mecanismo das plantas quando são submetidas há algum tipo de estresse abiótico e tratadas com AH.

2.3 Papel Regulatório das ERO nas Vias de Sinalização em Plantas

Uma das primeiras respostas das plantas às variações ambientais envolve a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO, do termo em inglês ROS – *Reactive Oxygen Species*), que são subprodutos do metabolismo celular, porém em excesso podem causar danos oxidativos irreversíveis as proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, levando a morte celular (TRIPATHY & OELMÜLLER, 2012; KUSHWAHA et al., 2019). Por outro lado, somente nos últimos anos que se tornou evidente o importante papel das ERO nas vias de sinalização em plantas (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014). Além disso, recentes estudos sugerem que a manutenção de um nível basal de ERO é necessária para processos biológicos básicos, como a proliferação e diferenciação celular, atuando como mensageiros secundários no controle de processos como crescimento, desenvolvimento e especialmente adaptação as diferentes condições ambientais (MITTLER et al., 2011; MITTLER, 2017; MITTLER et al., 2022).

As espécies reativas encontradas nas plantas podem ser radicais livres, por exemplo, superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}), e não radicais, oxigênio singleto (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TRIPATHY & OELMÜLLER, 2012; DAS & ROYCHOUDHURY, 2014), que podem ser geradas na membrana plasmática, pela atuação das NADPH oxidases (NOX), e em diferentes organelas, incluindo cloroplasto, mitocôndria, peroxissomo e retículo endoplasmático (PÉREZ-PÉREZ et al., 2012). As ERO são constantemente geradas devido à redução parcial do oxigênio (O_2) ou como um resultado da transferência de energia.

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado como um produto da cadeia de transporte de elétrons sendo rapidamente convertido em H_2O_2 nos cloroplastos através de reações químicas e enzimáticas, e é uma das primeiras ERO que se formam, com moderada reatividade e apresentando uma meia-vida de 2-4 μs (PÉREZ-PÉREZ et al., 2012; DAS & ROYCHOUDHURY, 2014).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie de moderada reatividade com meia-vida de 1 ms, é formado pela redução, bem como, protonação do $\text{O}_2^{\cdot-}$. Dentre os diferentes tipos de ERO, o H_2O_2 é considerado a molécula mais estável, e que se difunde através da membrana via aquaporinas (PÉREZ-PÉREZ et al., 2012). Assim como o $^1\text{O}_2$, também pode desempenhar um papel como mensageiro secundário nas plantas, além de regular inúmeros processos, tais como, divisão celular, diferenciação e crescimento, bem com, apresenta um papel chave no desenvolvimento das plantas e na adaptação a estresses abióticos e bióticos (FOYER & NOCTOR, 2009; MITTLER et al., 2011).

Dentre as ERO, o radical hidroxila (OH^{\cdot}) é considerado o mais reativo e tóxico, sendo ele o principal responsável pela peroxidação de lipídeos na membrana. Ele é gerado em pH neutro pela reação de Fenton entre H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$. Devido a da sua alta reatividade e curta meia-vida de 1 μs , ainda não há registros de sistemas enzimáticos capazes de degradar este radical tóxico, somente flavonoides e prolinas, levando a morte celular (PINTO et al., 2003).

Na regulação das ERO existe um balanço entre a produção, degradação (*scavenging*) e o transporte, que pode ser alterado devido a diferentes fatores como, salinidade, extremas temperaturas, metais pesados, dentre outros (MITTLER et al., 2022). Muitos dos eventos celulares são baseados nas reações redox e, portanto, estão diretamente ligadas as ERO (TRIPATHY & OELMÜLLER, 2012).

A homeostase redox em plantas durante uma condição de estresse é mantida principalmente por sistemas antioxidantes enzimáticos, que compreende superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX), glutathione-S-transferase (GST), e catalase (CAT), enquanto que nos processos não enzimáticos estão presentes componentes de baixo peso molecular como, ácido ascórbico (AA), glutathione reduzida (GSH), α -tocoferol, carotenoides, fenólicos, flavonoides e prolina (MITTLER, 2017).

O aumento da produção de ERO induz a atuação dos mecanismos de defesa das plantas (FRANÇA et al., 2018), ocasionando um aumento dos sistemas antioxidantes que atuam no sistema de defesa oxidativo no citosol das células radiculares, controlando os níveis de ERO, diminuindo a peroxidação de lipídeos, conservando assim, a permeabilidade da membrana celular (GARCÍA et al., 2016a).

Evidências recentes demonstram um papel importante na sinalização molecular das ERO regulando o desenvolvimento das plantas (KUSHWAHA et al., 2019), pois embora sejam potencialmente prejudiciais, um dos papéis das ERO é favorecer o desenvolvimento radicular através da modificação da parede celular (GARCÍA et al., 2018). É conhecido que as ROS participam dos processos de emissão de raízes laterais, polarização da membrana e sinalização via Ca^{2+} (FOREMAN et al., 2003). Vários estudos relatam que na região de emissão de raízes laterais há um acúmulo e produção de ROS (TSUKAGOSHI, 2016), onde um aumento de H_2O_2 no citosol pode levar a um aumento na diferenciação celular e ativar os canais de Ca^{2+} na região de alongamento celular (TSUKAGOSHI, 2016) e posteriormente estimular NADPH oxidases (FOREMAN et al., 2003; ORMAN-LIGEZA et al., 2016), além de induzir as MAPK quinases (proteínas quinases ativada por mitógeno) (NOCTOR et al., 2018).

As plantas possuem uma complexa interação entre vias de sinalização hormonal e o metabolismo das ERO (BAXTER et al., 2014; MHAMDI & VAN BREUSEGEM, 2018). O ácido abscísico (ABA), por exemplo, está envolvido em diversas funções biológicas e possui uma relação com ERO no mecanismo de sinalização para regulação do fechamento estomático, germinação de sementes, crescimento radicular e homeostase celular sob estresse salino (MITTLER & BLUMWALD, 2015). Enquanto a auxina que está envolvida principalmente em alterações no meristema apical das raízes, induz a produção de ERO para regular o ciclo celular e a própria homeostase das ERO (TSUKAGOSHI, 2016).

3. CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS AH EM PLANTAS DE ARROZ

3.1 RESUMO

O uso de técnicas espectroscópicas para relacionar estrutura-propriedade à bioatividade do AH é um conhecimento necessário para o desenvolvimento de produtos bioativos cada vez mais eficientes para uso na agricultura comercial, sendo essencial uma abordagem que favoreça a produção de substâncias bioativas que resultem em melhorias no crescimento das plantas. Com base no exposto, a seguinte hipótese foi levantada para este Capítulo I: os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular devido suas propriedades bioativas. Assim, este primeiro capítulo teve por objetivo confirmar o efeito bioestimulante proporcionado pela aplicação do AH em raízes de plantas de arroz aliado a técnicas espectroscópicas para relacionar as propriedades do AH a sua bioatividade. Este primeiro capítulo teve por objetivo confirmar o efeito bioestimulante proporcionado pela aplicação do AH em raízes de plantas de arroz aliado a técnicas espectroscópicas para relacionar as propriedades do AH a sua bioatividade. Neste estudo foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de infravermelho com reflectância atenuada (ATR-FTIR) e ressonância magnética nuclear do isótopo do ^{13}C via polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico (^{13}C RMN CP/MAS). Foram realizadas curvas de calibração para determinar a concentração ótima de ácido húmico para o maior estímulo ao crescimento do sistema radicular, bem como, a concentração ideal de cada inibidor que resultem em prejuízo ao desenvolvimento do sistema radicular, sem, contudo, apresentar toxidez severa as plantas. Com relação à ATR-FTIR, bandas de absorção intensas foram observadas em aproximadamente $3660\text{-}3284\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença de $-\text{OH}$ e/ou $-\text{NH}$, que correspondem aos grupos funcionais: álcool, ácidos carboxílicos e/ou aminas, sugerindo uma característica estrutural mais alifática e funcionalizada. A partir da integração das diferentes regiões no RMN de ^{13}C via CP/MAS foi possível observar que o AH oriundo de vermicomposto possui um maior predomínio de fragmentos alifáticos e carbono carboxílico em detrimento a quantidade de carbonos aromáticos, indicando a presença de propriedade hidrofóbica e hidrofílica, característica presente em amostras de AH oriundas de diferentes origens, influenciando na labilidade e recalcitrância das estruturas. A bioatividade foi avaliada através da capacidade do AH em induzir melhorias nas características morfológicas. Quando avaliada a produção de biomassa na raiz e parte aérea e a morfologia radicular foi possível verificar que ocorreu um maior estímulo no crescimento nas concentrações intermediárias ocasionada pelo efeito do AH, sendo a concentração que apresentou uma melhor resposta foi de 80 mg.L^{-1} . Dessa forma, foi possível validar o modelo experimental ao associar as propriedades do AH que contribuíram para o aumento da bioatividade.

Palavras-chave: Espectroscopia ATR-FTIR. Espectroscopia RMN. Bioatividade. Ácido húmico.

3.2 ABSTRACT

The use of spectroscopic techniques to relate structure-property to HA bioactivity is a necessary knowledge for the development of increasingly efficient bioactive products for use in commercial agriculture, and an approach that favors the production of bioactive substances that result in improvements in plant growth is essential. In this context, the following hypothesis was raised for this Chapter I: HA isolated from vermicompost signal root system growth due to their bioactive properties. This first chapter aimed to confirm the biostimulant effect provided by the application of AH to rice plant roots combined with spectroscopic techniques to relate the properties of AH to its bioactivity. In this study, the infrared spectroscopic (ATR-FTIR) and solid-state nuclear magnetic resonance via cross-polarization with rotation around the magic angle (^{13}C NMR CP/MAS) spectroscopic techniques were used. A calibration curve was performed to determine the optimum concentration of humic acid for the greatest stimulus to root system growth, as well as the optimum concentration of each inhibitor that would result in impaired root system development without severe toxicity to the plants. Intense absorption bands were observed at approximately $3660\text{--}3284\text{ cm}^{-1}$ indicating the presence of -OH and/or -NH, which correspond to the functional groups: alcohol, carboxylic acids and/or amines, suggesting a more aliphatic and functionalized structural feature. Based on the integration of the different regions in the ^{13}C NMR CP/MAS it was possible to observe that the HA from vermicompost has a greater predominance of aliphatic fragments and carboxylic carbon in detriment of the amount of aromatic carbons, indicating the presence of hydrophobic and hydrophilic properties, a characteristic present in samples of HA from different sources, influencing the lability and recalcitrance of the structures. Bioactivity was assessed through the ability of AH to induce improvements in morpho-physiological characteristics. When root and shoot biomass production and root morphology are evaluated, it is possible to see that there was a greater growth stimulus at intermediate concentrations caused by the effect of AH, and the concentration that showed the best performance was 80 mg.L^{-1} . Thus, it was possible to validate the experimental model by associating the properties of AH that contributed to the increased bioactivity.

Key words: ATR-FTIR spectroscopy. NMR spectroscopy. Bioactivity. Humic acid.

3.3 INTRODUÇÃO

As substâncias húmicas (SH) representam o maior componente da matéria orgânica do solo e estão amplamente distribuídas na natureza (SUTTON & SPOSITO, 2005). Estas são de ocorrência natural nos solos, que surgem da decomposição e transformação de resíduos vegetais, animais e microrganismos. Notoriamente influenciam o desenvolvimento de plantas, tanto pelos efeitos diretos na absorção de nutrientes e arquitetura radicular, melhorando o crescimento e a nutrição de plantas, como pelos efeitos indiretos ocasionados no solo, melhorando a fertilidade e reduzindo a compactação do solo (NARDI et al., 2002; OLAETXEA et al., 2016).

Nos últimos anos o interesse por produtos de uso na agricultura que sejam ecologicamente corretos vem aumentando. O uso de vermicomposto tem sido uma alternativa viável por restaurar propriedades químicas e físicas do solo e melhorar o crescimento das plantas (GARCÍA et al., 2012; HERNANDEZ et al., 2014). Substâncias húmicas isoladas de vermicomposto são conhecidas pelo estímulo do crescimento radicular (DOBBS et al., 2010; Aguiar et al., 2013; Castro et al., 2021) e pelo efeito protetivo envolvendo a modulação das ERO (GARCÍA et al., 2016a).

O uso de técnicas espectroscópicas para relacionar estrutura-função pode ser uma prática interessante para o desenvolvimento de substâncias promotoras de crescimento em plantas usando fontes sustentáveis de materiais húmicos (AGUIAR et al., 2013). Além disso, os estudos relacionados a estrutura-propriedade-função das SH em plantas possuem grande importância no entendimento do mecanismo de ação e seu uso na agricultura (GARCÍA et al., 2016b).

No estudo realizado por García et al. (2012) relataram que a partir de técnicas microscópicas e espectroscópicas foi possível confirmar a interação entre fragmentos de AH de baixa complexidade estrutural e o sistema radicular de plantas de arroz. Anos mais tarde, em outro estudo publicado por García et al. (2016b) apresentam que estruturas mais lábeis e funcionalizadas das frações húmicas são responsáveis pela emissão de raízes, enquanto as estruturas mais recalcitrantes e menos funcionalizadas estão relacionadas ao crescimento radicular.

Devido a maior facilidade de obtenção e suas características químicas, o ácido húmico (AH) tem sido escolhido nos estudos de substâncias bioativas por representar a fração mais estável da matéria orgânica humificada devido a sua característica hidrofóbica e a presença de grupos funcionais (NARDI et al., 2002; CANELLAS et al., 2008).

Com base no exposto, a hipótese deste Capítulo I foi: os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular devido suas propriedades bioativas. Assim, este primeiro capítulo teve por objetivo confirmar o efeito bioestimulante proporcionado pela aplicação do AH em raízes de plantas de arroz aliado a técnicas espectroscópicas para relacionar as propriedades do AH a sua bioatividade.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Extração e purificação do ácido húmico

A fração húmica utilizada neste estudo foi obtida a partir de vermicomposto de esterco bovino processado por minhocas “Vermelha-da-Califórnia” (*Eisenia foetida* spp.). O vermicomposto utilizado foi estabilizado ao fim de 50 dias, produzido na Fazendinha Agroecológica do km 47, Seropédica-RJ. O processo de obtenção está descrito em Oliveira (2011).

O isolamento e a purificação do ácido húmico (AH) a partir de vermicomposto foi realizado com base na metodologia proposta pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) (<http://humic-substances.org/isolation-of-ihss-soil-fulvic-and-humic-acids/>) como descrito por Swift (1996).

Uma solução de KOH 0,1 M foi adicionada a uma massa de vermicomposto sob a atmosfera de N₂ gasoso em uma relação 1:10 (m:v) e permaneceu sob agitação constante de 400 rpm durante 16 horas. Decorrido esse período, o equipamento foi desligado e aguardou-se 4 horas de repouso. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para potes de plástico e centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado, filtrado em papel filtro qualitativo 50x50 cm (gramatura: espessura 0,2 mm e permeabilidade 38 L/s⁻¹.m²) e o pH foi ajustado a 1,5 adicionando-se HCl 6 M para ocorrer a precipitação do ácido húmico.

Após 16 horas, a fração de ácido fúlvico na fase líquida foi removida e o ácido húmico transferido para potes de plástico e centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o AH foi mantido sob agitação, durante 16 horas, com uma solução de HCl (0,1 M):HF (0,3 M) em proporção 1:1,5 (v/v) para cada 100 mL de água deionizada e foi adicionado igual volume dessa solução ao ácido húmico para a remoção de elementos minerais. Decorrido esse tempo, foi novamente centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C para eliminação da solução ácida (sobrenadante) e o AH foi centrifugado 2 vezes com água deionizada gelada a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Posteriormente, o AH foi transferido para membranas de diálises (14 kDa cut-off) e mantido em água deionizada trocada 2 vezes ao dia até o teste negativo para íons de Cl⁻ usando uma solução de nitrato de prata (AgNO₃ 0,1 M). Após a diálise, o AH foi transferido para tubos falcon e armazenado em freezer a -80°C e, posteriormente foi seco por liofilização.

3.4.2 Espectroscopia mediante ATR-FTIR

Os espectros foram obtidos na região do infravermelho com transformada de Fourier com reflectância atenuada (ATR-FTIR) na faixa de 4000 – 400 cm⁻¹, realizando 32 digitalizações a cada leitura, com resolução espectral de 4 cm⁻¹. Para isso, foi utilizado um espectrômetro FTIR VERTEX 70/70v Series Spectrometer Bruker acoplado a um dispositivo de reflectância atenuada (ATR) de diamante, que funciona como uma reflexão interna, onde as amostras de AH (250 mg) previamente misturadas com pastilhas de KBr (200 mg) foram colocadas no diamante presente no ATR para registro do espectro. Antes da análise foi realizado o chamado *background*, em que consiste realizar a leitura do branco como compensação do ar.

Para obtenção dos espectros foi utilizado o software OPUSBruker. Os espectros foram obtidos em triplicata e submetidos a correção da linha base. O algoritmo *smoothing* (Savitsky-Golay) foi utilizado em todos os espectros com o objetivo de aumentar a relação sinal ruído. Os espectros trabalhados foram assinalados em função da localização da banda utilizando a ferramenta “PeakPicking”.

3.4.3 Espectroscopia mediante RMN de ^{13}C via CP/MAS

O ácido húmico também foi avaliado pela espectroscopia por ressonância magnética nuclear do isótopo do ^{13}C via polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico a $54,74^\circ$ (^{13}C RMN CP/MAS). A análise foi realizada utilizando o aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com sonda de 4 mm Narrow MAS e foi operado em sequência de ressonância de ^{13}C a 100.163 MHz. Amostras de AH (150mg) foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de dióxido de zircônio (ZrO_2) com tampas de Kel-F, com frequência de giro de 8 ± 1 kHz e após realizada os escaneamentos em um tempo de aquisição de 34 ms e com *recycle delay* de 5 segundos, os espectros foram obtidos em réplica pela coleta de 4000 pontos para igual número de escaneamentos a uma temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$. O tempo de contato com 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.

Para a obtenção da quantidade relativa de estruturas, as regiões dos espectros foram integradas através do software ACD/Labs v. 12.01, sendo obtidas oito regiões de deslocamentos químicos como proposto por Song et al. (2008): Carbono-alquil-H,R (CA_{lq}-H,R): 0-45 ppm; CA_{lq}-O,N: 45-60 ppm; CA_{lq}-O: 60-90 ppm; CA_{lq}-di-O: 90-110 ppm; Carbono aromático-H,R (CA_r-H,R): 110-140 ppm; CA_r-O: 140-155 ppm; C carboxila-H,R (CCOO-H,R): 155-185 ppm e C carbonilas (CC=O): 185-230 ppm.

A aromaticidade foi calculada segundo a fórmula proposta por Song et al. (2008): (CA_r-H,R) + (CA_r-O) *100/ área total, assim a alifaticidade foi calculada como: 100-Aromaticidade (%). O índice de hidrofobicidade (hidrofobicidade/hidrofilicidade; HB/HL) foi calculado de acordo com o proposto por Aguiar et al. (2013): (CA_{lq}-H,R) + (CA_r-H,R) + (CA_r-O) / (CA_{lq}-O,N) + (CA_{lq}-O) + (CA_{lq}-di-O) + (CCOO-H,R) + (CC=O). E o índice de polaridade foi calculado utilizando a fórmula: (CA_{lq}-O,N) + (CA_{lq}-O) + (CA_{lq}-di-O) + (CA_r-O) + (CCOO-H,R) + (CC=O) / (CA_{lq}-H,R) + (CA_r-H,R).

3.4.4 Curva de calibração das concentrações do ácido húmico e inibidores

Este experimento teve por objetivo determinar a concentração ótima de ácido húmico para o maior estímulo ao crescimento do sistema radicular, bem como, a concentração ideal de cada inibidor que resultem em prejuízo ao desenvolvimento do sistema radicular, sem, contudo, apresentar toxidez severa as plantas.

Para isso, sementes de arroz da variedade Nipponbare foram submetidas ao procedimento de “Quebra de Dormência” como descrito por Souza (2018). As sementes foram previamente aquecidas a 45°C por 2 horas em estufa de circulação de ar forçada; em seguida desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5% sob agitação por inversão durante 15 minutos, e deixadas imersas em água deionizada *overnight* na Câmara de Crescimento. No dia seguinte, as sementes imersas em água foram aquecidas novamente a 45°C por 2 horas, desinfestadas com etanol 70% sob agitação por inversão durante 1 minuto, lavadas com água deionizada repetidas vezes (aproximadamente 10 vezes), e foram acondicionadas sobre gaze em vasos com capacidade de 3 L de água deionizada para germinação.

A germinação e o cultivo das plantas foram realizados na Câmara de Crescimento do Departamento de Solos da UFRRJ, com fluxo de fótons fotossintéticos dentro de uma faixa de 318 a 330 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$; fotoperíodo 14horas/10horas (luz/escuro), umidade relativa do ar de 75% e temperatura $28^\circ\text{C}/24^\circ\text{C}$ (diurna/noturna).

No momento da germinação, foi adicionada uma solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada com $\frac{1}{4}$ FI de 2 mM de N (1,5 mM de N-NO_3^- e 0,5 mM de N-NH_4^+)

com o pH sendo mantido a 5,8, e a fonte de nitrogênio nitrato de cálcio e nitrato de amônio. Aos 3 DAG (dias após a germinação) foi fornecida uma solução nutritiva de ½ FI de 2 mM de N. Aos 5 DAG as plântulas foram transferidas para tubos falcon com capacidade de 50 mL (8 plântulas por tubo falcon) contendo solução nutritiva de ½ FI de 2 mM de N para uma melhor adaptação das plantas, e aos 6 DAG foi realizada a primeira aplicação das diferentes concentrações de AH. Aos 9 DAG a solução nutritiva foi novamente renovada e realizada a segunda aplicação dos diferentes tratamentos (Figura 1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições para cada concentração (9), contendo 8 replicatas (n=288).

Para o estabelecimento da concentração ótima do ácido húmico foram avaliadas as seguintes concentrações: 0 (controle absoluto), 2, 5, 10, 30, 50, 80, 100 e 150 mg de AH.L⁻¹, que foram solubilizados em solução nutritiva e mantido pH 5,8. As concentrações do ácido húmico foram baseadas em experimento prévio realizado por Tavares et al. (2017), tendo sido realizadas duas aplicações de AH, aos 6 DAG e aos 9 DAG (Figura 1).

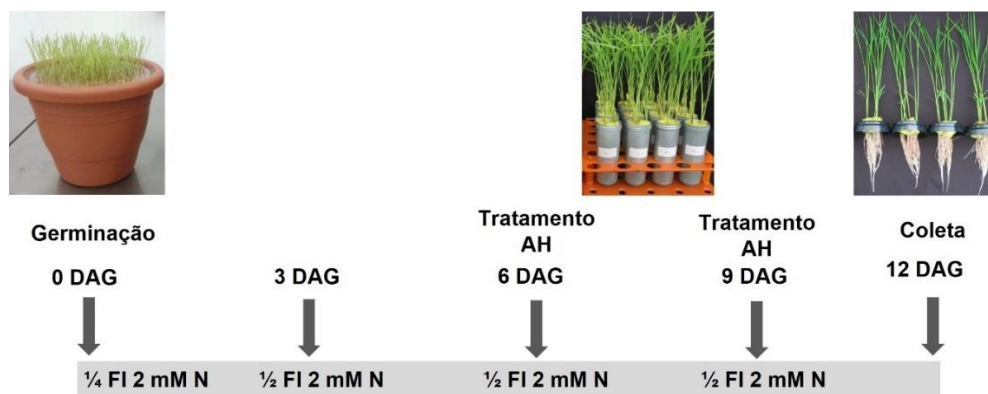


Figura 1. Esquema de cultivo das plantas de arroz da variedade Nipponbare que foram submetidas a diferentes concentrações de AH com suprimento de 2mM de N (1,5 mM de N-NO₃⁻ e 0,5 mM de N-NH₄⁺). Aos 12 DAG foi realizada a coleta três horas após o início do período de luz para excluir variações diurnas. DAG: dias após a germinação, FI: força iônica, AH: ácido húmico.

As concentrações dos inibidores Sodium benzoate (SB); Ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic (TIRON); N N'-Dimethylthiourea (DMTU); Diphenyleneiodonium chloride (DPIC); Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic (PCIB) e Fluridone (FLD) foram definidas com base em experimentos, descritos na literatura, conforme abaixo:

- Sodium benzoate (**SB**) (*scavenger* de HO*), nas concentrações de 0 (controle absoluto); 0,05; 0,5; 1; 1,5; 3; 5; 10 e 50 mM de SB.L⁻¹ (KOVÁČIK et al., 2009; DAS & KAR, 2017). HO*: hidroxila. Foram estabelecidas 9 concentrações para a curva (n=288);
- Ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic (**TIRON**), (*scavenger* de O₂^{-*}), nas concentrações de 0 (controle absoluto); 50; 100; 300; 500; 800; 1000; 1500 e 2000 µM de TIRON.L⁻¹ (LEE et al., 2017; CHEN et al., 2018). O₂^{-*}: superóxido. Foram estabelecidas 9 concentrações para a curva (n=288);
- N N'-Dimethylthiourea (**DMTU**) (*scavenger* de H₂O₂), nas concentrações de 0 (controle absoluto); 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20 e 50, 100 mM de DMTU.L⁻¹ (YANG et al.,

2013; CHEN et al., 2018; WANG et al., 2018). H₂O₂: peróxido de hidrogênio. Foram estabelecidas 9 concentrações para a curva (n=288);

d) Diphenyleneiodonium chloride (**DPIC**) (inibidor de NADPH oxidase), nas concentrações de 0 (controle absoluto); 0 (controle com solvente); 1; 5; 10; 25 e 30 μM de DPI.L⁻¹ (YANG et al., 2013; LEE et al., 2017; WANG et al., 2018; KUSHWAHA et al., 2019). NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina. Foram estabelecidas 7 concentrações para a curva (n=224);

e) Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic (**PCIB**) (inibidor da ação de auxina), nas concentrações 0 (controle absoluto); 0 (controle com solvente); 5; 10; 25; 50; 100 e 200 μM de PCIB . L⁻¹ (OONO et al., 2003; MORA et al., 2012). Foram estabelecidas 8 concentrações para a curva (n=256);

f) Fluridone (**FLD**) (inibidor da biossíntese de ABA), nas concentrações de 0 (controle absoluto); 0 (controle com solvente); 5; 10; 25; 50; 100 e 200 μM de FLD . L⁻¹ (KONDHARE et al., 2014; SANCHEZ-ROMERA et al., 2014; OLAETXEA et al., 2015). ABA: ácido abscísico. Foram estabelecidas 8 concentrações para a curva (n=256).

Os inibidores DPIC, PCIB, FLD, foram preparados em dimetil sulfóxido (DMSO), e os demais inibidores foram preparados em água deionizada. Os inibidores foram dissolvidos nos diferentes solventes para preparar uma solução estoque de 1000X. Para cada experimento, as plantas controles receberam a mesma quantidade correspondente aos solventes utilizados no preparo dos inibidores, além de ter sido mantido um controle absoluto contendo somente solução nutritiva.

Foi realizado de forma separada um experimento para cada inibidor. Sendo assim, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições para cada concentração dos diferentes inibidores, contendo 8 replicatas.

A idade das plantas foi a mesma utilizada para o estabelecimento da curva de calibração do AH, tendo sido realizada somente uma aplicação de cada inibidor aos 9 DAG (Figura 2). O intuito de realizar essa curva de calibração era determinar a concentração ideal de cada inibidor que resultem em prejuízo ao desenvolvimento do sistema radicular, sem, contudo, apresentar toxidez severa as plantas. Portanto, foi realizada somente uma aplicação dos inibidores.

As plantas foram mantidas nessas condições por 72 h. Aos 12 DAG, para excluir as variações diurnas, três horas após o início do período de luz as plantas foram coletadas.

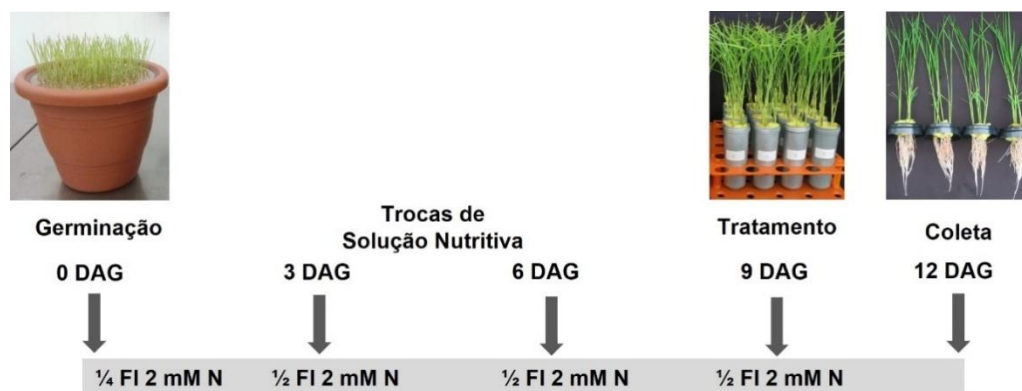


Figura 2. Esquema de cultivo das plantas de arroz da variedade Nipponbare que foram submetidas a diferentes concentrações dos inibidores, com suprimento de 2 mM de N (1,5 mM de N-NO_3^- e 0,5 mM de N-NH_4^+). Aos 12 DAG foi realizada a coleta três horas após o início do período de luz para excluir variações diurnas. DAG: dias após a germinação, FI: força iônica.

No momento da coleta foi mensurado o comprimento da parte aérea, em centímetros, posteriormente foram particionadas em raiz e parte aérea e pesadas para obtenção da massa fresca (g). As raízes coletadas foram armazenadas em tubo falcon contendo etanol 50% para posteriores análises da morfologia radicular. Para obtenção da massa seca (g) da parte aérea, as amostras foram secas em papel toalha, transferidas para sacos de papel e mantidas em estufa a 60°C durante 72h e pesadas posteriormente. Para obtenção da massa seca (g) de raiz, após a análise da morfologia radicular, seguiu-se o mesmo procedimento realizado para a parte aérea.

3.4.5 Análise da morfologia radicular

Para análise da morfologia radicular, as raízes foram espalhadas em uma cuba contendo água deionizada e escaneadas utilizando o scanner Epson Expression 10000XL (Epson, Toronto, Canada). As imagens foram analisadas utilizando o software de sistema de análise de imagem baseado em scanner WinRhizo Arabidopsis (Regent Instruments, Montreal, QC, Canada, 2012b) na definição de 600 dpi (pontos por polegada).

Os parâmetros determinados foram os seguintes: comprimento total de raízes (mm), diâmetro médio (mm), área de superfície (mm^2), volume radicular (mm^3) e número de pontas.

3.4.6 Análise estatística

Para as curvas de calibração foi utilizada a análise de regressão quadrática. Os gráficos foram elaborados no programa SigmaPlot 10.0.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Espectroscopia do AH usando ATR- FTIR-e RMN de ^{13}C via CP/MAS

A espectroscopia FTIR produziu um padrão espectral para o AH extraído (Figura 3). Bandas de absorção intensas foram observadas em aproximadamente $3660\text{-}3284\text{ cm}^{-1}$ indicando a presença de $-\text{OH}$ e/ou $-\text{NH}$, que correspondem aos grupos funcionais: álcool, ácidos carboxílicos e/ou aminas. A banda de absorção $\sim 2979\text{ cm}^{-1}$ corresponde a presença de $-\text{CH}$ ($-\text{CH}_3$ alifáticos). As bandas de $1828\text{-}1602\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$, que correspondem aos grupos aromáticos, carbonila, amida, éster. A banda de absorção 1384 cm^{-1} corresponde a presença de $-\text{CH}$. A banda 1242 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-N , enquanto a banda 1124 cm^{-1} corresponde ao estiramento de C-O , que pertence aos álcoois primários. A banda em aproximadamente 1030 cm^{-1} é característica de estiramentos $-\text{OH}$ de álcoois alifáticos e polissacarídeos. A banda 671 cm^{-1} corresponde a presença de $\text{C}=\text{C}$, que corresponde aos alcenos.

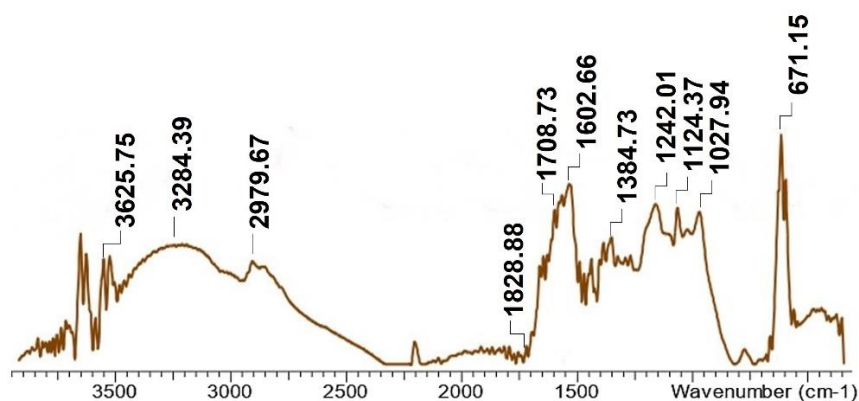


Figura 3. Espectro na região do infravermelho transformada de Fourier com reflectância atenuada (ATR-FTIR) do ácido húmico proveniente de vermicomposto. Dado publicado recentemente pela autora em Souza et al. (2021).

O espectro do AH obtidos RMN de ^{13}C via CP/MAS é mostrado na Figura 4. No espectro, os picos apresentados fornecem informações sobre os tipos de ligações químicas dos núcleos de C presentes na molécula e as áreas abaixo desses picos fornecem informações quantitativas.

A Tabela 1 indica diferenças nas quantidades relativas dos tipos de carbono presente no AH. Na região de $0\text{-}45\text{ ppm}$ tem-se a presença de $-\text{CH}_3$ terminal, que pertencem a cadeia de carbonos alifáticos não substituídos, representando estruturas alifáticas não funcionalizadas. Em adição, foi detectado na região de $45\text{-}60\text{ ppm}$ a cadeia de carbonos alifáticos substituídos, que representam os polipeptídeos. Na região de $60\text{-}90\text{ ppm}$ são detectados os carbonos alifáticos que pertencem aos fragmentos de celulose e hemicelulose, bem como fragmentos de lignina. A região de $90\text{-}110\text{ ppm}$ representam os carbonos alifáticos di-substituídos ligados ao oxigênio, confirmando a presença de carboidratos, e lignina. Na região $110\text{-}140\text{ ppm}$ indica a presença de carbonos aromáticos, enquanto na região de $140\text{-}155\text{ ppm}$ a presença de carbonos aromáticos funcionalizados, ligados ao oxigênio ou nitrogênio. Na região de $155\text{-}185\text{ ppm}$ a presença de carbonos carboxílicos, e na região de $185\text{-}230\text{ ppm}$ a presença de carbonila.

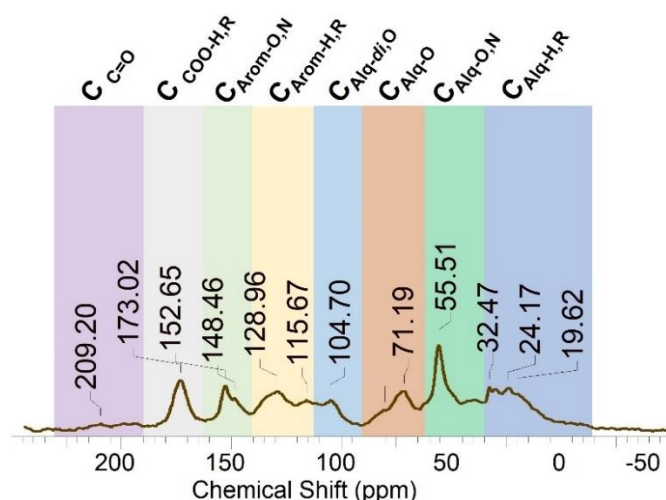


Figura 4. Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C RMN CP/MAS do ácido húmico proveniente de vermicomposto. Dado publicado recentemente pela autora em Souza et al. (2021).

Tabela 1. Quantidade relativa (%) dos tipos de carbono em amostra de AH proveniente de vermicomposto.

	$\text{C}_{\text{Alq-H,R}}$ 0-45	$\text{C}_{\text{Alq-O,N}}$ 45-60	$\text{C}_{\text{Alq-O}}$ 60-90	$\text{C}_{\text{Alq-di-O}}$ 90-110	$\text{C}_{\text{Ar-H,R}}$ 110-140	$\text{C}_{\text{Ar-O}}$ 140-155	$\text{C}_{\text{COO-H,R}}$ 155-185	$\text{C}_{\text{C=O}}$ 185-230
	-----%-----							
AH	31,30	12,60	13,10	6,10	13,10	6,10	13,10	4,50
	Arom	Alif	HB/HL	P				
	19,22	80,78	1,02	1,25				

Nota: Arom = aromaticidade; Alif = alifaticidade; HB/HL = índice de hidrofobicidade; P = índice de polaridade.

3.5.2 Efeito da aplicação de AH e inibidores sobre o crescimento do sistema radicular

Para verificar o efeito do AH no estímulo do crescimento radicular foram necessárias à execução experimental de três curvas de calibração, para assim, estabelecer a concentração ideal do ácido húmico nas condições propostas para a execução dos ensaios preliminares dos experimentos. Para isso, na primeira curva de calibração foi realizada uma aplicação dos diferentes tratamentos de AH aos 10 DAG e a coleta realizada aos 13 DAG, porém não ficou evidenciada a concentração ótima do AH (Apêndice 28).

Assim, foi conduzido um segundo experimento, onde foram realizadas duas aplicações de AH, aos 10 DAG e aos 13 DAG, com intervalo de 3 dias, e a coleta realizada aos 16 DAG. Neste experimento, foi observado o efeito estimulatório do AH sobre o crescimento radicular, porém foi possível observar que não houve diferença na massa radicular entre as diferentes concentrações utilizadas (Apêndice 29), que pode ser explicado devido ao pouco espaço disponível no tubo falcon para o crescimento das raízes.

Dessa forma, foi estabelecida a terceira curva de calibração das concentrações de AH, tendo sido realizadas duas aplicações de AH, aos 6 DAG e aos 9 DAG (Figura 1 da seção Material e Métodos), com intervalo de 3 dias, e a coleta realizada aos 12 DAG, tendo sido avaliada a altura, biomassa de raiz e parte aérea, bem como, morfologia radicular através do software WinRhizo, sendo possível observar uma diferença entre as diferentes concentrações aplicadas (Figura 5).

A bioatividade foi avaliada usando a capacidade do AH em induzir melhorias nas características morfofisiológicas. Após a aplicação do AH nas diferentes concentrações foi observado que existe um período mais adequado de resposta das plantas, e para as condições do experimento, tiveram que ser feitas duas aplicações de AH, e a coleta ser realizada aos 12 DAG para que houvesse espaço suficiente para o crescimento radicular nas condições propostas para a execução dos ensaios preliminares utilizando os tubos falcon, e pudesse ser observado o efeito estimulatório sobre o crescimento radicular. Todas as curvas de calibração para os inibidores seguiram as mesmas condições experimentais, porém com uma única aplicação dos inibidores.

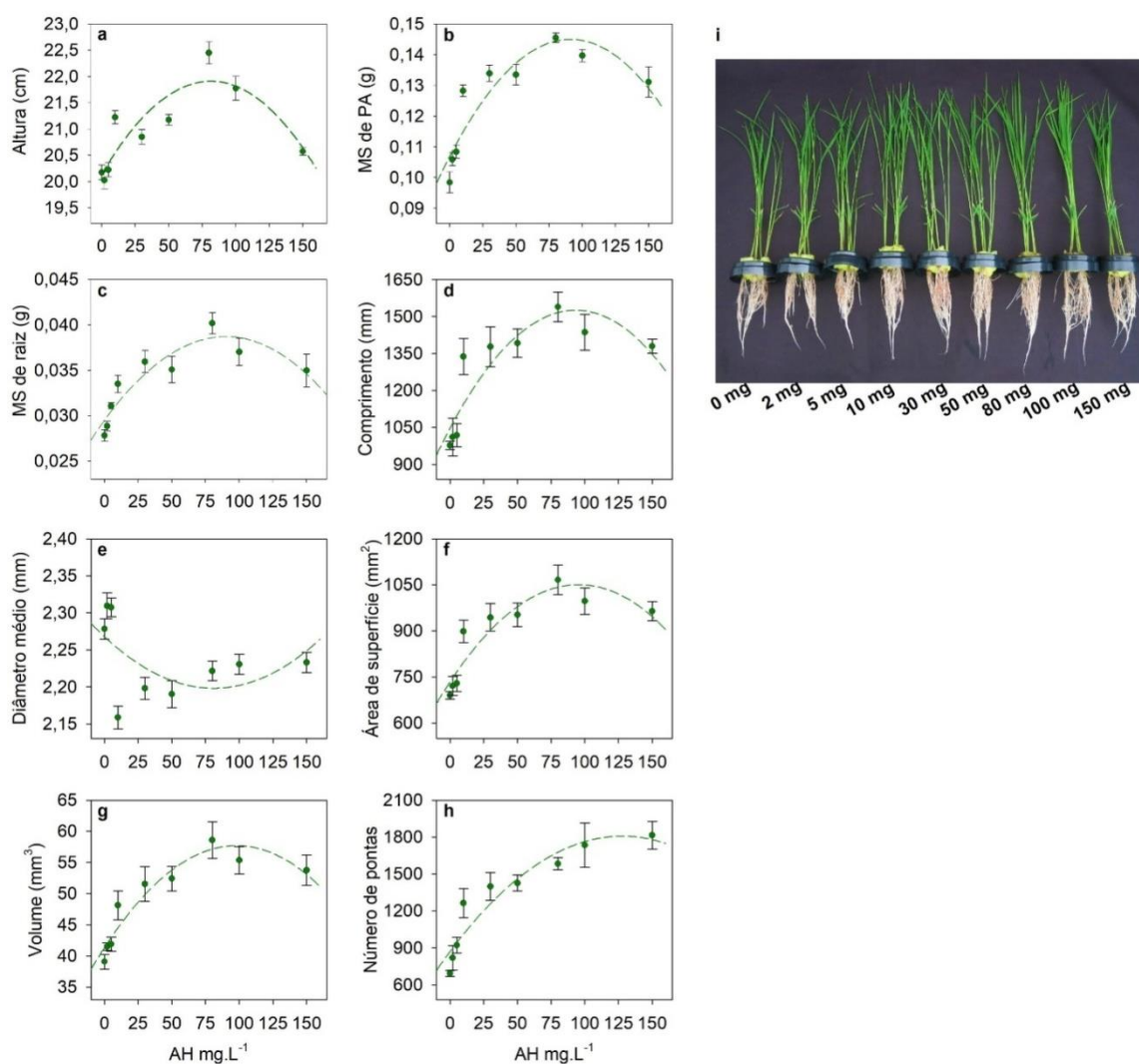


Figura 5. Curva de calibração das concentrações de AH. As plantas foram coletadas aos 12 DAG e foram realizadas duas aplicações de AH, aos 6 e aos 9DAG. **(a-c)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao AH. **(d-h)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(i)** Plantas crescidas nas diferentes concentrações de AH. AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 2, 5, 10, 30, 50, 80, 100 e 150 mg de AH.L⁻¹.

A redução no diâmetro (Figura 5e) ocasionada pelas concentrações intermediárias pode favorecer o surgimento de raízes mais finas, podendo contribuir para o aumento na capacidade

de absorção de água e nutrientes pelas raízes. Ainda Na Figura 5b-c é possível visualizar a resposta na produção de biomassa nas diferentes concentrações. Quando avaliada a produção de biomassa na raiz e parte aérea é possível verificar que ocorreu um maior estímulo no crescimento nas concentrações intermediárias ocasionada pelo efeito do AH, sendo mais expressivo na concentração intermediária de 80 mg de AH.L⁻¹.

Para as curvas de calibração dos inibidores foram utilizados: benzoato de sódio (SB) (*scavenger* de HO*), ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic (TIRON) (*scavenger* de O₂*), N N'-Dimethylthiourea (DMTU) (*scavenger* de H₂O₂), Diphenyleneiodonium chloride (DPIC) (inibidor específico de NADPH oxidase ligado a membrana), ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic (PCIB) (inibidor da ação de auxina), Fluridone (FLD) (inibidor da biossíntese de ABA), em diferentes concentrações conforme citado no item 3.4.4 Material e Métodos.

Para o estabelecimento das concentrações dos inibidores, 72 h após a aplicação (12 DAG) foi realizada a coleta e avaliada a altura, biomassa de raiz e parte aérea, bem como, morfologia radicular através do software WinRhizo (os resultados são apresentados no Apêndice 30 a 35). As concentrações ótimas dos inibidores que resultaram em prejuízo ao desenvolvimento do sistema radicular, sem, contudo, apresentar toxidez severa as plantas foram determinadas com base na redução de biomassa radicular. Assim, foram as seguintes concentrações definidas: plantas tratadas com benzoato de sódio (SB) (3 mM.L⁻¹ de SB); TIRON (800 µM.L⁻¹); DMTU (5 mM.L⁻¹); DPIC (5 µM.L⁻¹); PCIB (25 µM.L⁻¹); fluridone (Fld) (50 µM.L⁻¹).

3.6 DISCUSSÃO

A técnica de caracterização espectroscópica ATR-FTIR fornece informações detalhadas sobre os grupos funcionais oxigenados presentes na complexa estrutura molecular, sendo representados pela intensidade do sinal infravermelho (FRANCIOSO et al., 1996), isto é, quanto maior a quantidade de grupamentos funcionais vibrando em uma região próxima, maior será o alargamento da banda de absorção em um determinado número de onda em centímetros inversos. Assim, essa é uma técnica qualitativa, representando a presença ou ausência dos grupamentos funcionais. A partir dos resultados (Figura 3) observa-se que o AH extraído de vermicomposto possuem a presença de vibrações de estiramentos –OH e/ou –NH pertencentes aos grupos funcionais: álcool, ácidos carboxílicos e/ou aminas, sugerindo uma característica estrutural mais alifática e funcionalizada.

Por outro lado, a técnica de caracterização espectroscópica realizada através de RMN de ^{13}C via CP/MA indica aumento na intensidade dos picos, além de indicar aumento na resolução dos sinais do spin usando representando o deslocamento químico ou intensidade do campo magnético em ppm (SONG et al., 2008). Sendo considerada uma técnica quantitativa, em que indica as quantidades relativas dos carbonos extraídos dos espectros na forma de picos (Figura 4).

A partir da integração das diferentes regiões no RMN de ^{13}C via CP/MAS (Tabela 1) foi possível observar que o AH oriundo de vermicomposto possui um maior predomínio de fragmentos alifáticos e carbono carboxílico em detrimento a quantidade de carbonos aromáticos, indicando a presença de propriedade hidrofílica e hidrofóbica, característica presente em amostras de AH oriundas de diferentes origens, influenciando na labilidade e recalcitrância das estruturas (SOUZA et al., 2021).

Utilizando técnicas espectroscópicas em amostras de AH extraídas de vermicomposto, Aguiar et al. (2013) ao analisarem diferentes espectros de RMN observaram que mesmo em amostras de vermicomposto produzidas com um intervalo maior de decomposição, estruturas mais recalcitrantes como resíduos de ligninas são acumuladas junto com a decomposição de carboidratos e a formação de carboxilas, contribuindo para o aumento da bioatividade do AH.

Inúmeros trabalhos mostram que a atividade biológica das substâncias húmicas depende do tamanho da molécula, em que fragmentos de baixo peso molecular correspondem a fração mais ativa das SH, com estruturas menos complexas com predomínio de carbonos alifáticos e com elevado grau de substituição (CANELLAS et al., 2010; GARCÍA et al., 2012), enquanto que fragmentos maiores atuam como reguladores do crescimento radicular, isso porque ocorre uma fragmentação da estrutura de SH devido a exsudação de ácidos orgânicos e o decréscimo do pH na rizosfera, favorecendo a entrada de pequenos fragmentos nas plantas exercendo um efeito semelhante ao efeito hormonal, além de regular o conteúdo de ERO (DOBBS et al., 2010; GARCÍA et al., 2016b; PIZZEGHELLO et al., 2020).

A análise do índice de hidrofobicidade/hidrofiliidade indica que a amostra é mais hidrofílica gerando uma propriedade de maior polaridade devido a maior presença de carbonos alifáticos substituídos. Essa propriedade confere maior grau de substituição e a presença em maior número de grupos funcionais, contribuindo assim para um AH de caráter mais hidrofílico e maior labilidade devido a presença de componentes lábeis como celulose, carboidratos, proteínas e lipídeos. De acordo com Dobbss et al. (2010) quanto maior a diversidade química de moléculas bioativas, maior a bioatividade do AH.

A área superficial e comprimento são um dos principais parâmetros utilizados para expressar as taxas de absorção de água e nutrientes (ROSSIELO et al., 1995). Além disso, raízes de menor diâmetro, apresentam uma maior capacidade de absorção de água e nutrientes devido ao aumento na superfície de contato raiz-solo (RANGEL, 2018). De acordo com o mesmo autor

(RANGEL, 2018), quanto maior o número de pontas, maior a emissão de raízes laterais, favorecendo uma maior capacidade de exploração do solo.

De acordo com Olaetxea et al. (2015) as SH na concentração de 100 mg.L⁻¹ possuem um efeito positivo sobre a rizosfera, e elevadas concentrações podem inibir o crescimento da parte aérea, devido ao bloqueio que pode ocorrer na absorção de água pelas raízes. Para as condições experimentais deste trabalho, o efeito positivo sobre a biomassa e a morfologia radicular ocorreu mais proeminente na concentração intermediária de 80 mg de AH.L⁻¹, sendo observado um efeito negativo nas concentrações superiores. As substâncias húmicas desencadeiam uma série de eventos que modulam a morfologia e arquitetura do sistema radicular por meio de complexas interações que envolvem vias de sinalização, ação tipo hormonal e ativação de rotas bioquímicas, resultando em efeitos positivos quando em concentrações adequadas no meio (GARCÍA et al., 2018).

3.7 CONCLUSÕES

Através das técnicas espectroscópicas de ATR-FTIR e RMN de ^{13}C via CP/MAS foi possível confirmar a hipótese levantada que os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular devido suas propriedades bioativas. O AH oriundo de vermicomposto possui maior predomínio de fragmentos alifáticos e carbono carboxílico, conferindo uma propriedade mais alifática, contribuindo assim para um AH de caráter mais hidrofílico e maior labilidade, influenciando na labilidade e recalcitrância das estruturas.

Ao avaliar a bioatividade do AH em plantas de arroz este induziu melhorias nas características morfofisiológicas na concentração intermediária de 80 mg de AH.L^{-1} , sendo observado um efeito negativo nas concentrações superiores. A partir dessas curvas de calibração, foi possível determinar a concentração ótima do AH. Além disso, foi possível verificar o seu efeito estimulatório sobre o crescimento radicular nas diferentes concentrações. Dessa forma, foi possível validar o modelo experimental ao associar as propriedades do AH que contribuíram para o aumento da bioatividade.

4. CAPÍTULO II

**MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO DO AH QUE PROMOVEM O
CRESCIMENTO RADICULAR EM PLANTAS DE ARROZ SÃO
DEPENDENTES DAS ERO, ABA E AUXINA**

4.1 RESUMO

É notório que bioestimulantes elicitam uma resposta nas plantas que pode influenciar características fenotípicas e melhorar o rendimento através da tolerância a estresses abióticos, e absorção e assimilação de nutrientes. As SH influenciam o desenvolvimento de plantas, tanto pelos efeitos diretos na arquitetura e no metabolismo vegetal como pelos efeitos indiretos ocasionados no solo. O aumento da emissão de pelos radiculares e raízes laterais em resposta às SH geralmente está relacionado às interações hormonais e espécies reativas de oxigênio. Evidências recentes mostram a relação entre a aplicação de ácido húmico e o aumento da produção interna de ERO indicando uma possível ação dessas ERO como moléculas sinalizadoras no mecanismo de ação das substâncias húmicas. Com base no exposto, as seguintes hipóteses foram levantadas: (i) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular via regulação oxidativa; (ii) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular via regulação hormonal; (iii) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular por meio da interação entre regulação das ERO e regulação hormonal. Este segundo capítulo teve por objetivo elucidar os mecanismos de sinalização responsáveis pela resposta fisiológica do AH no estímulo do crescimento radicular aliado a análise das características morfológicas e estudo da expressão gênica para relacionar as vias de sinalização hormonal e o metabolismo das ERO. Foram realizados experimentos de *time-course* para verificar o efeito do inibidor ao longo do tempo, e assim, validar o modelo experimental da aplicação combinada entre AH + inibidor nas melhores concentrações obtidas nos ensaios preliminares de concentração-resposta. A partir desses experimentos, além das análises morfológicas de raiz, utilizando-se o software WinRhizo Arabidopsis, também foi realizado um estudo de expressão gênica, tendo sido avaliados genes relacionados as vias de sinalização de ERO: BAS 1, GPX, PRX112 e CuZnSOD1, e genes relacionados ao crescimento radicular, tais como, TOR, IAA11 e NRT2.1. Através da abordagem fenotípica foi possível verificar os efeitos da aplicação de AH sobre as características morfofisiológicas de plântulas de arroz, tendo sido possível lançar luz sobre possíveis mecanismos responsáveis pelo efeito direto da ação do AH ao promover o crescimento radicular. Os dados obtidos a partir da execução deste estudo mostram que a promoção do crescimento radicular é um mecanismo dependente da produção de ERO, e o efeito estimulatório do AH é dependente da produção de HO^* , O_2^{*-} e H_2O_2 . Através da abordagem molecular foi possível observar alterações na regulação gênica ocasionadas pela aplicação do AH, sendo mais expressiva em genes relacionados a atuação de enzimas antioxidantes que desempenham um papel na proteção das plantas contra o estresse oxidativo ocasionado principalmente por estresses abióticos. Os resultados apresentados neste estudo mostram que AH extraídos de vermicomposto desempenham um papel no estímulo do crescimento radicular em plantas de arroz e claramente é um mecanismo dependente de várias vias de sinalização existentes nas plantas, em especial as vias de sinalização de ERO e hormonais. Neste estudo foi possível confirmar o efeito protetivo que o AH exerce sobre o crescimento das plantas, explicando em parte os mecanismos fisiológicos por trás das respostas na promoção do crescimento radicular.

Palavras-chave: Ácido húmico. Sinalização. ERO. Crescimento radicular.

4.2 ABSTRACT

It is well known that biostimulants elicit a response in plants that can influence phenotypic traits and improve yield through tolerance to abiotic stresses, and nutrient uptake and assimilation. HS influence plant development, both through direct effects on plant architecture and metabolism, and indirect effects on the soil. The increased emission of root hairs and lateral roots in response to HS is generally related to hormonal interactions and reactive oxygen species. Recent evidence shows a relationship between humic acid application and increased internal production of ROS indicating a possible action of these ROS as signaling molecules in the mechanism of action of humic substances. In this context, the following hypotheses were established: (i) HA isolated from vermicompost signal root system growth via oxidative regulation; (ii) HA isolated from vermicompost signal root system growth via hormonal regulation; (iii) HA isolated from vermicompost signal root system growth through the interaction between ROS regulation and hormonal regulation. This second chapter aimed to elucidate the signaling mechanisms responsible for the physiological response of AH in stimulating root growth coupled with the analysis of morphophysiological characteristics and gene expression study to relate hormone signaling pathways and ROS metabolism. In this study, WinRhizo Arabidopsis software was used for the root morphology analyses. Time-course experiments were performed to verify the effect of the inhibitor over time, and thus validate the experimental model of the combined application between AH + inhibitor. Based on this experiment, besides the morphological analyses, a gene expression study was also performed where genes related to ROS signaling pathways were evaluated: BAS 1, GPX, PRX112 and CuZnSOD1, as well as genes related to root growth, such as TOR, IAA11 and NRT2.1. Through the phenotypic approach it was possible to verify the effects of AH application on the morphophysiological characteristics of rice seedlings, and it was possible to shed light on possible mechanisms responsible for the direct effect of the action of AH in promoting root growth. The data collected from the performance of this study suggest that root growth promotion is a mechanism dependent on ROS production, and the stimulatory effect of AH appears to be dependent on HO^* , O_2^{-*} e H_2O_2 production. Through the molecular approach it was possible to observe changes in gene regulation caused by the application of AH, being more expressive in genes related to the action of antioxidant enzymes that play a role in protecting plants against oxidative stress caused mainly by abiotic stresses. The results presented in this study show that AH extracted from vermicompost play a role in stimulating root growth in rice plants and clearly it is a mechanism dependent on several existing signaling pathways in plants, especially ERO and hormonal signaling pathways. In this study it was possible to confirm the protective effect that AH produces on plant growth, explaining in part the physiological mechanisms behind the responses in promoting root growth.

Key words: Humic acid. Signaling. ROS. Root growth.

4.3 INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos relatam as mudanças que as substâncias húmicas induzem tanto no metabolismo primário quanto secundário, promovendo um estresse benéfico às plantas, desencadeado por uma complexa interação entre vias de sinalização hormonal e o metabolismo das espécies reativas de oxigênio (ERO) (NARDI et al., 2007; TREVISAN et al., 2010, 2011; OLAETXEA et al., 2015; GARCÍA et al., 2016a; CORDEIRO et al., 2017; OLAETXEA et al., 2018; ROOMI et al., 2018; NUNES et al., 2019; SOUZA et al., 2022), indicando uma possível ação dessas moléculas como sinalizadoras no mecanismo de ação das substâncias húmicas, promovendo um estímulo ao crescimento das plantas.

Vários estudos evidenciaram o efeito semelhante das SH ao efeito hormonal, do termo em inglês *hormone-like*, e tem sido relatado diversas evidências de respostas hormonais e estruturas não lignificantes dentro da estrutura das SH, demonstrando que estas podem estimular a atividade e promover a síntese das bombas de prótons na membrana plasmática, intensificando a aquisição de nutrientes pelas plantas (TREVISAN et al., 2010; ZANDONADI et al., 2010; MUSCOLO et al., 2013; TAVARES et al., 2017; NARDI et al., 2018).

O aumento da emissão de pelos radiculares e raízes laterais em resposta às SH geralmente está relacionado às interações hormonais (TREVISAN et al., 2010; OLAETXEA et al., 2015, 2018; SOUZA et al., 2022) e ERO (GARCÍA et al., 2016a; CORDEIRO et al., 2017). Evidências recentes mostram a relação entre a aplicação de ácido húmico e o aumento da produção interna de ERO (ROOMI et al., 2018; NUNES et al., 2019), indicando uma possível ação dessas ERO como moléculas sinalizadoras no mecanismo de ação das substâncias húmicas.

As EROs são subprodutos do metabolismo celular, e possuem papel importante na sinalização molecular regulando o desenvolvimento das plantas (TRIPATHY & OELMÜLLER, 2012; KUSHWAHA et al., 2019). Estudos já relataram que as SH podem regular os níveis endógenos de ERO em plantas de arroz (AGUIAR et al., 2016; GARCÍA et al., 2016a; GARCÍA et al., 2018). A aplicação exógena de SH no sistema radicular pode ativar enzimas do sistema antioxidativo, como APX, CAT, POX e SOD, que atuam no citosol das células das raízes controlando os níveis de ERO (GARCÍA et al., 2016a; CORDEIRO et al., 2017).

De acordo com Asli & Neumann (2010) o início da interação SH-plantas tem sido explicado como sendo uma aglomeração dos fragmentos húmicos nas superfícies das raízes, que ocasiona possível entupimento dos poros radiculares, modificando a condutividade hidráulica e o funcionamento das raízes. Essa aglomeração de AH poderia regular o metabolismo oxidativo, formando uma espécie de incrustação húmica radicular que causa um tipo de “pseudoestresse” ou “euestresse”, que leva ao aumento na concentração de ERO, com o aumento na atividade de enzimas do metabolismo oxidativo (GARCÍA et al. 2012, 2016a).

Apesar das evidências estabelecidas dos efeitos bioestimulante, muitos aspectos funcionais das SH ainda precisam ser elucidados. Com base no exposto, as seguintes hipóteses foram levantadas: (i) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular via regulação oxidativa; (ii) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular via regulação hormonal; (iii) os AH isolados de vermicomposto sinalizam para o crescimento do sistema radicular por meio da interação entre regulação das ERO e regulação hormonal.

O objetivo deste Capítulo II foi elucidar mecanismos de sinalização responsáveis pela indução do crescimento do sistema radicular em resposta à aplicação de AH.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Efeito da aplicação dos inibidores ao longo do tempo

Este experimento foi conduzido com o intuito de verificar o efeito dos inibidores ao longo do tempo e assim responder a um questionamento sobre quanto tempo após a renovação da solução nutritiva ainda seria possível detectar o efeito do inibidor sobre a planta. A concentração ótima de cada inibidor que resultou em prejuízo ao desenvolvimento do sistema radicular, sem, contudo, apresentar toxidez severa as plantas, foi validada e definida através das curvas de calibração dos inibidores.

Para isso, sementes de arroz da variedade Nipponbare foram submetidas ao procedimento de “Quebra de Dormência” como descrito por Souza (2018). As sementes foram previamente aquecidas a 45°C por 2 horas em estufa de circulação de ar forçada; em seguida foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5% sob agitação por inversão durante 15 minutos, e deixadas imersas em água deionizada *overnight* na Câmara de Crescimento. No dia seguinte, as sementes imersas em água foram aquecidas novamente a 45°C por 2 horas, desinfestadas com etanol 70% sob agitação por inversão durante 1 minuto, lavadas com água deionizada repetidas vezes (aproximadamente 10 vezes), e foram acondicionadas sobre gaze em vasos com capacidade de 3 L de água deionizada para germinação.

A germinação e o cultivo das plantas foram realizados na Câmara de Crescimento do Departamento de Solos da UFRRJ, com fluxo de fótons fotossintéticos dentro de uma faixa de 318 a 330 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$; fotoperíodo 14horas/10horas (luz/escuro), umidade relativa do ar de 75% e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna).

No momento da germinação, foi adicionada uma solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada com ¼ FI de 2 mM de N (1,5 mM de N-NO_3^- e 0,5 mM de N-NH_4^+) com o pH sendo mantido a 5,8, e a fonte de nitrogênio nitrato de cálcio e nitrato de amônio. Aos 3 DAG (dias após a germinação) foi fornecida uma solução nutritiva de ½ FI de 2 mM de N. Aos 5 DAG as plântulas foram transferidas para tubos falcon com capacidade de 50 mL (8 plântulas por tubo falcon) para uma melhor adaptação das plantas.

Aos 6 DAG três tratamentos foram aplicados em solução nutritiva: plantas controle crescidas em solução nutritiva durante a execução do experimento; e dois tratamentos com plantas tratadas com inibidor, tendo sido mantidas nessas condições por 72 h. Aos 9 DAG a solução nutritiva foi novamente renovada e aplicados três tratamentos: plantas controle que continuaram o crescimento em solução nutritiva durante a execução do experimento; plantas com ausência do inibidor em solução nutritiva; e plantas que continuaram o crescimento em solução nutritiva contendo inibidor. O primeiro ponto de coleta foi realizado aos 9 DAG (tempo de “zero” horas), seguido dos tempos de coleta de 24 h, 48 h e 72 h (aos 12 DAG) (Figura 6).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos para cada inibidor avaliado: controle absoluto, ausência do inibidor (-), e presença do inibidor (+), quatro pontos de coleta, quatro repetições contendo 8 replicatas ($n=384/\text{inibidor}$). Para excluir as variações diurnas, as coletas eram realizadas sempre três horas após o início do período de luz.

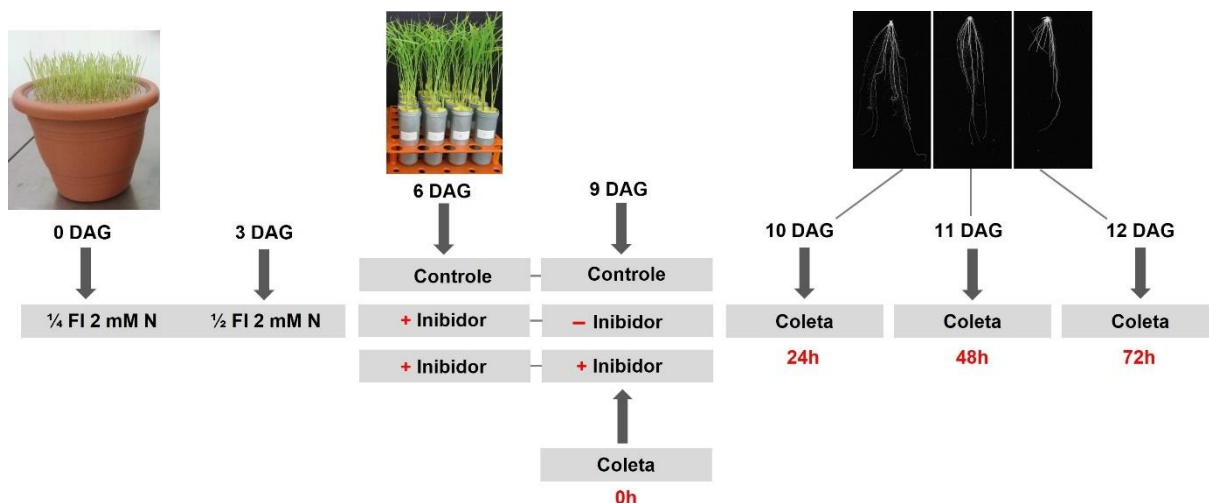


Figura 6. Esquema de cultivo das plantas de arroz da variedade Nipponbare que foram submetidas aos diferentes tratamentos com inibidor, e suprimento de 2mM de N (1,5 mM de N-NO_3^- e 0,5 mM de N-NH_4^+). Foram realizadas coletas nos tempos de 0 horas (h), 24 h, 48 h e 72 h. DAG: dias após a germinação, FI: força iônica.

No momento da coleta, as plantas foram particionadas em raiz e parte aérea e pesadas para obtenção da massa fresca (g). As raízes coletadas foram armazenadas em tubo falcon contendo etanol 50% para posteriores análises da morfologia radicular. Para obtenção da massa seca (g) da parte aérea, as amostras foram secas em papel toalha, transferidas para sacos de papel e mantidas em estufa a 60°C durante 72h e pesadas posteriormente. Para obtenção da massa seca (g) de raiz, após a análise da morfologia radicular, seguiu-se o mesmo procedimento realizado para a parte aérea.

4.4.2 Aplicação combinada de AH e inibidor

Após a validação experimental das curvas de calibração sendo possível determinar as concentrações ideais do ácido húmico e de cada inibidor, foi conduzido o experimento de combinação entre AH e inibidor com intuito de elucidar os mecanismos responsáveis pelo efeito direto da ação do ácido húmico ao promover o crescimento radicular.

Assim, os seguintes pressupostos foram levantados para este experimento: (i) se o AH for capaz de estimular o crescimento do sistema radicular na presença de um inibidor específico, é porque a rota interrompida pelo determinado inibidor não é a rota preferencial no mecanismo de ação do AH; (ii) por outro lado, se o AH não estimular o crescimento do sistema radicular na presença de determinado inibidor, é porque essa rota é a preferencial no mecanismo de ação do AH.

Para germinação e cultivo seguiu-se o mesmo procedimento citado no item 4.4.1. A concentração de AH determinada para o estudo foi de 80 mg.L^{-1} dissolvido em solução nutritiva antes da aplicação dos tratamentos. A concentração ótima de cada inibidor que resultou em prejuízo ao desenvolvimento do sistema radicular, sem, contudo, apresentar toxidez severa as plantas foram as seguintes: plantas tratadas com benzoato de sódio (SB) (3 mM.L^{-1} de SB); TIRON (800 $\mu\text{M.L}^{-1}$); DMTU (5 mM.L^{-1}); DPIC (5 $\mu\text{M.L}^{-1}$); PCIB (25 $\mu\text{M.L}^{-1}$); fluridone (Fld) (50 $\mu\text{M.L}^{-1}$).

Para investigar os mecanismos responsáveis pelo efeito direto da ação do ácido húmico ao promover o crescimento radicular, os seguintes modelos experimentais foram propostos neste estudo:

- a) Avaliação da relevância dos efeitos do AH na promoção do crescimento radicular e da parte aérea, **pela aplicação do AH e posterior aplicação do inibidor.**
- b) Avaliação da relevância dos efeitos do AH na promoção do crescimento radicular e da parte aérea, pela **aplicação do inibidor e posterior aplicação do AH.**

Para as condições propostas, três tratamentos foram aplicados aos 6 DAG (Figura 7) em solução nutritiva: (1) plantas controle crescidas em solução nutritiva durante a execução do experimento; (2) plantas tratadas com AH (80 mg.L^{-1} concentração adicionada a solução nutritiva); e (3) plantas tratadas com inibidor. Ambos os tratamentos foram mantidos nessas condições por 72 h com base nos resultados obtidos no experimento do item 4.4.1 (*time-course* dos inibidores).

Aos 9 DAG, a solução nutritiva foi renovada, e foram aplicados cinco tratamentos em solução nutritiva: (1) plantas controle que continuaram o crescimento em solução nutritiva durante a execução do experimento; (2) plantas que continuaram o crescimento em solução nutritiva contendo somente AH (80 mg.L^{-1} concentração adicionada a solução nutritiva); (3) tratamento combinado **AH + inibidor** (tratamento inicial de 80 mg.L^{-1} de AH por um período de 72 h e aos 9 DAG a solução nutritiva foi renovada e adicionado somente o inibidor); (4) plantas que continuaram o crescimento em solução nutritiva contendo inibidor; (5) tratamento combinado **inibidor + AH** (tratamento inicial com inibidor por um período de 72 h e aos 9 DAG a solução nutritiva foi renovada e adicionado somente 80 mg.L^{-1} de AH). Para o tratamento combinado, o inibidor não foi adicionado a solução nutritiva contendo AH devido a interação química que pode ocorrer entre as substâncias, podendo prejudicar a avaliação do experimento.

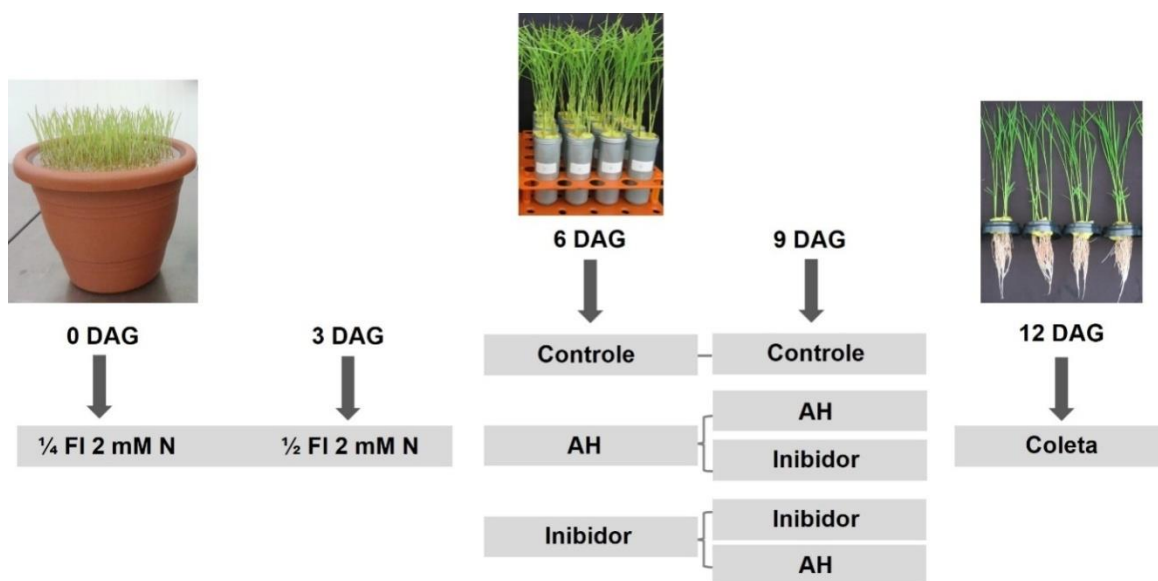


Figura 7. Esquema de cultivo das plantas de arroz da variedade Nipponbare que foram submetidas aos diferentes tratamentos com AH e inibidor com suprimento de 2 mM de N ($1,5 \text{ mM}$ de N-NO_3^- e $0,5 \text{ mM}$ de N-NH_4^+). Aos 12 DAG foi realizada a coleta três horas após o início do período de luz para excluir variações diurnas. DAG: dias após a germinação, FI: força iônica, AH: ácido húmico.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos para cada inibidor avaliado: controle absoluto, AH, AH + inibidor, inibidor, inibidor + AH, com quatro repetições, contendo 8 replicatas ($n=160/\text{inibidor}$). As plantas foram mantidas nessas condições por 72 h. Aos 12 DAG, para excluir as variações diurnas, três horas após o início do

período de luz as plantas foram coletadas. Este experimento foi conduzido 2x para coletar material suficiente para as análises previstas.

No momento da coleta foi mensurado o comprimento da parte aérea, em centímetros, posteriormente foram particionadas em raiz e parte aérea e pesadas para obtenção da massa fresca (g). Em seguida, as raízes foram armazenadas em tubo falcon contendo etanol 50% para posteriores análises da morfologia radicular. Para obtenção da massa seca (g) da parte aérea, as amostras foram secas em papel toalha, transferidas para sacos de papel e mantidas em estufa a 60°C durante 72h e pesadas posteriormente. Para obtenção da massa seca (g) de raiz, após a análise da morfologia radicular, seguiu-se o mesmo procedimento realizado para a parte aérea.

Para a análise da expressão gênica, o mesmo experimento foi conduzido novamente e as amostras foram particionadas em raiz e parte aérea e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (N₂) e armazenadas -80°C para posteriores análises.

4.4.3 Análise da morfologia radicular

Para análise da morfologia radicular, as raízes foram espalhadas em uma cuba contendo água deionizada e escaneadas utilizando o scanner Epson Expression 10000XL (Epson, Toronto, Canada). As imagens foram analisadas utilizando o software de sistema de análise de imagem baseado em scanner WinRhizo Arabidopsis (Regent Instruments, Montreal, QC, Canada, 2012b) na definição de 600 dpi (pontos por polegada). Os parâmetros determinados foram os seguintes: comprimento total de raiz (mm), diâmetro médio (mm), área de superfície (mm²), volume radicular (mm³), número de pontas, comprimento de raízes laterais (RL, mm).

4.4.4 Estudo da expressão gênica

Baseado em estudos anteriores que destacaram proteínas diferencialmente expressas em plantas tratadas com AH (TREVISAN et al., 2011; ROOMI et al., 2018; NUNES et al., 2019), foram selecionados genes relacionados as vias de sinalização, tais como, genes do metabolismo oxidativo das plantas, genes relacionados as proteínas regulatórias (proteínas quinases), genes responsivos a vias hormonais, bem como, genes de respostas fisiológicas ligados ao crescimento radicular e absorção de N, para realização do estudo de expressão gênica.

Para isso, a partir da identificação das proteínas encontradas nos artigos foi feita uma busca minuciosa no banco de dados de sequência proteica, UniProt (<https://www.uniprot.org/>), e realizado o alinhamento das sequências no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), com posterior identificação do gene correspondente em arroz no MSU RGAP (<http://rice.uga.edu/index.shtml>).

a) Extração de RNA total

O RNA total foi extraído segundo Gao et al. (2001) 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 material vegetal foram maceradas em N₂ líquido, transferidas para microtubo tipo eppendorf de 2mL e homogeneizadas por 10 minutos em vórtex numa mistura contendo 600 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e 800 µL de tampão NTES. Em seguida, o material vegetal foi centrifugado a 18.000xg. por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo microtubo de 1,5mL e foi adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 2 M pH 4,8 (NaOAc_{DEPC}) (70 µL) e 1 volume de isopropanol puro (700 µL), e mantido no freezer -80°C por 1 hora.

Decorrido esse tempo, o material foi centrifugado a 18.000 xg por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de Etanol_{DEPC} 70% (EtOH_{DEPC} 70%) gelado e centrifugado a 18.000xg por 10 minutos. Novamente

o sobrenadante foi descartado, e os microtubos foram mantidos abertos no gelo para evaporação total do etanol por cerca de 15 minutos. Após a secagem, o precipitado foi solubilizado em 500 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e precipitado em 500 μL de cloreto de lítio 4 M ($\text{LiCl}_{\text{DEPC}}$) a 4°C *overnight* no gelo na geladeira. Decorrido esse período a solução foi centrifugada a 18.000 xg por 20 minutos a 4°C e o precipitado (pellet) solubilizado em 450 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. Após a completa dissolução foi adicionado acetato de sódio 2 M pH 4,8 ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) (50 μL) e etanol absoluto (800 μL). A mistura foi mantida por freezer -80°C por 30 minutos e centrifugada posteriormente a 18.000 xg por 20 min a 4°C.

O precipitado foi lavado com 500 μL de $\text{EtOH}_{\text{DEPC}}$ 70% e em seguida centrifugado a 18000 xg por 10 minutos. Após a centrifugação, o etanol foi pipetado para não desfazer o precipitado e os microtubos mantidos abertos no gelo para evaporação total do etanol por cerca de 15 minutos. Após a secagem, o precipitado foi solubilizado com $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ (30 μL), transferido para microtubo de 500 μL , e armazenado a -80°C.

Após a extração, para controle da integridade do RNA, foi realizada a eletroforese em gel de agarose (1,5%). Para o preparo da agarose, 0,75g foi dissolvido no micro-ondas em 50mL de tampão de Tris Base – Ácido Acético Glacial – EDTA dissódico (TAE) 0,5x. Em seguida foi esfriado em água corrente e vertido na cama de eletroforese para solidificação. Após a solidificação da agarose, o gel foi introduzido na cuba de eletroforese contendo uma solução de TAE 0,5x. Em um parafilm, foram pipetados 1 μL marcador com peso molecular conhecido de 1kb, 0,5 μL tampão (load ou buffer), 0,5 μL gel red, e 1 μL amostra, tendo sido homogeneizados: tampão + gel red + amostra; tampão + gel red + marcador, e transferidos para as pocinhas do gel na cuba de eletroforese. O equipamento foi programado para a voltagem de 135v por durante 15 minutos. Decorrido esse tempo, o gel foi transferido para o transiluminador para visualização das amostras marcadas com gel red, utilizando a luz UV.

Verificada a integridade do RNA, o RNA total foi quantificado espectrofotometricamente através do NanoDrop One© da Thermo Scientific. A qualidade do RNA extraído foi verificada por meio das relações $A_{260/230}$ capaz de detectar reagentes orgânicos utilizados na lise química e $A_{260/280}$ capaz de detectar contaminação por proteínas, devendo esta razão estar entre 1,9 e 2,1, além de obter a concentração do RNA.

b) Síntese de cDNA e PCR em tempo real

Após a quantificação de RNA, foi realizada a síntese de cDNA. Amostras de RNA foram diluídas em $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ para uma concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para padronização das amostras. Em seguida, foram tratados 2 μg de RNA total com DNase I (Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante e a síntese de cDNA foi realizada com o kit “*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits 200 reactions*” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho “StepOne Plus Real-Time PCR System” (Applied Biosystems) utilizando o kit “*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 contendo 96 poços, da seguinte maneira: 5 μL de SYBR™ Green PCR Master Mix 2X, 3 μL da mistura de *primers forward+reverse* (concentração final na reação de 0,9 μM), 2 μL da reação de síntese de cDNA diluída 1:10 (amostra). A placa foi selada com *MicroAmp™ optical adhesive film (Applied Biosystems)* e centrifugada por 1 minuto a 300 rpm, agitada por 1 minuto em agitador de placas e centrifugada por 3 minutos novamente a 300 rpm a 25°C, e levada para o aparelho de PCR em tempo real.

Cada placa de reação foi realizada da seguinte maneira: 95°C por 10 minutos, passo requerido para ativação da DNA polimerase AmpliTaq Gold®; e 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos para ocorrer a desnaturação e 60°C por 1 minuto para ocorrer o

anelamento/extensão e a coleta da fluorescência. Uma curva de dissociação (“*melting curve*”), padrão do aparelho, foi adicionada à programação para identificar possíveis amplificações inespecíficas dos primers testados.

c) Genes avaliados neste estudo

Foi realizada uma análise preliminar com todas as amostras para selecionar o gene candidato para normalização da expressão gênica de acordo com a sua estabilidade de expressão. Os genes de referência (controle endógeno) avaliados foram ubiquitina (UBC), ubiquitina 5 (UBQ5) e actina (ACT), genes comumente utilizados para normalização nas análises de expressão em arroz. Após o término da reação foram obtidos os valores de C_t (*threshold cycle*) e transformados para uma escala linear de expressão quantitativa (2^{-C_t}). Para determinar o melhor gene de referência (controle endógeno) foi utilizado o software Normfinder, uma extensão gratuita disponível para Excel (ANDERSEN et al., 2004), e selecionado o gene de referência mais estável para normalizar o cálculo da expressão gênica relativa.

De acordo com a Tabela 2, o gene ubiquitina (UBQ5) foi o gene de referência que apresentou menor variação entre os diferentes tratamentos analisados, sendo, portanto, o mais estável e escolhido para normalização dos cálculos. A expressão gênica foi calculada pelo método do delta-delta- C_t comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2. Valores de estabilidade dos genes de referência obtidos através da análise realizada no software Normfinder. Ubiquitina (*OsUBC*), ubiquitina 5 (*OsUBQ5*) e actina (*OsACT*).

Genes de referência	Valor de estabilidade
<i>OsUBC</i>	0,869
<i>OsUBQ5</i>	0,573
<i>OsACT</i>	0,665

Na Tabela 3 foram elencados os genes avaliados neste estudo, contendo as sequências dos genes de referência e os genes alvos, tendo sido analisados 14 genes para os cálculos de expressão.

Tabela 3. Sequências dos primers forward e reverse usados nas reações de RT-PCR semiquantitativa em tempo real.

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>OsUBC</i>	5'-CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA-3'	5'-AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGT-3'
<i>OsUBQ5</i>	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3'	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'
<i>OsACT</i>	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGG-3'	5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGC-3'
<i>BASI</i>	5'-GTCTGCCCCGACCGAGATTAC-3'	5'-CCAAGCCCACCAGATTCCT-3'

Continua...

Continuação da **Tabela 3.**

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>GPX</i>	5'-CTGCGTTGCATTGAGCACTT-3'	5'-GGGGCAAAGTGATGCAGTAAG-3'
<i>PHS1</i>	5'-TTACCAAGGCGTTCGCTGAT-3'	5'-ACATCACCACACTGCCACAA-3'
<i>PRX112</i>	5'-ACATCTCGCCCTTGACTGGA-3'	5'-CAATGTCGGGGCCTAGCTTT-3'
<i>CuZnSO₄</i>	5'-AGATTCCAAACCAGCAGGAGT-3'	5'-AAGCACAACAACAGCCTTCAC-3'
<i>TOR</i>	5'-GGCTGAATGGATGAGGCACT-3'	5'-CTCACGACCAACAGAAGGCT-3'
<i>SEC1B</i>	5'-CGAAGCTGAAGATGCTAACTGC-3'	5'-CGTAGCAATGGGTTTCTTACCAA-3'
<i>TOM1</i>	5'-TACAGCAACAGCCAAGGGAG-3'	5'-TGTAGAGTAGGGCGAGCTGT-3'
<i>HXK5</i>	5'-CAAGATGCCAAAAGACGGCA-3'	5'-CCACCGAAGACGAGACATCA-3'
<i>IAA11</i>	5'-AGCTGAGAGATGACCTGGAGT-3'	5'-AAGGCCAATGGCTTCAGACC-3'
<i>OsA7</i>	5'-TCCAACACGCTCTTCAACGA-3'	5'-CCTTCAGCTTACCACCGAT-3'
<i>OsNRT2.1</i>	5'-CCACGGTGCAAGTCTCAAGT-3'	5'-GTCGCAGAATTGTTTACGCCT-3'
<i>OsCPK7</i>	5'-TAGCCCTCGAAGAAGCAAGG-3'	5'-TCCCCAACCTTACGAGACCT-3'
<i>OsTPC1</i>	5'-CGGAGCCCACTGTTTGAGTA-3'	5'-TCTTGCCACACTTTCTGCGA-3'

4.4.5 Análise estatística

Foram verificados os pressupostos para distribuição normal dos tratamentos através do teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e homogeneidade das variâncias através do teste de Levene's ($p > 0,05$). As diferenças significativas ($p\text{-value} \leq 0,05$) entre os tratamentos foram calculadas usando a análise de variância (ANOVA) de uma via e o teste post-hoc de Tukey. Os efeitos das variáveis foram verificados pelo teste F (5% de probabilidade). Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software Real Statistics, um suplemento gratuito para Excel.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Time-course dos inibidores

Para validar o modelo experimental da aplicação combinada entre AH + inibidor foi conduzido o experimento de *time-course* para verificar o efeito do inibidor ao longo do tempo. A partir dos resultados foi possível verificar que após 72h da aplicação do inibidor seu efeito ainda é detectável nas plantas, com exceção do inibidor TIRON, em que há um restabelecimento do crescimento da planta devido a redução do seu efeito.

Foi possível observar o efeito inibitório do SB sobre as características morfológicas das plantas de arroz. A aplicação de ambos os tratamentos resultou em decréscimo na biomassa da parte aérea, enquanto na biomassa radicular ocorreu uma redução significativa somente nos tempos de coleta de 48 h e 72 h para o tratamento com ausência do inibidor (Apêndice 36a-b). Esses resultados sugerem que uma leve inibição na produção de HO* interfere no crescimento das plantas.

Quando analisada a morfologia radicular foi possível observar redução em todos os parâmetros, com exceção do diâmetro, que ocorre um aumento comparado ao controle. Esse aumento do diâmetro confere um maior espessamento das raízes, que pode ter contribuído para o aumento da biomassa radicular no tratamento constante contendo SB. Para o parâmetro volume também é possível perceber que o tratamento com ausência do inibidor não apresenta diferença comparado ao controle, que pode ser devido a redução do efeito inibitório do SB (Apêndice 36f).

Plantas tratadas com inibidor TIRON não apresentaram diferença significativa para biomassa radicular quando comparadas ao controle, com exceção da coleta no ponto 0 h, onde se observa uma redução na biomassa. Enquanto na parte aérea é possível notar que somente o tratamento de 24 h não apresentou diferença significativa (Apêndice 37a-b).

Na morfologia radicular ocorreu uma redução em todos os parâmetros analisados, com exceção do diâmetro, onde ocorre um aumento comparado ao controle. Além disso, quando analisada a área de superfície, apenas na coleta de 72 h observa-se que não há diferença entre o controle e o tratamento com ausência do inibidor, sendo observado o mesmo para o número de pontas. Esse fato pode ser explicado pela redução do efeito inibitório do TIRON que foi aplicado aos 6 DAG (Apêndice 37c-h).

O efeito inibitório do peróxido de hidrogênio pelo inibidor DMTU foi evidente em todas as características morfofisiológicas analisadas em plantas de arroz. A exceção ocorreu somente para o diâmetro, sendo observado um aumento significativo, porém não foi suficiente para influenciar no aumento da biomassa radicular. Seu efeito inibitório foi evidenciado de forma clara na imagem apresentada no Apêndice 38i, o que significa que o efeito inibitório do DMTU não reduziu no intervalo analisado (entre 6 DAG a 12 DAG).

A aplicação do inibidor DPIC resultou em redução em todas as características morfofisiológicas, com exceção do diâmetro que ocorreu um aumento significativo nos tratamentos com DPIC em todos os pontos de coletas. Quando analisado o efeito entre os tratamentos de presença e ausência do inibidor observa-se que no último ponto de coleta, em 72 h (12 DAG), ocorreu uma diferença significativa em todos os parâmetros analisados, sendo verificado um leve aumento no tratamento com ausência do inibidor (Apêndice 39), que pode ser um indicativo de uma leve redução do efeito inibitório do DPIC, porém não foi suficiente para retomar o estímulo do crescimento radicular.

A inibição da ação da auxina foi evidente em todos os parâmetros avaliados, com exceção do diâmetro onde ocorre um aumento significativo, mas é possível notar que somente no tratamento de 72 h não foi observada diferença significativa entre o controle e o tratamento com ausência do inibidor PCIB (Apêndice 40d). Observa-se uma diferença significativa entre

os tratamentos com inibidor resultando em um leve aumento no tratamento com ausência do inibidor para a morfologia radicular (Apêndice 40c, e-h), sendo um indicativo também de uma leve redução do efeito inibitório do PCIB, mas que não foi suficiente para retomar o crescimento radicular.

Decorrido todos os tempos de coleta, observa-se um efeito inibitório significativo nas características morfofisiológicas após a aplicação do inibidor da biossíntese de ABA. E da mesma forma que para os demais inibidores avaliados, ocorre um aumento no diâmetro das raízes sob efeito do inibidor FLD quando comparado ao controle, sendo significativo somente nos tempos de 48 h e 72 h (Apêndice 41d). O efeito inibitório fica evidenciado na imagem do Apêndice 41i, em que ambos os tratamentos ocasionam uma drástica redução no sistema radicular.

Estes resultados confirmam que a escolha dos inibidores para este estudo, bem como, as concentrações determinadas nas curvas de calibração, foi adequada para o modelo experimental proposto neste estudo, em que busca elucidar os mecanismos de sinalização envolvidos na promoção do crescimento de raízes tratadas com AH.

4.5.2 Aplicação de AH ocasiona melhorias nas características morfológicas de plantas de arroz

Em todos os ensaios realizados foram verificados o efeito bioestimulante do AH sobre o crescimento radicular, e isso foi verificado que está associado a diferentes eventos que serão descritos a seguir.

Para elucidar o papel desempenhado pelo AH no acúmulo de ERO nas raízes, foi aplicado junto com AH um inibidor de HO^* (SB). Os resultados mostram que a adição do inibidor de HO^* (SB) apresentou efeito semelhante ao do AH sozinho em biomassa radicular, comprimento, área de superfície, volume e número de pontas e comprimento de raiz lateral. Porém é importante notar que ao associar AH e SB este foi capaz de reduzir o efeito bioestimulante do AH para todos os parâmetros analisados, exceto o diâmetro (Figura 8), podendo indicar uma possível rota preferencial no mecanismo de ação do AH. Os resultados apresentados estão de acordo com os resultados obtidos no *time-course* (Apêndice 36), em que o efeito inibitório do SB ainda é detectável após 72h de aplicação.

Para elucidar o papel desempenhado pelo AH no acúmulo de ERO nas raízes, também foi aplicado junto com AH um inibidor de O_2^{-*} (TIRON). A aplicação nas raízes de um inibidor de superóxido associado ao AH apresentou resultados semelhantes ao AH aplicado sozinho em biomassa radicular, área de superfície, volume e número de pontas. Por outro lado, também foi possível notar que o incremento ocasionado pelo AH no sistema radicular foi inibido pela aplicação posterior de TIRON (AH+TIRON) para todos os parâmetros avaliados, com exceção do diâmetro (Figura 9), indicando também uma possível rota preferencial no mecanismo de ação do AH.

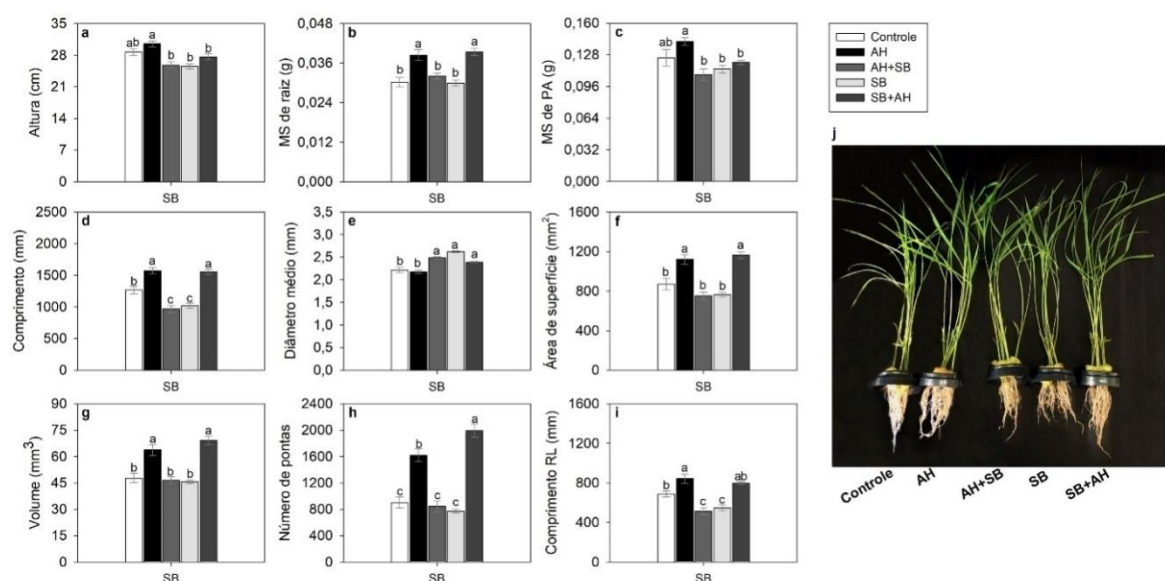


Figura 8. Efeito da aplicação combinada entre AH e SB, inibidor de HO*. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e SB. (d-i) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e SB. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (j) Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. SB: benzoato de sódio, HO*: hidroxila, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

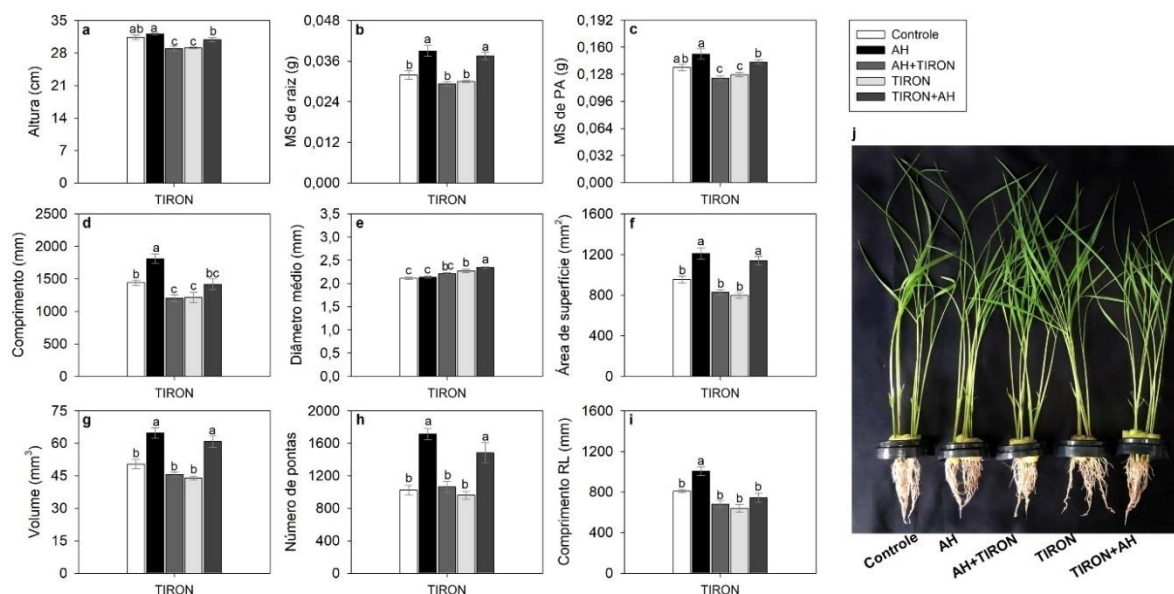


Figura 9. Efeito da aplicação combinada entre AH e TIRON, inibidor de O₂*. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e TIRON. (d-i) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e TIRON. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (j) Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. TIRON: ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, O₂*: superóxido, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

Para elucidar o papel desempenhado pelo AH no acúmulo de ERO nas raízes, também foi aplicado junto com AH um inibidor de H_2O_2 (DMTU) nos experimentos. Os resultados mostram que a adição do inibidor de peróxido de hidrogênio foi capaz de reduzir o efeito bioestimulante do AH em ambas as combinações analisadas (AH+DMTU e DMTU+AH) para todos os parâmetros analisados, com exceção do diâmetro (Figura 10). Confirmando, portanto, que a atuação do H_2O_2 realmente foi inibida pelo DMTU, indicando também uma possível rota preferencial no mecanismo de ação do AH.

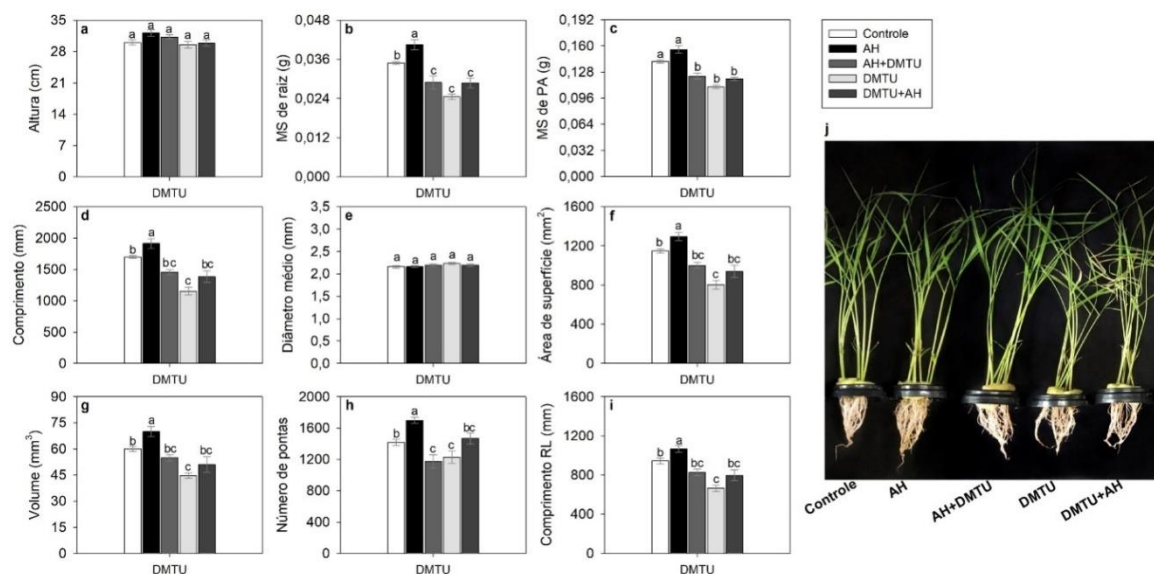


Figura 10. Efeito da aplicação combinada entre AH e DMTU, inibidor de H_2O_2 . As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e DMTU. (d-i) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e DMTU. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (j) Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. DMTU: N N'-Dimethylthiourea, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

A aplicação de DPIC, um inibidor NADPH oxidase de membrana, resultou na inibição do efeito estimulatório ocasionado pelo AH em ambas as combinações analisadas (AH+DPIC e DPIC+AH) (Figura 11), porém é possível notar que ocorreu um estímulo no crescimento da parte aérea no tratamento AH+DPIC, bem como, resultou em um aumento do diâmetro. O efeito de NADPH oxidase realmente foi reduzido pelo DMTU, indicando também uma possível rota preferencial no mecanismo de ação do AH.

Para determinar a relevância da atuação do AH nas vias hormonais, foi aplicado junto com AH um inibidor de ação da auxina (PCIB). A aplicação nas raízes do PCIB ocasionou uma redução das características morfológicas através da inibição do efeito do AH, tendo sido observado em ambas as combinações (AH+PCIB e PCIB+AH) (Figura 12). Estes resultados mostram que tanto o tratamento de PCIB quanto o combinado (PCIB+AH) possuem um efeito mais negativo sobre o crescimento da parte aérea e radicular (Figura 12j). Estes resultados podem indicar em parte o efeito protetivo ocasionado pela aplicação do AH (AH+PCIB), além de indicar também uma possível atuação na via da auxina.

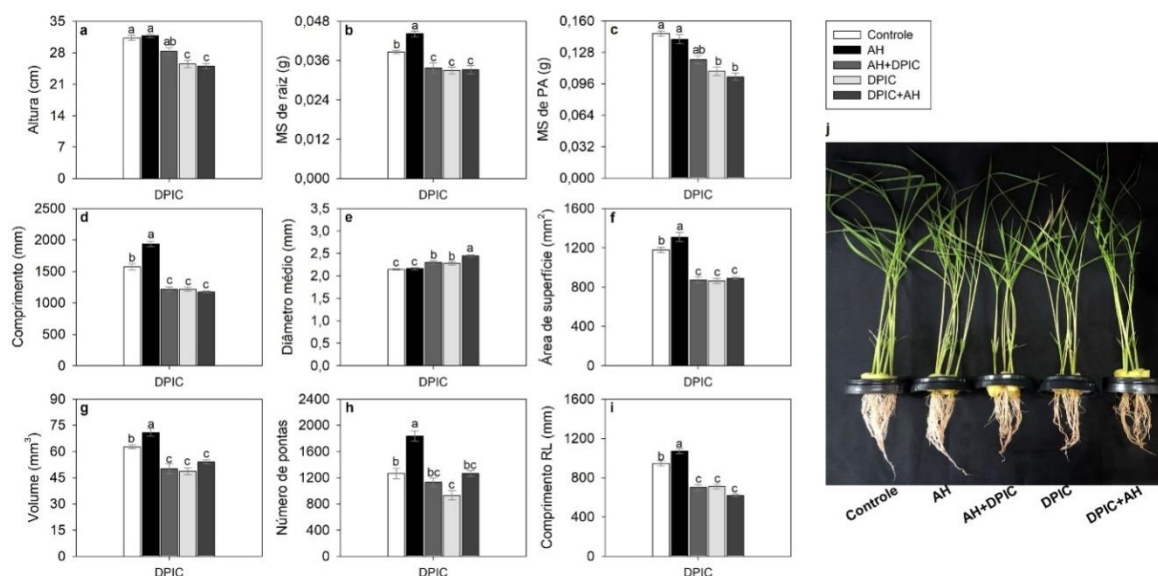


Figura 11. Efeito da aplicação combinada entre AH e DPIC, inibidor de NADPH oxidase. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e DPIC. (d-i) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e DPIC. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (j) Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. DPI: Diphenyleneiodonium chloride, NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

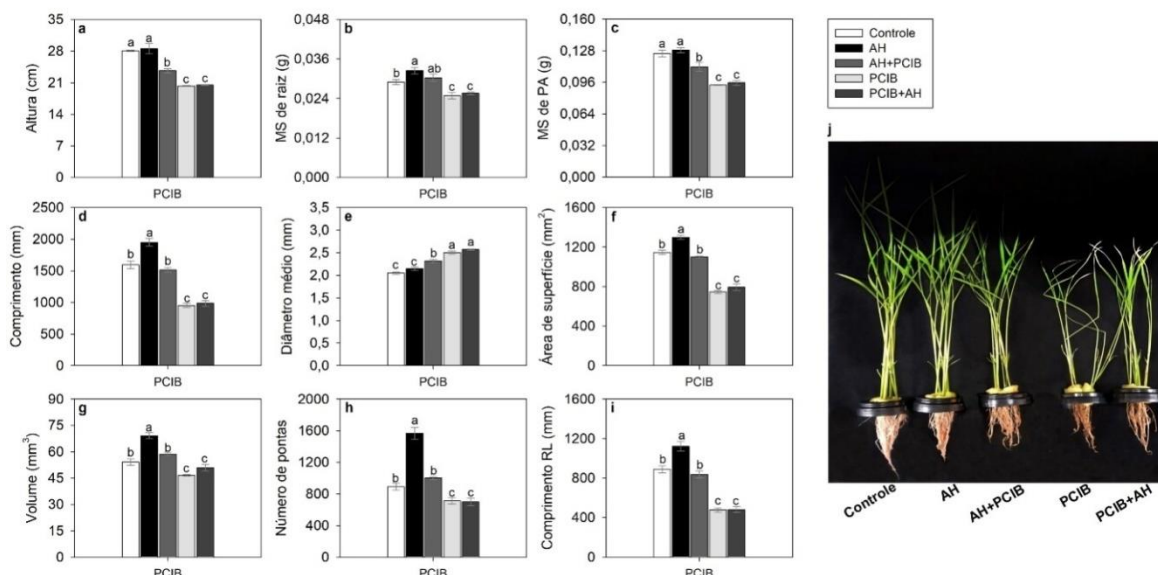


Figura 12. Efeito da aplicação combinada entre AH e PCIB, inibidor da auxina. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e PCIB. (d-i) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e PCIB. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (j) Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. PCIB: Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

Para determinar a relevância da atuação do AH nas vias hormonais, foi aplicado junto com AH um inibidor da biossíntese de ABA (FLD). A aplicação do FLD nas raízes resultou na redução das características morfológicas através da inibição do efeito do AH, tendo sido observado em ambas as combinações (AH+FLD e FLD+AH) para todos os parâmetros analisados, exceto para o diâmetro (Figura 13). Além disso, o tratamento sozinho de FLD ou combinado (FLD+AH) tem um efeito mais negativo sobre o crescimento da parte aérea e radicular. Estes resultados podem indicar em parte o efeito protetivo ocasionado pela aplicação do AH (AH+FLD), além de indicar também uma possível atuação na via da biossíntese de ABA.

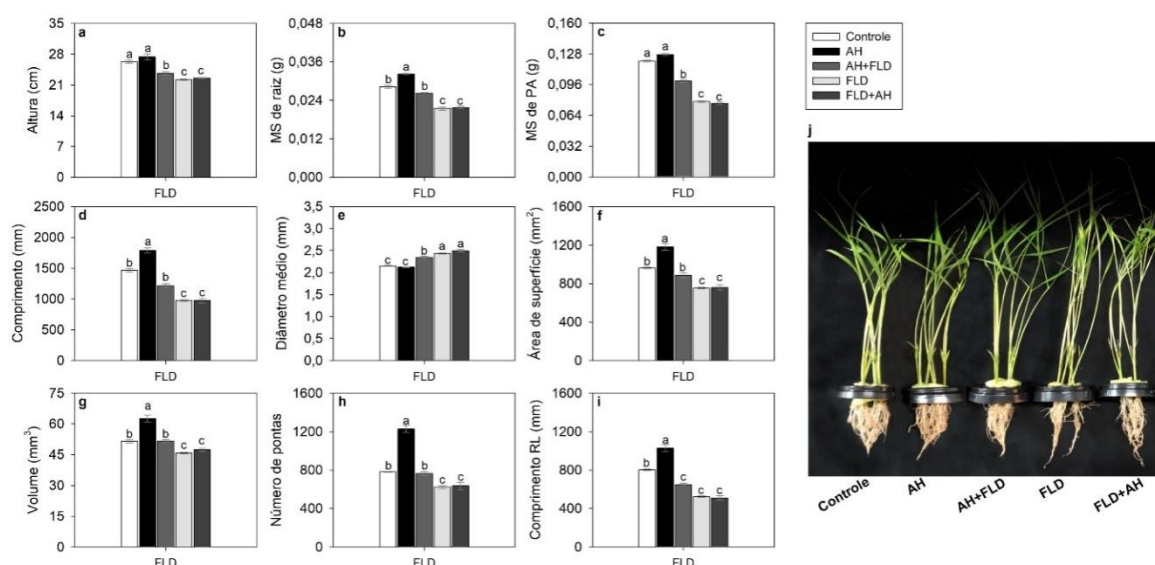


Figura 13. Efeito da aplicação combinada entre AH e FLD, inibidor de ABA. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-c) Crescimento de plantas de arroz durante a exposição ao AH e FLD. (d-i) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH e FLD. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. (j) Plantas crescidas nos diferentes tratamentos. FLD: fluridone, ABA: ácido abscísico, AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

4.5.3 AH contribui para aumento de expressão de genes relacionados as vias de sinalização de ERO que são essenciais na promoção do crescimento radicular

Em adição aos resultados das características morfofisiológicas de plantas de arroz que são melhoradas devido ao efeito estimulatório do AH, também foi realizada a análise da expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio).

Plantas tratadas com AH apresentaram um aumento expressivo de BAS1 (2-Cys peroxirredoxina) (Figura 14), GPX (glutathiona peroxidase) (Figura 15), PRX112 (isoforma de peroxidase) (Figura 16) e CuZnSOD1 (superóxido dismutase [Cu-Zn]) (Figura 17), que são genes relacionados a enzimas antioxidantes que desempenham um papel na proteção contra estresse oxidativo.

Em relação ao possível papel do AH em aumentar a atividade das enzimas antioxidantes, os resultados mostram que a adição dos diferentes inibidores de ERO foi capaz de reduzir o efeito do AH na ativação do sistema antioxidativo em raízes de arroz. Estes resultados indicam que o efeito estimulatório do AH parece ser dependente da produção de HO^* , O_2^{*-} e H_2O_2 , além de indicar o envolvimento das ERO nos mecanismos de respostas induzidas pela aplicação de AH, sendo um indicativo de um “estresse benéfico” para a planta, o chamado “euestresse”.

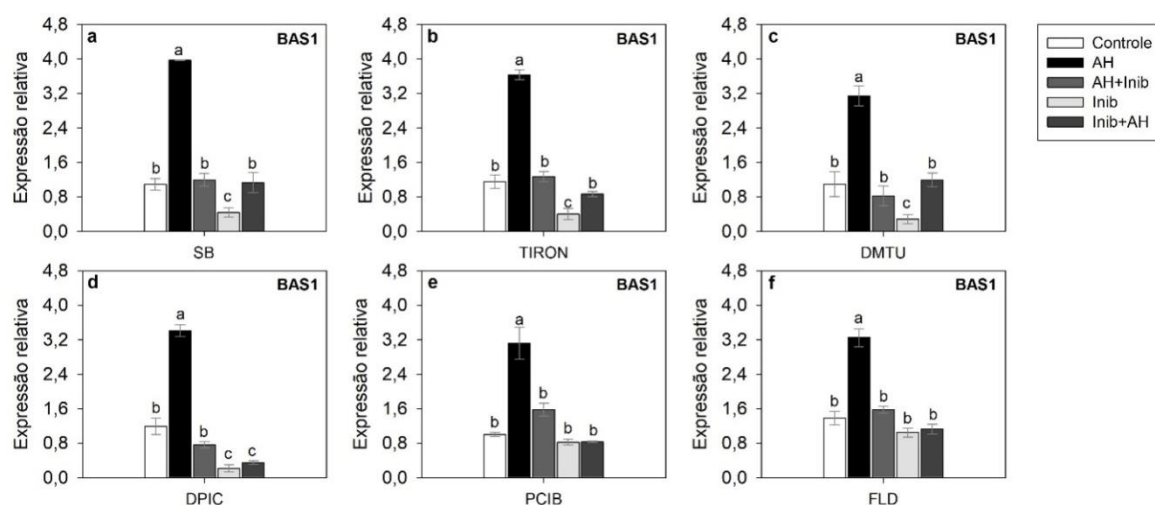


Figura 14. Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene BAS1 relacionado a enzimas antioxidantes. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

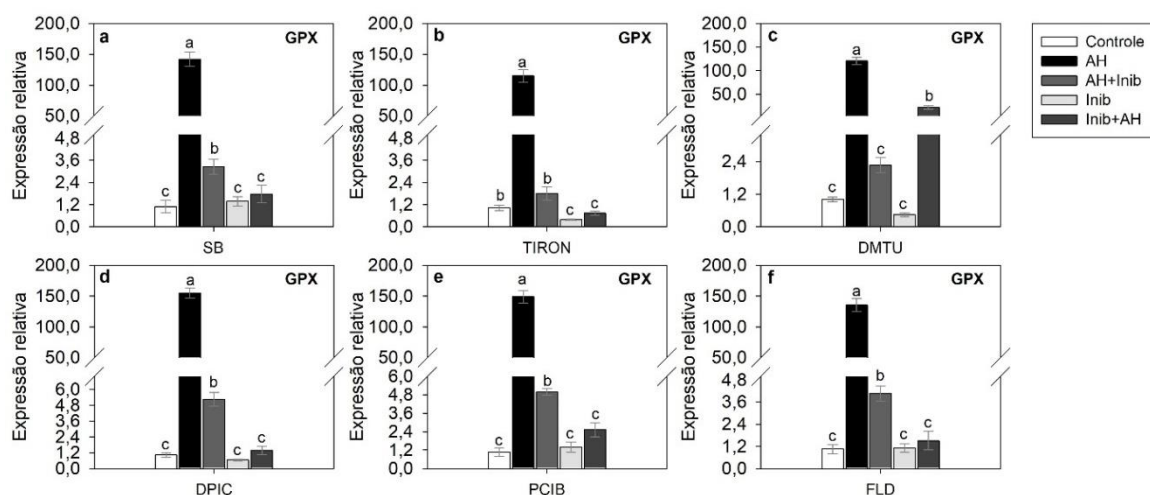


Figura 15. Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene GPX relacionado a enzimas antioxidantes. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

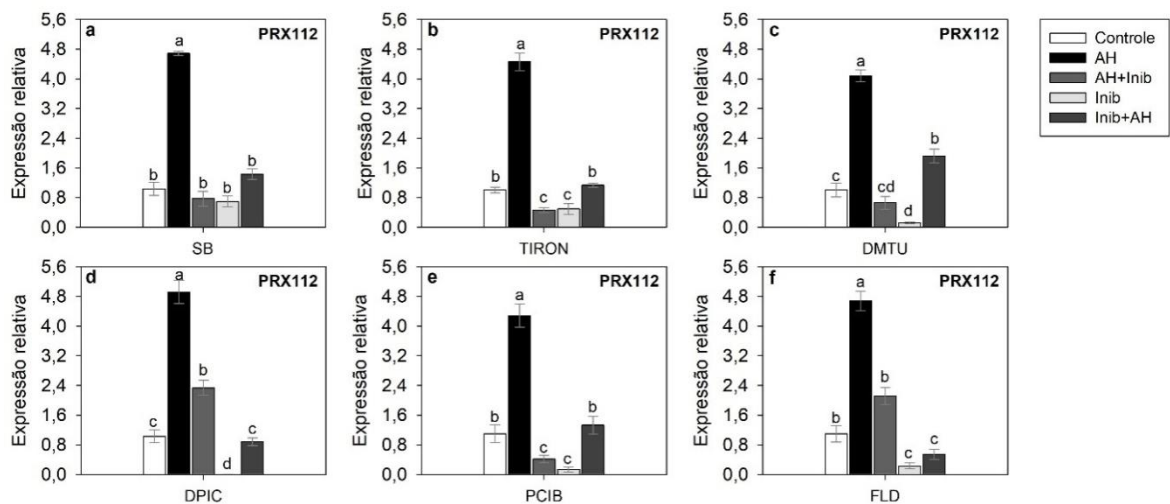


Figura 16. Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene PRX112 relacionado a enzimas antioxidantes. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

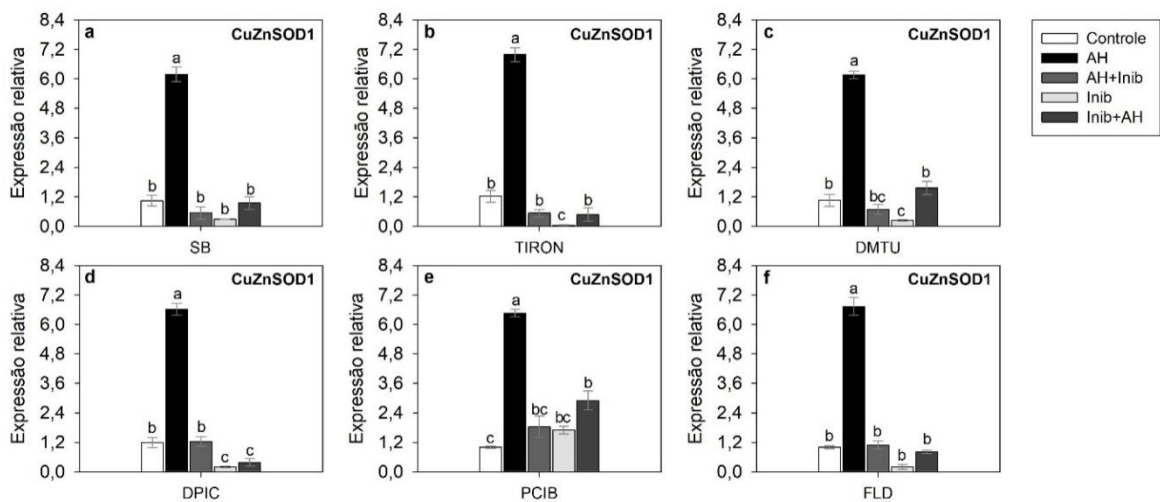


Figura 17. Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene CuZnSOD1 relacionado a enzimas antioxidantes. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

4.5.4 AH possui ação sobre o crescimento radicular e é regulado através de vias de sinalização hormonal

O estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão de genes relacionados as vias de sinalização hormonal. Em adição aos resultados das características morfofisiológicas, plantas de arroz tratadas com AH apresentaram um aumento expressivo de TOR (Target of Rapamycin) (Figura 18), essencial na transdução de sinal da auxina e promoção da biossíntese do ABA, e IAA11 (ácido indol-3-acético) (Figura 19), que está diretamente ligado as vias de sinalização da auxina.

Em relação ao possível papel do AH em afetar a regulação de genes relacionados as vias de sinalização hormonal, os resultados indicam que a adição dos diferentes inibidores hormonais (PCIB e FLD) foi capaz de reduzir o efeito do AH sobre a expressão dos genes, sendo importante notar que nos tratamentos com inibidores de ERO também ocorreu uma redução na expressão. Estes resultados sugerem que a ação do AH é regulado por vias de sinalização hormonal e existe uma complexa interação com as vias de sinalização das ERO, sendo responsáveis pela resposta fisiológica do AH no estímulo de crescimento radicular.

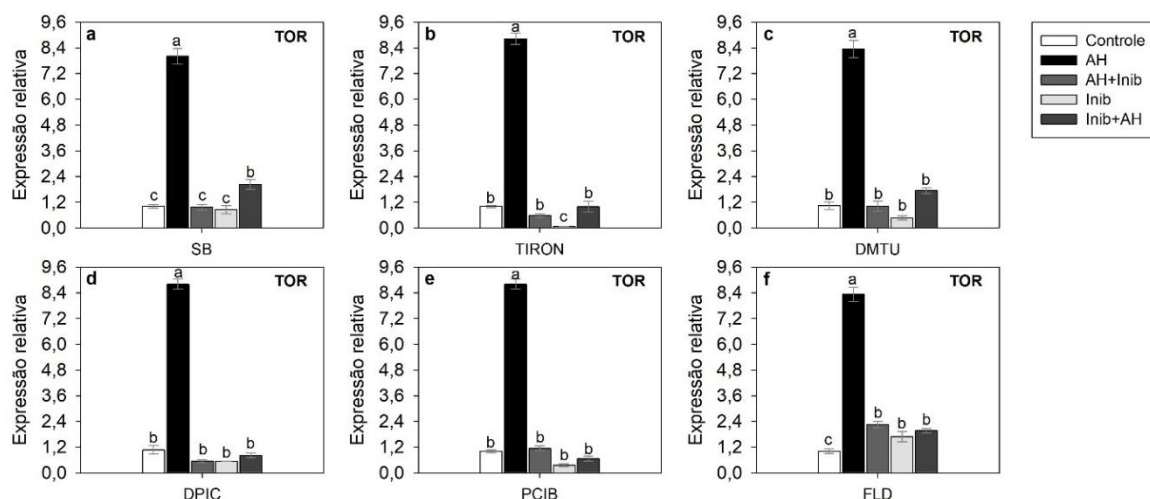


Figura 18. Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene TOR relacionado a regulação do crescimento radicular. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihidroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

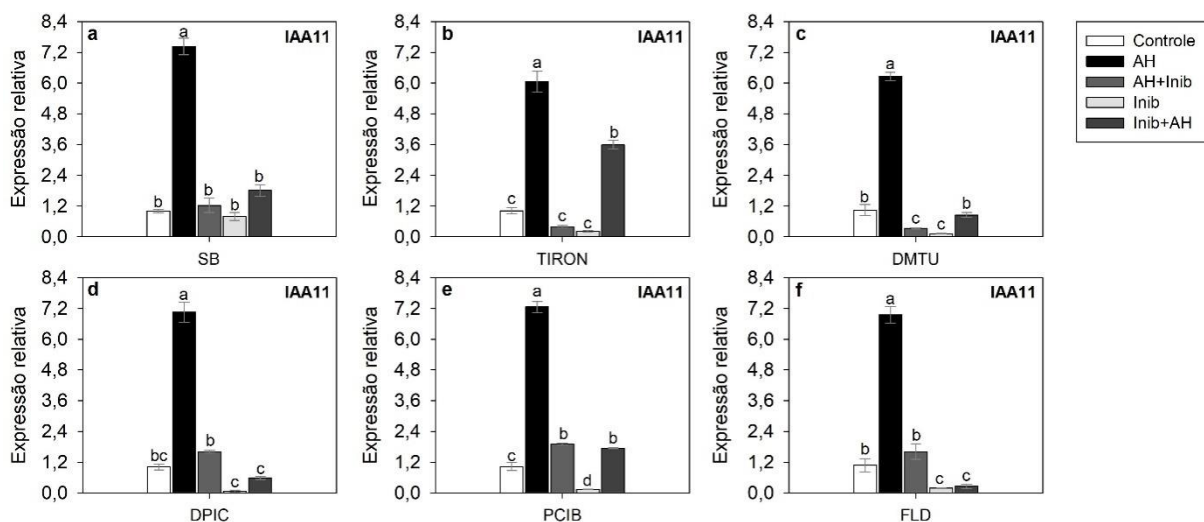


Figura 19. Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene IAA11 relacionado a regulação do crescimento radicular. **(a)** SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). **(b)** TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{*}: superóxido). **(c)** DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). **(d)** DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). **(e)** PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). **(f)** FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

Em linha com os resultados encontrados neste estudo, foi encontrada uma expressão significativa dos genes OsCPK7 (Figura 20) e OsTPC1 (Figura 21) em plantas tratadas com AH, por outro lado foi possível notar o efeito inibitório ocasionado pelos diferentes inibidores.

O mesmo padrão foi observado para o gene OsA7 (Figura 22), em que apresenta uma elevada indução no tratamento com AH, e por outro lado foi possível notar o efeito inibitório ocasionado pelos diferentes inibidores.

Também foi avaliado o gene HXK5 (Figura 23), sendo parte integrante do metabolismo de carboidratos, que possui papel no metabolismo primário, e também apresentou uma redução na sua expressão em plantas tratadas com inibidor previamente ou sucessivamente.

Outros genes destaques são TOM 1 (Figura 24) e SEC1B (Figura 25) em que ambos estão envolvidos com o transporte de vesículas que regulam o alongamento e divisão celular. Plantas tratadas com AH apresentaram uma elevada expressão desses genes.

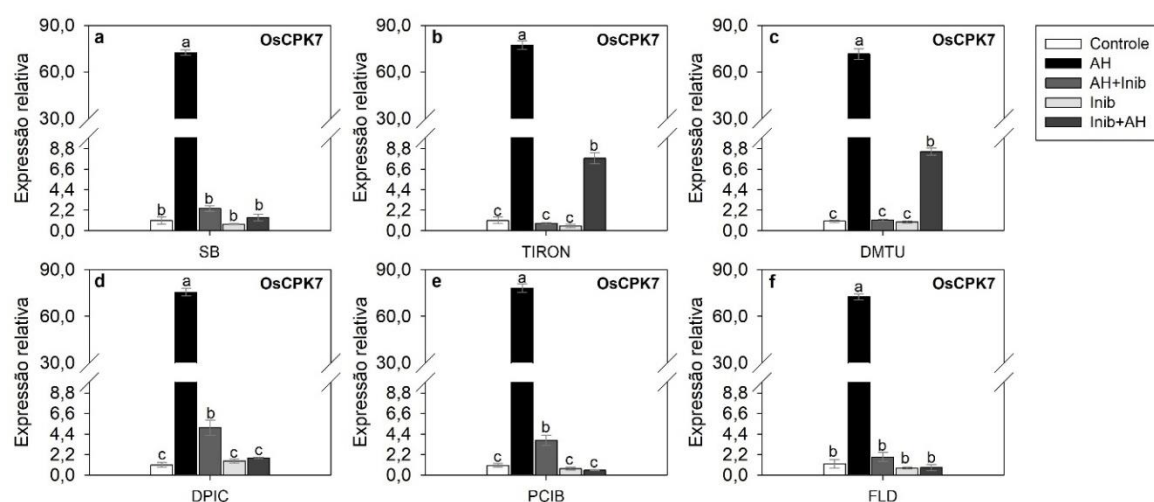


Figura 20. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene OsCPK7. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

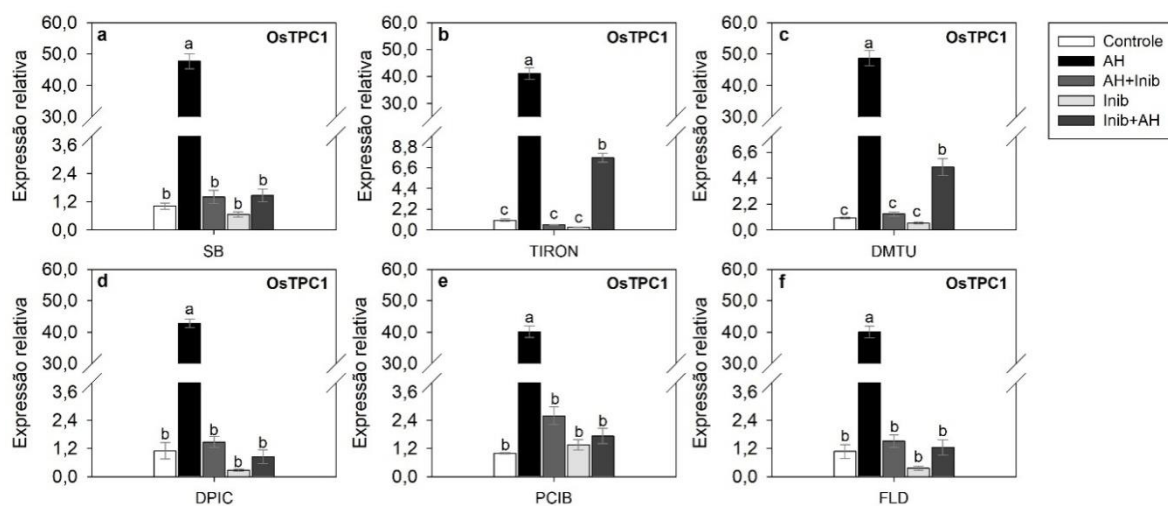


Figura 21. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene OsTPC1. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

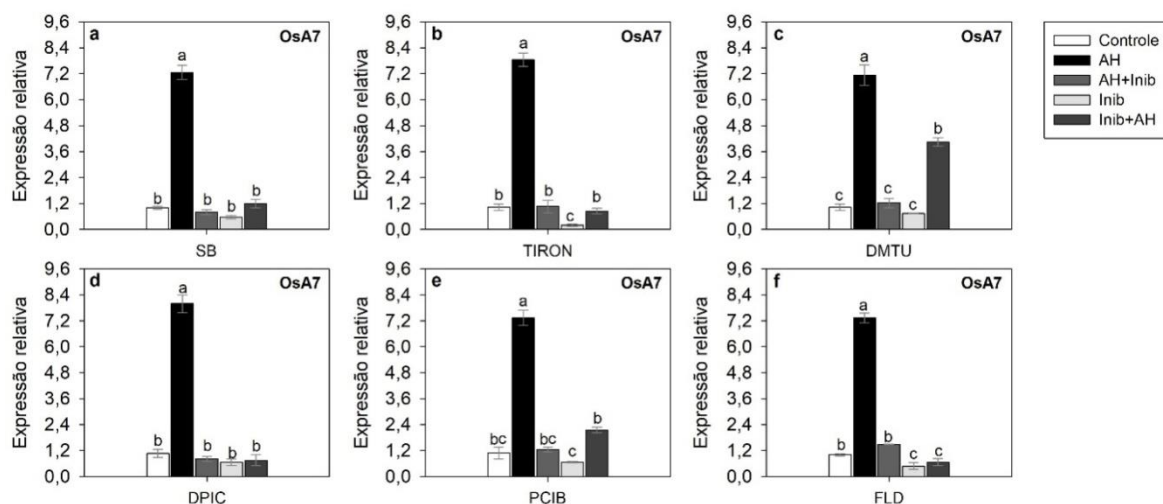


Figura 22. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene OsA7. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

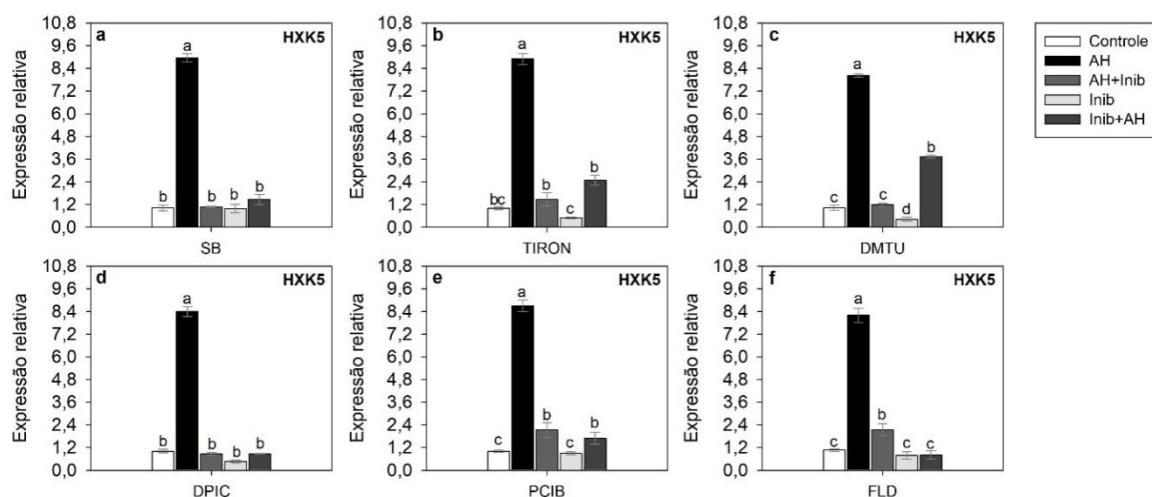


Figura 23. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene HXK5. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

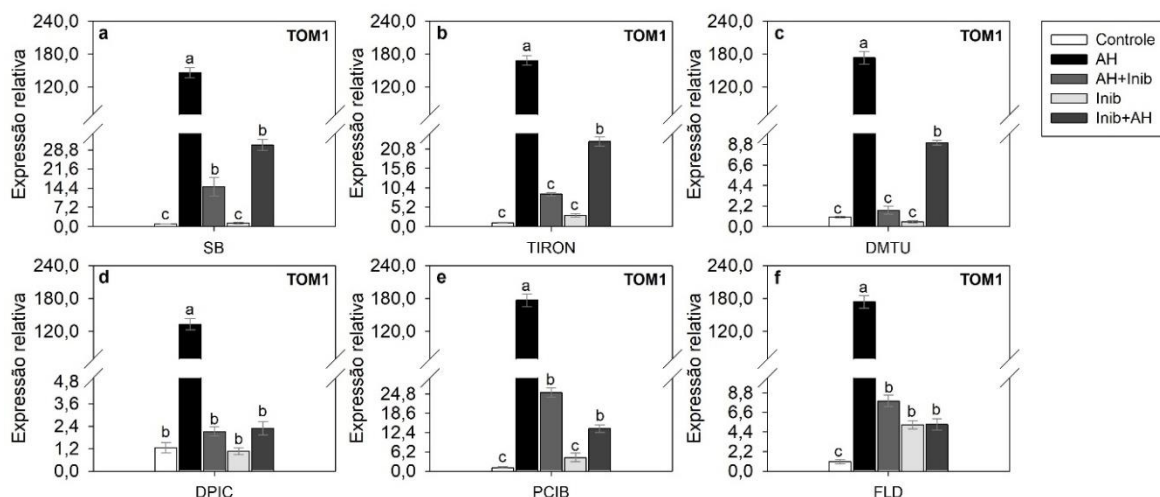


Figura 24. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene TOM1. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

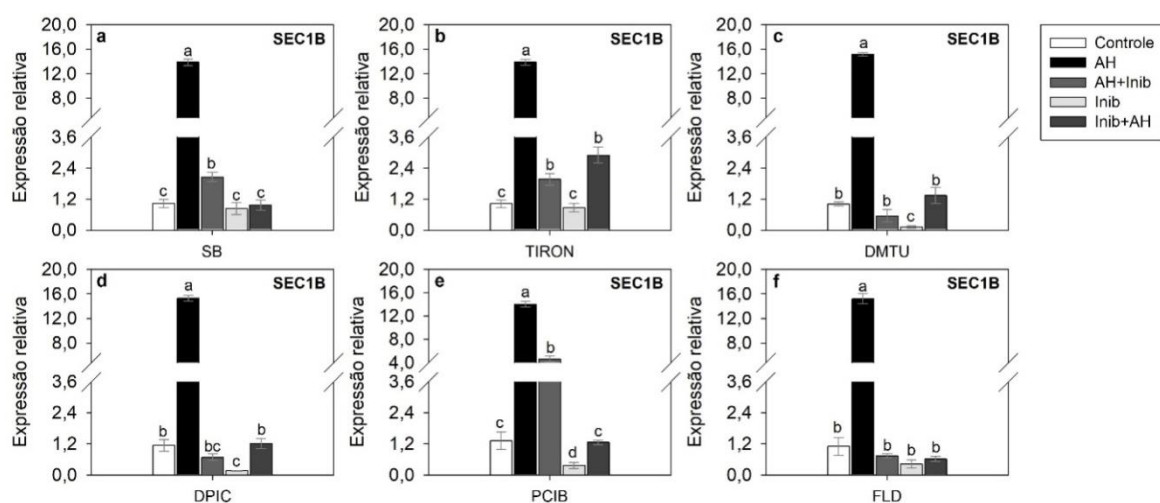


Figura 25. Estímulo do desenvolvimento radicular envolve aumento na expressão do gene SEC1B relacionado a regulação do crescimento radicular. (a) SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). (b) TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{*}: superóxido). (c) DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). (d) DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). (e) PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). (f) FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

O gene OsNRT2.1 é um transportador de nitrato amplamente abordado em estudos de absorção de nitrogênio pelas plantas devido a sua relação na regulação do crescimento radicular. Plantas tratadas com AH também apresentaram uma elevada expressão (Figura 26). E assim

como o OsNRT2.1, o gene PHS1 (Figura 27) também possui relação na regulação do crescimento radicular, porém regula mais especificamente o crescimento das pontas radiculares. O mesmo padrão de expressão gênica foi observado, em que plantas tratadas com AH apresentaram uma expressão elevada do gene PHS1.

Uma das características mais evidentes observadas neste estudo que após a aplicação de AH ocorre uma indução no número de pontas. O número de pontas possui uma relação direta com a área de superfície, onde maior número de pontas indica uma maior área exploratória pelo sistema radicular. Com base na literatura, possivelmente esse fato pode ser explicado devido a expressão dos genes mencionados, com destaque para TOR, SEC1B, PHS1 e OsNRT2.1, em plantas tratadas com AH, que possui relação na regulação do crescimento das pontas radiculares, sendo uma importante característica a ser avaliada nos estudos de morfologia radicular.

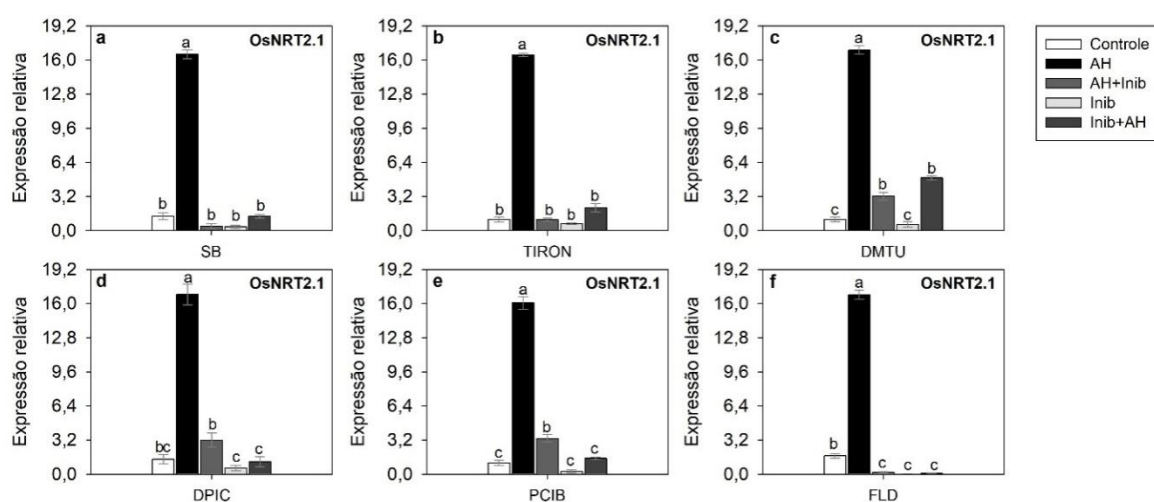


Figura 26. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene OsNRT2.1. **(a)** SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^{*}: hidroxila). **(b)** TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O₂^{-*}: superóxido). **(c)** DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio). **(d)** DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). **(e)** PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). **(f)** FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

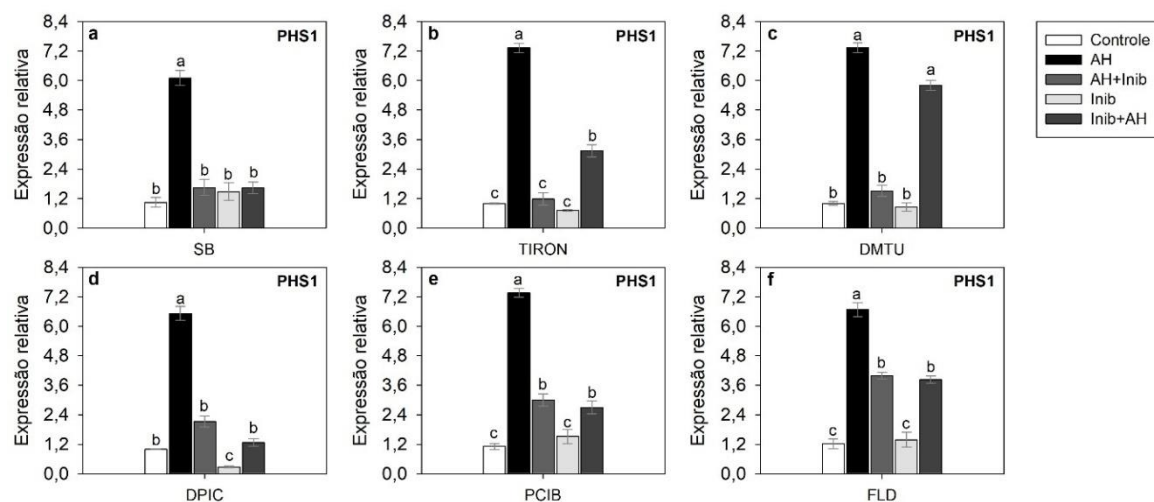


Figura 27. AH afeta o crescimento radicular pela interação com o gene PHS1. **(a)** SB (benzoato de sódio, inibidor de HO^* : hidroxila). **(b)** TIRON (ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, inibidor de O_2^* : superóxido). **(c)** DMTU (N N'-Dimethylthiourea, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio). **(d)** DPIC (Diphenyleneiodonium chloride, inibidor de NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). **(e)** PCIB (Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, inibidor da auxina). **(f)** FLD (fluridone, inibidor de ABA: ácido abscísico). As plantas foram coletadas para análise aos 12 DAG (dias após a germinação).

4.6 DISCUSSÃO

É incontestável a ocorrência de diversos efeitos positivos acarretados pelas SH, tanto no solo como nas plantas. Cada vez mais estudos têm sido realizados nessa área, visando compreender os mecanismos pelos quais os AH exercem sua bioatividade. Apesar das SH serem utilizadas desde o último século, somente nas últimas décadas tem havido uma crescente dedicação e atenção aos mecanismos pelos quais elas atuam no metabolismo vegetal (GARCÍA et al., 2018).

Inúmeros estudos relatam os diversos eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem em decorrência da aplicação de AH nas raízes (NARDI et al., 2007; TREVISAN et al., 2011; ROOMI et al., 2018; NUNES et al., 2019), no entanto, são poucas as evidências experimentais que mostram a integração entre esses mecanismos de ação dos AH no crescimento das plantas (OLAETXEA et al., 2018; OLAETXEA et al., 2019), sendo ainda esses conhecimentos relativamente escassos.

Alguns estudos têm relatado a associação entre aplicação de AH com um significativo aumento no acúmulo de ERO nas raízes (CORDEIRO et al., 2011; GARCÍA et al. 2016a). Radical hidroxila (HO^*) é o radical livre mais reativo dentre as ERO, e sua participação no metabolismo celular tem sido evidenciada em alguns estudos (RICHARDS et al., 2015), no entanto, pouco se fala sobre a relação direta com o crescimento radicular. Os dados apresentados mostram que ao associar AH e a aplicação do inibidor SB, esta combinação ocasionou uma redução do efeito bioestimulante do AH (Figura 8). Rodrigo-Moreno et al. (2012) abordaram em seu estudo que um moderado aumento de HO^* pode ativar vias de sinalização de Ca^{2+} , ocasionando um influxo necessário para o crescimento radicular. Em linha com os resultados encontrados neste estudo, foi encontrada uma expressão significativa dos genes OsCPK7 (Figura 20) e OsTPC1 (Figura 21) em plantas tratadas com AH, por outro lado foi possível notar o efeito inibitório ocasionado pelos diferentes inibidores.

O cálcio (Ca^{2+}), é um mensageiro secundário indispensável e, possui papel chave na regulação de processos como a transcrição gênica, desenvolvimento das plantas e processos fisiológicos, incluindo sinalização e adaptação a estresses, sendo essencial na formação de pontas radiculares (XU et al., 2022).

Ambos os genes estão relacionados na regulação do Ca^{2+} citosólico e no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo OsCPK7 um gene relacionado a proteína quinase dependente de cálcio (CDPK), e OsTPC1 atua como o principal canal Ca^{2+} , ambos responsivos a ERO (BAXTER et al., 2014). Ramos et al. (2015) observaram um claro efeito do tratamento do AH sobre a atividade de CDPK, além da elevada expressão do gene OsCPK7 e OsTPC1 em raízes de arroz, sugerindo um modelo para sinalização celular em raízes que estão diretamente ligadas a absorção e emissão de raízes laterais.

Além disso, existe uma relação entre o transporte de Ca^{2+} e o bombeamento de prótons (H^+) através da membrana, importante para regulação da homeostase celular e a nutrição de plantas, que como demonstrado por Ramos et al. (2015) a emergência de raízes laterais foi relacionada ao fluxo de específico de H^+ e Ca^{2+} na zona de alongamento das raízes.

As H^+ -ATPases da membrana plasmática são fundamentais para absorção de nutrientes, atuando na manutenção do potencial de membrana e a geração da força próton-motriz, que são ambos requeridos para o transporte de íons e outros solutos (GAXIOLA, 2007). Como demonstrado por Sperandio et al. (2020) linhagens de arroz silenciando a isoforma *osa7* afetaram o crescimento, a produção de grãos, e o crescimento radicular, mas não afetou o acúmulo de nitrogênio (N), destacando a importância das H^+ -ATPases na absorção e adaptação a diferentes níveis de nitrato no solo.

Em outro estudo realizado por Tavares et al (2017) verificaram que após 24 h de exposição de raízes de arroz ao AH, sete isoformas de H^+ -ATPases apresentaram elevada

indução, dentre elas a OsA7. Outro estudo, realizado por Olaetxea et al. (2019) também mostrou o efeito estimulatório das SH na expressão e atividade no bombeamento de H^+ -ATPases apresentando um papel crucial na promoção do crescimento radicular.

Neste estudo foi avaliado o efeito de diferentes inibidores de ERO e hormonais na capacidade do AH em aumentar o crescimento radicular. Os resultados mostram claramente que a presença desses inibidores além de prejudicar as características morfológicas, também resulta em uma redução na expressão da isoforma H^+ -ATPase, OsA7, em plântulas de arroz tratadas com AH (Figura 22). Em acordo com esses resultados, a utilização de um inibidor da atividade H^+ -ATPase inibiu alguns efeitos positivos causados pelo AH no crescimento radicular (OLAETXEA et al., 2019).

Os estudos presentes na literatura indicam que o H_2O_2 possui um importante papel na proliferação de células do córtex devido seu acúmulo nas zonas de alongamento celular, e uma vez que ocorre um desbalanço em sua concentração, o tamanho do meristema radicular também é alterado (TSUKAGOSHI, 2016). Os resultados aqui encontrados mostram claramente que plantas tratadas com AH sob o efeito inibitório do DMTU apresentaram alteração negativa em todas as características morfofisiológicas (Figura 10).

Devido a importância do radical $O_2^{\cdot-}$ no crescimento radicular (DUNAND et al., 2007; DITENGOU et al., 2015), plantas sob efeito da inibição da produção de superóxido, devido a aplicação do inibidor TIRON, desenvolveram raízes mais curtas, apresentaram menor emissão de número de pontas, ocasionando uma redução na área de superfície (Figura 9).

NADPH oxidase é uma enzima que está envolvida na produção de $O_2^{\cdot-}$ (CROSS et al., 1986). Na presença de DPIC, um inibidor específico de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase, o comprimento total radicular e o comprimento das raízes laterais foram reduzidos similarmente mesmo nas plantas sob o tratamento com DPIC+AH ou AH+DPIC (Figura 11). Estes dados mostram que a promoção do crescimento radicular é um mecanismo dependente da produção de ERO, e o efeito estimulatório do AH foi dependente da produção $O_2^{\cdot-}$.

Os resultados apresentados por García et al. (2012) mostram que a aplicação de AH em raízes de arroz induziu o sistema das enzimas antioxidantes em maneira similar a uma condição de estresse, onde ocorre estímulo da produção de ERO. No estudo de Cordeiro et al. (2011) foi observado que plantas de milho tratadas com AH extraídos de Oxisol apresentaram maior produção de ERO e maior estímulo na atividade de CAT (enzima catalase). García et al. (2016a) também relatou que o desenvolvimento radicular está associado a um significativo aumento no acúmulo de ERO e ao estímulo da SOD (superóxido dismutase) e POX (peroxidase). Em contrapartida, há alguns trabalhos na literatura que mostram que a aplicação de AH inibe o sistema de enzimas antioxidantes, como é o caso, por exemplo, do trabalho de Aguiar et al. (2016) que ao avaliarem plantas de cana submetidas ao déficit hídrico relataram uma baixa atividade das enzimas antioxidantes, exceto naqueles tratamentos que foram expostos ao AH, sendo necessário mais estudos para um melhor entendimento desse mecanismo das plantas quando são submetidas há algum tipo de estresse abiótico e tratadas com AH.

Em acordo com esses resultados, Nunes et al. (2019) mostraram que após a aplicação de AH em raízes de milho diversas enzimas antioxidantes foram diferencialmente detectadas na análise proteômica, principalmente aquelas ligadas a atividade de peroxidase. No estudo de Roomi et al. (2018) ao realizarem o perfil proteico de raízes de *Arabidopsis* tratadas com SH identificaram diferentes proteínas relacionadas a homeostase redox, em particular SOD e glutathione-S-transferase, indicando um envolvimento nos mecanismos de respostas induzidas pela aplicação de substâncias húmicas.

Embora ERO sejam principalmente reconhecidas como espécies químicas tóxicas derivadas do metabolismo aeróbico (MITTLER et al., 2011), tem sido mostrado que essas espécies são moléculas sinalizadoras envolvidas nos mecanismos de transdução de sinal que

controlam processos metabólicos como crescimento e desenvolvimento das plantas (FOREMAN et al., 2003; GARCÍA et al., 2016c; MITTLER, 2017). Neste contexto, as ERO têm sido propostas como mediadoras dos efeitos dos AH em raízes de arroz (GARCIA et al., 2016a).

É conhecido que as ROS participam dos processos de emissão de raízes laterais, polarização da membrana e sinalização via Ca^{2+} (FOREMAN et al., 2003). Vários estudos relatam que na região de emissão de raízes laterais há um acúmulo e produção de ROS (TSUKAGOSHI, 2016), onde um aumento de H_2O_2 no citosol pode levar a um aumento na diferenciação celular e ativar os canais de Ca^{2+} na região de alongamento celular (TSUKAGOSHI, 2016) e posteriormente estimular NADPH oxidases (FOREMAN et al., 2003; Orman-Ligeza et al., 2016), além de induzir as MAPK quinases (proteínas quinases ativada por mitógeno) (NOCTOR et al., 2018).

O uso de inibidores de ERO de fato inibiu alguns efeitos causados pela aplicação de AH no crescimento total de raízes, área de superfície, volume, número de pontas e no desenvolvimento de raízes laterais, bem como, afetou negativamente a expressão de genes relacionados a enzimas antioxidantes que desempenham um papel na proteção contra estresse oxidativo. Os resultados apresentados neste estudo mostram que AH extraídos de vermicomposto desempenham um papel no estímulo do crescimento radicular em plantas de arroz e claramente é um mecanismo dependente da sinalização de ERO.

Está bem fundamentado na literatura as mudanças que as SH induzem tanto no metabolismo primário quanto secundário desencadeado por uma complexa interação entre vias de sinalização hormonal e o metabolismo das ERO (NARDI et al., 2007; TREVISAN et al., 2011; ROOMI et al., 2018; NUNES et al., 2019). O metabolismo primário das plantas se refere a processos básicos bioquímicos essenciais para a sobrevivência, crescimento e reprodução, e as moléculas envolvidas nesse processo são chamadas de metabólitos primários e geralmente são constituídas de proteínas, carboidratos e lipídeos (CANELLAS & OLIVARES, 2014). Nardi et al. (2007) observou um efeito estimulatório em plântulas de milho tratadas com AH em decorrência do aumento da atividade de enzimas que são cruciais a glicólise e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), atribuindo também essas repostas das plantas as propriedades moleculares do AH.

Neste estudo também foi avaliado o gene HXK5, Hexoquinase-5, envolvido na via do metabolismo das hexoses, parte integrante do metabolismo de carboidratos, além de estar envolvido na via glicolítica. Os HXK5 é uma proteína que tem sido comumente identificada nos estudos proteômicos em arroz (DAI et al., 2007), onde a sua deficiência prejudica as vias de biossíntese e utilização de amido (LEE et al., 2020).

Os resultados encontrados na Figura 23 confirmam o papel do AH no metabolismo primário já relatado anteriormente por diversos autores. Por exemplo, Carletti et al. (2008) relataram pela primeira vez, por meio da abordagem proteômica em plântulas de milho tratadas com SH, uma regulação positiva na expressão de ACO (aconitase), proteína mitocondrial do ciclo do ácido cítrico, que pode induzir mudanças na exsudação radicular. Da mesma forma, em estudo mais recente Roomi et al. (2018) identificaram uma abundância de enzimas e proteínas diferencialmente expressas em raízes de *Arabidopsis* envolvidas no metabolismo energético.

Diversos estudos evidenciam que as SH induzem o crescimento de raízes laterais pelas vias de sinalização reguladas por auxina e óxido nítrico (NO), devido ao efeito semelhante das SH ao efeito hormonal (TREVISAN et al., 2010; CONSELVAN et al., 2018). Zandonadi et al. (2010) verificaram que a aplicação do inibidor de ação da auxina em plantas tratadas com AH reduziu a morfologia radicular e a proliferação de raízes laterais. Por outro lado, em raízes de *arabidopsis* tratadas com auxina, na mesma concentração encontrada nas substâncias húmicas, Conselvan et al. (2018) verificaram que não induziu a mesma resposta daquelas raízes tratadas

somente com substâncias húmicas, confirmando a hipótese que a atividade da SH *hormone-like* não ocorre somente pela presença de auxina nas moléculas da SH, mas também, devido a presença de outras moléculas com atividade similar, como por exemplo as ERO, justificando o efeito de bioestimulante.

O transporte polar de auxina por influxo e efluxo determina a sua distribuição nas raízes, sendo importante não somente para a formação de raízes laterais, mas também na diferenciação de células meristemáticas que afetam o alongamento celular (KOEVOETS et al., 2016). Nos resultados deste estudo são apresentados o efeito da aplicação de PCIB, inibidor de ação da auxina, que além de reduzir as características morfológicas de plantas de arroz também reduziu a expressão de genes que regulam o crescimento radicular, por exemplo TOR e IAA11 (Figura 18 e 19). Além disso, também foi observada significativa redução em todos os genes de ERO apresentados neste estudo.

TOR (Target of Rapamycin) quinase possui um papel central no crescimento celular, e evidências recentes sugerem uma integração entre vias de sinalização e metabólicas desempenham um papel no desenvolvimento das plantas (MCCREADY et al., 2020). Além disso, existe uma relação entre o status nutricional e fatores de crescimento para que ocorra sua ativação (DOBRENEL et al., 2016). Sua expressão ocorre nos meristemas apicais da parte aérea e radicular, integrando sinais de órgão distantes para atividade meristemática, sendo essencial nas vias de sinalização da auxina (LI et al., 2017).

Outra proteína também destacada, foi a TOM1 (Figura 24), que após a aplicação de AH apresentou uma elevada expressão, e seu papel tem sido demonstrado na regulação do transporte de vesículas e estão envolvidas na ubiquitinação de proteínas na membrana plasmática, apresentando uma rápida resposta a variações ambientais (ROACH et al., 2021). Em arroz e em cevada foi demonstrado uma dependência entre o gene TOM1 e efluxo de fitosideróforos na absorção de ferro (NOZOYE et al., 2011).

Além disso, os resultados encontrados nesta tese também indicam a interação com o transporte de vesículas, refletido pela elevada expressão do gene SEC1B (Figura 25). O crescimento e o desenvolvimento de raízes primárias em *Arabidopsis* são regulados pelo alongamento e divisão celular (SVOLACCHIA et al., 2020). Em plantas, a proteína SEC1B pertence à família SNARE, que são proteínas responsáveis pela etapa final no transporte de vesículas, sendo necessárias no crescimento radicular, bem como, no transporte de auxinas em raízes (GU et al., 2020; LUO et al., 2022).

Neste estudo foram analisados diversos genes relacionados ao transporte celular. A exposição ao AH pode interferir no transporte de vesículas e nos mecanismos de transporte, indicando que essas substâncias influenciam o desenvolvimento das plantas e possuem uma particular relação entre AH e o desenvolvimento radicular (NUNES et al., 2019). Corroborando com o que foi demonstrado por Conselvan et al. (2018) e Mora et al. (2012), que também relatam que o incremento no crescimento radicular, mensurado pela biomassa seca, foi independente da ação de AIA, etileno e NO, os resultados, aqui apresentados, mostram claramente que os mecanismos por trás dessa resposta fisiológica do AH no crescimento radicular permeiam entre diversos mecanismos de sinalização nas plantas.

O ácido abscísico (ABA) desempenha inúmeros processos fisiológicos, respostas a estresses abióticos, bem como, a regulação estomática, desencadeando uma cascata de sinalização celular (MITTLER & BLUMWALD, 2015). Recentes estudos têm destacado o papel do ABA no crescimento e arquitetura radicular, interagindo com alguns transportadores de nitrato (HARRIS & ONDZIGHI-ASSOUME, 2017), bem como, na indução da produção de ERO (POSTIGLIONE & MUDAY, 2020).

Uma vez que ocorre um aumento de nitrato na solução do solo, este desencadeia um acúmulo gradual de ABA na ponta da raiz, estimulando a sinalização de ABA que regula primeiro o metabolismo de nitrogênio e depois a absorção (ONDZIGHI-ASSOUME et al.,

2016). A participação de ABA também tem sido mostrada no alongamento de raízes laterais em resposta ao nitrato local, no entanto, ainda permanece uma incógnita como ABA regula esse alongamento (JIA & VON WIRÉN, 2020).

Diversos estudos têm mostrado que a aplicação de AH aumenta a expressão de transportadores de nitrato (QUAGGIOTTI et al., 2004; TAVARES et al., 2017). De acordo com Olaetxea et al. (2019) isso pode ser possível porque o estímulo ocasionado pelo AH no crescimento radicular pode ser dependente das vias de sinalização de ABA. Os resultados apresentados aqui confirmam essa hipótese. A aplicação do inibidor FLD, um inibidor da biossíntese de ABA, reduziu significativamente o crescimento radicular (Figura 13), e este efeito está associado a uma significativa redução na expressão do transportador de nitrato OsNRT2.1 (Figura 26).

Na abordagem transcriptômica realizada por Trevisan et al. (2011) foram detectados inúmeros transcritos diferencialmente expressos atribuídos a processos metabólicos e celulares, indicando que o tratamento com SH pode alterar o metabolismo primário, crescimento e desenvolvimento afetando a fisiologia das plantas de *Arabidopsis*. Em adição, foi detectado um aumento na expressão de PHS1, que além de induzir MAPK quinases, desempenha um papel na modulação e estabilidade de microtúbulos regulando o crescimento das pontas das raízes (TREVISAN et al., 2011).

A atividade bioestimulante, especificamente dos ácidos húmicos, é modulada pela interação de diversos fatores, tais como, genótipo da planta, condições de crescimento, dose e tempo de aplicação (ROUPHAEL et al., 2018; NUNES et al., 2019). O tipo de aplicação que o bioestimulante é testado pode influenciar na resposta da planta, e ao mesmo tempo apresentar respostas diferentes para cada espécie avaliada. Em geral, os experimentos conduzidos sob condição controlada possuem a vantagem de poderem ser repetidos e serem observados os mesmos efeitos nas abordagens fenotípicas, por outro lado, em condições a campo o bioestimulante pode não apresentar o mesmo efeito esperado devido os múltiplos efeitos de estresses abióticos que as plantas são expostas.

A arquitetura do sistema radicular é um dos principais fatores que determinam a produtividade de uma cultura, principalmente sob diferentes condições ambientais. Por exemplo, um sistema radicular mais profundo pode ser benéfico durante períodos de seca (YU et al., 2013, 2016), além de favorecer na absorção de nitrato, um nutriente que apresenta alta mobilidade, e pode ser facilmente lixiviado para as camadas mais profundas do solo (KIBA & KRAPP, 2016), enquanto que um sistema radicular mais curto favorece a exploração de nutrientes mais em superfície do solo, investindo em um maior crescimento de raízes laterais, e pode ser útil na absorção de nutrientes com menor mobilidade no solo, especialmente o fósforo (HERRERA et al., 2015).

Sendo assim, os estudos relacionados a bioestimulante precisam de uma interação com o domínio científico e novas abordagens metodológicas integrando diferentes ômicas e análises mais robustas de estatística multivariada para melhorar a pesquisa e o desenvolvimento de produtos bioativos à base de substâncias húmicas.

4.7 CONCLUSÕES

As evidências experimentais obtidas nesse estudo permitiram aceitar as hipóteses delimitadas na tentativa de responder a problemática desse trabalho, onde foi elucidar os mecanismos de sinalização responsáveis pela indução do crescimento do sistema radicular em resposta à aplicação de AH.

A partir dos resultados as principais conclusões que puderam ser obtidas foram que a promoção do crescimento radicular é um mecanismo dependente da produção de ERO, e o efeito estimulatório do AH é dependente da produção de HO*, O₂^{-*} e H₂O₂ nas condições experimentais propostas.

Através da abordagem molecular foi possível observar alterações na regulação gênica ocasionadas pela aplicação do AH, sendo mais expressiva em genes relacionados a atuação de enzimas antioxidantes que desempenham um papel na proteção das plantas contra o estresse oxidativo ocasionado principalmente por estresses abióticos.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que AH extraídos de vermicomposto desempenham um papel no estímulo do crescimento radicular em plantas de arroz e claramente é um mecanismo dependente de várias vias de sinalização existentes nas plantas, em especial as vias de sinalização de ERO e hormonais.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo foi possível aceitar as hipóteses levantadas e elucidar os mecanismos de sinalização responsáveis pela indução do crescimento do sistema radicular em resposta à aplicação de AH. No Capítulo I foi possível avaliar a bioatividade do AH através da indução de melhorias nas características morfológicas aliadas a técnicas espectroscópicas de ATR-FTIR e RMN de ^{13}C via CP/MAS, sendo possível validar o modelo experimental adotado neste estudo.

E no Capítulo II foram realizados ensaios para elucidar os mecanismos de sinalização responsáveis pela resposta fisiológica do AH no estímulo do crescimento radicular aliado a análise das características morfológicas e estudo da expressão gênica para relacionar as vias de sinalização hormonal e o metabolismo das ERO. Os resultados apresentados neste capítulo confirmam que a promoção do crescimento radicular é um mecanismo dependente da produção de ERO, e o efeito estimulatório do AH é dependente da produção de HO^* , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Além disso, este estudo permitiu confirmar o efeito protetivo que o AH exerce sobre o crescimento das plantas, explicando em parte os mecanismos fisiológicos por trás das respostas na promoção do crescimento radicular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, N. O.; NOVOTNY, E. H.; OLIVEIRA, A. L.; RUMJANEK, V. M.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. **Journal of Geochemical Exploration**, v.129, p. 95-102, 2013.
- AGUIAR, N. O. MEDICI, L. O.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; TORRES-NETO, A.; SILVA, S. F.; NOVOTNY, E. H.; CANELLAS, L. P. Metabolic profile and antioxidant 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.
- AHMAD, T.; KHAN, R.; KHATTAK, T. N. Effect of humic acid and fulvic acid based liquid and foliar fertilizers on the yield of wheat crop. **Journal of Plant Nutrition**, v. 41, p. 2438-2445, 2018.
- ANDERSEN, C. L.; LEDET-JENSEN, J.; ØRNTØFT, T. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245-5250, 2004.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1247-1257, 1995.
- ASLI, S.; NEUMANN, P. M. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. **Plant and Soil**, v. 336, p. 313-322, 2010.
- BIN RAHMAN, A. N. M. R.; ZHANG, J. Trends in rice research: 2030 and beyond. **Food and Energy Security**, e390, 2022.
- BAXTER, A.; MITTLER, R.; SUZUKI, N. ROS as key players in plant stress signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 1229-1240.
- CANELLAS, L. P.; ZANDONADI, D. B.; BUSATO, J. G.; BALDOTTO, M. A.; SIMÕES, M. L.; MARTIN-NETO, L.; FAÇANHA, A. R.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. **Soil Science**, v. 173, p. 624-637, 2008.
- CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, p. 1-11, 2014.
- CHEN, Y.; NOBILI, M.; AVIAD, T. Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In: **Soil organic matter in sustainable agriculture**. Ed. MAGDOFF, F.; WEIL, R. R. London: [s.n.], p. 103-129, 2004.
- CHEN, Z.; YANG, B.; HAO, Z.; ZHU, J.; ZHANG, Y.; XU, T. Exogenous hydrogen sulfide ameliorates seed germination and seedling growth of cauliflower under lead stress and its antioxidant role. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 5-15, 2018.

CHILSON, O. P.; KELLY-CHILSON, A. E.; SCHNEIDER, J. D. Pyrroline-5-carboxylate reductase in soybean nodules. **Plant Physiology**, v. 99, p. 119-123, 1992.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Análise Mensal – Maio-Junho/2020**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-arroz>

CONSELVAN, G. B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; FOGGIA, M. D.; NARDI, S.; CARLETTI, P. Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites. **Plant Soil**, v. 420, p. 119-134, 2017.

CONSELVAN, G. B.; FUENTES, D.; MERCHANT, A.; PEGGION, C.; FRANCIOSO, O.; CARLETTI, P. Effects of humic substances and indole-3-acetic acid on *Arabidopsis* sugar and amino acid metabolic profile. **Plant Soil**, v. 426, p. 17-32, 2018.

CORDEIRO, F. C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; RIBEIRO, R. C.; SOUZA, S. R. Humic acid-induced hairy root growth in basil is modulated by nitric oxide and reactive oxygen species. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 3140-3161, 2017.

DAS, S.; KAR, R. K. Reactive oxygen species-mediated promotion of root growth under mild water stress during early seedling stage of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 338-347, 2017.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 1-13, 2014.

DHINDSA, R. S.; MATOWE, W. Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. **Journal Experimental Botany**, v. 32, p.79-91, 1981.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.

DOBBS, L. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, M.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; FAÇANHA, A. Bioactivity of Chemically Transformed Humic Matter from Vermicompost on Plant Root Growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p. 3681-3688, 2010.

EBIC. European Biostimulant Industry Council. **Biostimulants Market**. 2020. Acessado em: 04 set. 2020. Disponível em: <https://biostimulants.eu/highlights/economic-overview-of-the-european-biostimulants-market/>

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Arroz**. 2004. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoTocantins/adubacao_calagem.htm. Acessado em: 02 de set. 2018.

ERTANI, A.; FRANCIOSO, O.; FERRARI, E.; SCHIAVON, M.; NARDI, S. Spectroscopic-chemical fingerprint and biostimulant activity of a protein-based product in solid form. **Molecules**, v. 23, p. 1-16, 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets**. Rome. 2022.

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J. H. F.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M. A.; LINSTAD, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J. D. G.; DAVIES, J. M.; DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, V. 422, p. 442-446, 2003.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 861-905, 2009.

FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, v. 154, p. 134-142, 2018.

FRANÇA, M. G. C.; PEDROSA, M. G.; CARVALHO, M. M. L.; MAGALHÃES, J. R.; CORDEIRO, F. C.; SOUZA, S. R. Óxido Nítrico em Plantas. In: FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R.; SANTOS, L. A. (Ed). **Nutrição Mineral de Plantas**. 2. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo cap. 6, p. 195-226, 2018.

GAO, J.; LIU, J.; LI, B.; LI, Z. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 185-186, 2001.

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

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; DE SOUZA, L. G. A.; TAVARES, O. C. H.; ZONTA, E.; GOMES, E. T. M.; BERBARA, R. L. L. Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 192, p. 56-63, 2016a.

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**, v. 6, p. 1-10, 2016b.

GARCÍA, A. C.; OLAETXEA, M.; SANTOS, L. A.; MORA, V.; BAIGORRI, R.; FUENTES, M.; ZAMARREÑO, A. M.; BERBARA, R. L.; GARCIA-MINA, J. M. Involvement of hormone-and ROS-signaling pathways in the beneficial action of humic substances on plants growing under normal and stressing conditions. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-13, 2016c.

GARCÍA, A. C.; GARCÍA-MINA, J. M.; TAVARES, O. C. H.; SANTOS, L. A.; BERBARA, R. L. L. Substâncias húmicas e seus efeitos sobre a nutrição de plantas. In: FERNANDES, M.

S.; SOUZA, S. R.; SANTOS, L. A. (Ed). **Nutrição Mineral de Plantas**. 2. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2018, cap. 7, p. 227-277.

GARCÍA, A. C.; CASTRO, T. A. 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.

GIANNOPOLITIS, C. N. & RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

HARRIS, J. M., & ONDZIGHI-ASSOUME, C. H. Environmental nitrate signals through abscisic acid in the root tip. **Plant Signaling & Behavior**, v. 12, p. 1-6, 2017.

HERNÁNDEZ, R.; ROBLES, C.; GARCÍA, A. C.; GURIDI, F.; REYNALDO, I. M.; GONZÁLEZ, D. Efectos anti estrés de ácidos húmicos de vermicompost en dos cultivares de arroz (*Oryza sativa*. L). **Cultivos Tropicales**, v. 39, p. 65-74, 2018.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Station Bull**, v. 347, p.1-32, 1950.

HU, X.; NEILL, S. J.; CAI, W.; TANG, Z. NO-mediated hypersensitive responses of rice suspension cultures induced by incompatible elicitor. **Chinese Science Bulletin**, v. 48, p. 358-363, 2003.

JANA, S.; CHOUDHURI, M. A. Glycolate metabolism of three submersed aquatic angiosperms during ageing. **Aquatic Botany**, v. 12, p. 345-354, 1982.

JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, p. 1274-1279, 1971.

JIA, Z.; VON WIRÉN, N. Signaling pathways underlying nitrogen-dependent changes in root system architecture: from model to crop species. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, p. 4393-4404, 2020.

JIAO, X.; LYU, Y.; WU, X.; LI, H.; CHENG, L.; ZHANG, C.; YUAN, L.; JIANG, R.; JIANG, B.; RENGEL, Z.; ZHANG, F.; DAVIES, W.; SHEN, J. Grain production versus resource and environmental costs: towards increasing sustainability of nutrient use in China. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 4935-4949, 2016.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.

KONDHARE, K. R.; HEDDEN, P.; KETTLEWELL, P. S.; FARRELL, A. D.; MONAGHAN, J. M. Use of the hormone-biosynthesis inhibitors fluridone and paclobutrazol to determine the effects of altered abscisic acid and gibberellin levels on pre-maturity α -amylase formation in wheat grains. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 210-216, 2014.

KOVÁČIK, J.; BAČKOR, M. Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants. **Plant Soil**, v. 297, p. 255-265, 2007.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B.; BAČKOR, M. Nitric oxide signals ROS scavenger-mediated enhancement of PAL activity in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* roots: side effects of scavengers. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 1686-1693, 2009.

KUSHWAHA, B. K.; SINGH, S.; TRIPATHI, D. K.; SHARMA, S.; PRASAD, S. M.; CHAUHAN, D. K.; KUMAR, V.; SINGH, V. P. New adventitious root formation and primary root biomass accumulation are regulated by nitric oxide and reactive oxygen species in rice seedlings under arsenate stress. **Journal of Hazardous Materials**, v. 361, p. 134-140, 2019.

LAM-SÁNCHEZ, A.; SANTOS, J. E.; TAKAMURA, K.; TREPTOW, R. M. O.; OLVEIRA, J. E. D. Estudos Nutricionais com arroz (*Oryza sativa*, L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 5, p. 37-48, 1994.

LEE, D. J.; CHOI, H. J.; MOON, M. E.; CHI, Y. T.; JI, K. Y.; CHOI, D. Superoxide serves as a putative signal molecule for plant cell division: overexpression of *CaRLK1* promotes the plant cell cycle via accumulation of O_2^- and decrease in H_2O_2 . **Physiologia Plantarum**, v. 159, p. 228-243, 2017.

LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 280-287, 2003.

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

LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Annals of Botany**, v. 78, p. 389-398, 1996.

MHAMDI, A.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen species in plant development. **Development**, v. 145, p. 1-12, 2018.

MARKET DATA FORECAST. **Biostimulants**. Disponível em: <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/biostimulants-market>. 2022.

MARKETS AND MARKETS. **Biostimulants**. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biostimulant-market-1081.html>. 2021.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 300-309, 2011.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, p. 11-19, 2017.

MITTLER, R.; ZANDALINAS, S. I.; FICHMAN, Y.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, p. 663-679, 2022.

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

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

NAKANO, Y. & ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biological Biochemical**, v. 34, p. 1527-1536, 2002.

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.; PIZZEGHELLO, D.; ERTANI, A. Hormone-like activity of the soil organic matter. **Applied Soil Ecology**, v. 123, p. 517-520, 2018.

NOCTOR, G.; REICHHELD, J.-P.; FOYER, C. H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 3-12, 2018.

NUNES, R. O.; DOMICIANO, G. A.; ALVES, W. S.; MELO, A. C. A.; NOGUEIRA, F. C. S.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; ZINGALI, R. B.; SOARES, M. R. Evaluation of the effects of humic acids on maize root architecture by label-free proteomics analysis. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-11, 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.; GARCÍA-MINA, J. M. Absciscic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused by rhizosphere humic acids. **Plant Physiology**, v. 169, p. 2587-2596, 2015.

OLAETXEA, M.; MORA, V.; GARCÍA, A.; C.; SANTOS, L. A.; BAIGORRI, R.; FUENTES, M.; GARNICA, M.; BERBARA, R. L. L.; ZAMARREÑO, A. M.; GARCÍA-MINA, J. M. Root-Shoot Signaling crosstalk involved in the shoot growth promoting action of rhizospheric humic acids. **Plant Signalling & Behavior**, v. ;11, e1161878, 2016.

OLAETXEA, M.; HITA, D.; GARCÍA, A. C.; FUENTES, M.; BAIGORRI, R.; MORA, V.; GARNICA, M.; URRUTIA, O.; ERRO, J.; ZAMARREÑO, 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.; ZAMARREÑO, A. M.; SPÍCHAL, L.; GARCÍA-MINA, J. 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.

OLIVEIRA, E. A. G. **Desenvolvimento de substratos orgânicos, com base na vermicompostagem, para produção de mudas de hortaliças em cultivo protegido**. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

ONDZIGHI-ASSOUME, C.; CHAKRABORTY, S.; HARRIS, J. M. Environmental nitrate stimulates abscisic acid accumulation in arabidopsis root tips by releasing it from inactive stores. **The Plant Cell**, v. 28, p. 729-745, 2016.

OONO, Y.; OOURA, C.; RAHMAN, A.; ASPURIA, E. T.; HAYASHI, K.-I.; TANAKA, A.; UCHIMIYA, H. *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in arabidopsis root. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1135-1147, 2003.

ORMAN-LIGEZA, B.; PARIZOT, B.; DE RYCKE, R.; FERNANDEZ, A.; HIMSCHOOT, E.; VAN BREUSEGEM, F.; BENNETT, M. J.; PÉRILLEUX, C.; BEECKMAN, T.; DRAYE, X. RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in Arabidopsis. **Development**, v. 143, p. 3328-3339, 2016.

POSTIGLIONE, A. E.; MUDAY, G. K. The Role of ROS homeostasis in ABA-induced guard cell signaling. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1-9, 2020.

PÉREZ-PÉREZ, M. E.; LEMAIRE, S. D.; CRESPO, J. L. Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. **Plant Physiology**, v. 160, p. 156-164, 2012.

PICCOLO, A.; CONTE, P.; COZZOLINO, A. Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances as compared to macromolecular polymers. **Soil Science**, v. 166, p. 174-185, 2001.

PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T.; LEITAO, M. A.; OKAMOTO, O. K.; MORSE, D.; COLEPICCOLO, P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, v. 39, p. 1008-1018, 2003.

RAMOS, A. C.; DOBBSS, L. B.; SANTOS, L. A.; FERNANDES, M. S.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; CANELLAS, L. Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling dependent on Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 2, p. 1-12, 2015.

RANGEL, R. P. **Arquitetura radicular e tolerância à seca em plantas de arroz com elevada expressão de citocinina oxidase nas raízes**. 2018. 82f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2018.

ROOMI, S.; MASI, A.; CONSELVAN, G. B.; TREVISAN, S.; QUAGGIOTTI, S.; PIVATO, M.; ARRIGONI, G.; YASMIN, T.; CARLETTI, P. Protein profiling of arabidopsis roots treated with humic substances: insights into the metabolic and interactome networks. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-11, 2018.

ROSE, M. T.; PATTI, A. F.; LITTLE, K. R.; BROWN, A. L.; JACKSON, W. R.; CAVAGNARO, T. R. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. **Advances in Agronomy**, v. 124, p. 37-89, 2014.

ROSSIELLO, R. O. P.; ARAÚJO, A. P.; MANZATTO, C. V.; FERNANDES, M. S. Comparação dos métodos fotoelétrico e da interseção na determinação de área, comprimento e raio médio radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, p. 633-638, 1995.

ROUPHAEL, Y.; SPÍCHAL, L.; PANZAROVÁ, K.; CASA, R.; COLLA, G. High-throughput plant phenotyping for developing novel biostimulants: from lab to field or from field to lab? **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-6, 2018.

ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Editorial: Biostimulants in agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1-7, 2020.

SÁNCHEZ-ROMERA, B.; RUIZ-LOZANO, MANUEL, JUAN; LI, GUOWEI; LUU, D.-T.; MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C.; CARVAJAL, M.; ZAMARREÑO, A. M.; GARCÍA-MINA, J. M.; MAUREL, C.; AROCA, R. Enhancement of root hydraulic conductivity by methyl jasmonate and the role of calcium and abscisic acid in this process. **Plant, Cell and Environment**, v. 37, p. 995-1008, 2014.

SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Eds). **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Porto Alegre: Gênese, 1999. 102p.

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

SDG. Sustainable Development Goals. **Web Site**. 2015. Disponível em: <https://sdgs.un.org/goals> Acessado em: 04 set. 2020.

SNELL, F. D.; SNELL, C. T. Colorimetric methods of analysis. **Van Nostrand Reinhold**, v. 4, p. 7-145, 1971.

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

SOUZA, A. C.; OLIVARES, F. L.; PERES, L. E. P.; PICCOLO, A.; CANELLAS, L. P. Plant hormone crosstalk mediated by humic acids. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 9, p. 1-25, 2022.

SOUZA, C. C. B.; OLIVEIRA, D. F.; SOUZA, R. S.; SOUZA, A. F. F.; COSTA, T. G. A.; LIMA, B. R.; SOUZA, W. S.; SANTOS, O. A. Q.; PINHEIRO JÚNIOR, C. R. P.; LEITE, F. F. G. D.; MOURA, O. V. T.; AGUIAR, T. C.; LÁZARO, M. L.; LIMA, A. C. B. P.; GARCÍA, A. C. Diferenciação de ácidos húmicos de diferentes origens mediante RMN de ¹³C via CP/MAS e ATR-FTIR aliado a quimiometria. **Revista Virtual de Química**, v. 13, p. 371-382, 2021.

SOUZA, A. F. F. **Contribuição do transportador OsNRT2.4 para a absorção de nitrato e modulação da arquitetura radicular em arroz sob baixa disponibilidade de nitrogênio**. 2018. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2018.

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

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. (Eds). **Methods of Soil Analysis Part 3 - Chemical Methods**. 2. ed. Madison: Soil Science Society of America, 1996, cap. 35, p.1018-1020.

TAVARES, O. C. H.; SANTOS, L. A.; FERREIRA, L. M.; SPERANDIO, M. V. L.; ROCHA, J. G.; GARCÍA, A. C.; DOBBSS, L. B.; BERBARA, R. L. L.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. 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. **Annals of Applied Biology**, v. 170, p. 89-103, 2017.

TOPP, C. N. Hope in change: the role of root plasticity in crop yield stability. **Plant Physiology**, v.172, p. 5-6, 2016.

TRACY, S. R.; NAGEL, K. A.; POSTMA, J. A.; FASSBENDER, H.; WASSON, A.; WATT, M. Crop improvement from phenotyping roots: highlights reveal expanding opportunities. **Trends in Plant Science**, v. 25, p. 105-118, 2020.

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

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

TRIPATHY, B.C.; OELMÜLLER, R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p. 1621-1633, 2012.

TSUKAGOSHI, H. Control of root growth and development by reactive oxygen species. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 29, p. 57-63, 2016.

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

VACCARO, S.; ERTANI, A.; NEBBIOSO, A.; MUSCOLO, A.; QUAGGIOTTI, S.; PICCOLO, A.; NARDI, S. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 2, p. 1-12, 2015.

WAN, J. Genetic crop improvement: a guarantee for sustainable agricultural production. **Engineering**, v. 4, p. 431-432, 2018.

WANDER, A. L. A cultura. In: BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. **Arroz do plantio a colheita**. 1 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 9-26, 2015.

WANG, G.; XIAO, Y.; DENG, X.; ZHANG, H.; LI, T.; CHEN, H. Exogenous hydrogen peroxide contributes to heme oxygenase-1 delaying programmed cell death in isolated aleurone

layers of rice subjected to drought stress in a cGMP-dependent manner. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-14, 2018.

WANG, H.; LI, Y.; HOU, J.; HUANG, J.; LIANG, W. Nitrate reductase-mediated nitric oxide production alleviates Al-induced inhibition of root elongation by regulating the ascorbate-glutathione cycle in soybean roots. **Plant Soil**, v. 410, p. 453-465, 2017.

WASSMANN, R.; JAGADISH, S.V.K.; HEUER, S.; ISMAIL, A.; REDONA, E.; SERRAJ, R.; SINGH, R.K.; HOWELL, G.; PATHAK, H.; SUMFLETH, K. Climate change affecting rice production: the physiological and agronomic basis for possible adaptation strategies. **Advances in Agronomy**, v. 101, n. 1, p. 59-122, 2009.

WORLD POPULATION PROSPECTS. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division: Summary of Results, 2022.

YANG, W.; ZHU, C.; MA, X.; LI, G.; GAN, L.; NG, D.; XIA, K. Hydrogen peroxide is a second messenger in the salicylic acid-triggered adventitious rooting process in mung bean seedlings. **Plos One**, v. 8, e84580, 2013.

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

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.

ZANDONADI, D. B.; SANTOS, M. P.; DOBBSS, L. B.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P.; BINZEL, M. L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; FAÇANHA, A. R. Nitric Oxide Mediates Humic Acids-Induced Root Development and Plasma Membrane H⁺-ATPase Activation. **Planta**, v. 231, p. 1025-1036, 2010.

ZHANG, S.; HUANG, G.; ZHANG, Y.; LV, X.; WAN, K.; LIANG, J.; FENG, Y.; DAO, J.; WU, S.; ZHANG, L.; YANG, X.; LIAN, X.; HUANG, L.; SHAO, L.; ZHANG, J.; QIN, S.; TAO, D.; CREWS, T. E.; SACKS, E. J.; LYU, J.; WADE, L. J.; HU, F. Sustained productivity and agronomic potential of perennial rice. **Nature Sustainability**, 2022.

ZHANG, Z.; GAO, S.; CHU, C. Improvement of nutrient use efficiency in rice: current toolbox and future perspectives. **Theoretical and Applied Genetics**, v.0, p. 1-21, 2020.

ZHOU, B.; GUO, Z.; XING, J.; HUANG, B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 3223-3228, 2005.

7 APÊNDICES

7.1 Apêndice I

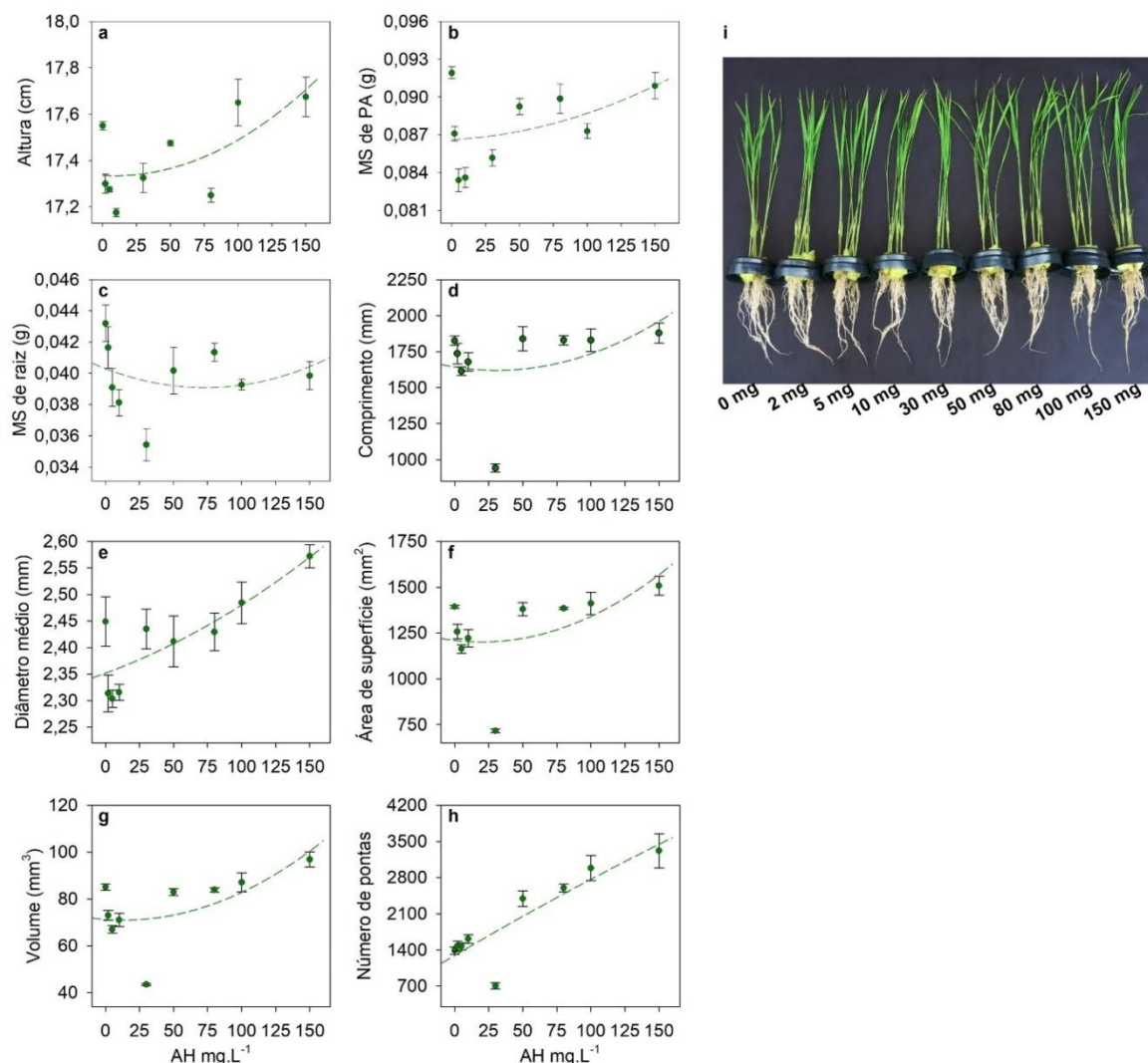


Figura 28. Curva de calibração das concentrações de AH. As plantas foram coletadas aos 13 DAG e foi realizada somente uma aplicação de AH aos 10 DAG. **(a-c)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao AH. **(d-h)**. Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(i)** Plantas crescidas nas diferentes concentrações de AH. AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 2, 5, 10, 30, 50, 80, 100 e 150 mg de AH.L⁻¹.

7.2 Apêndice II

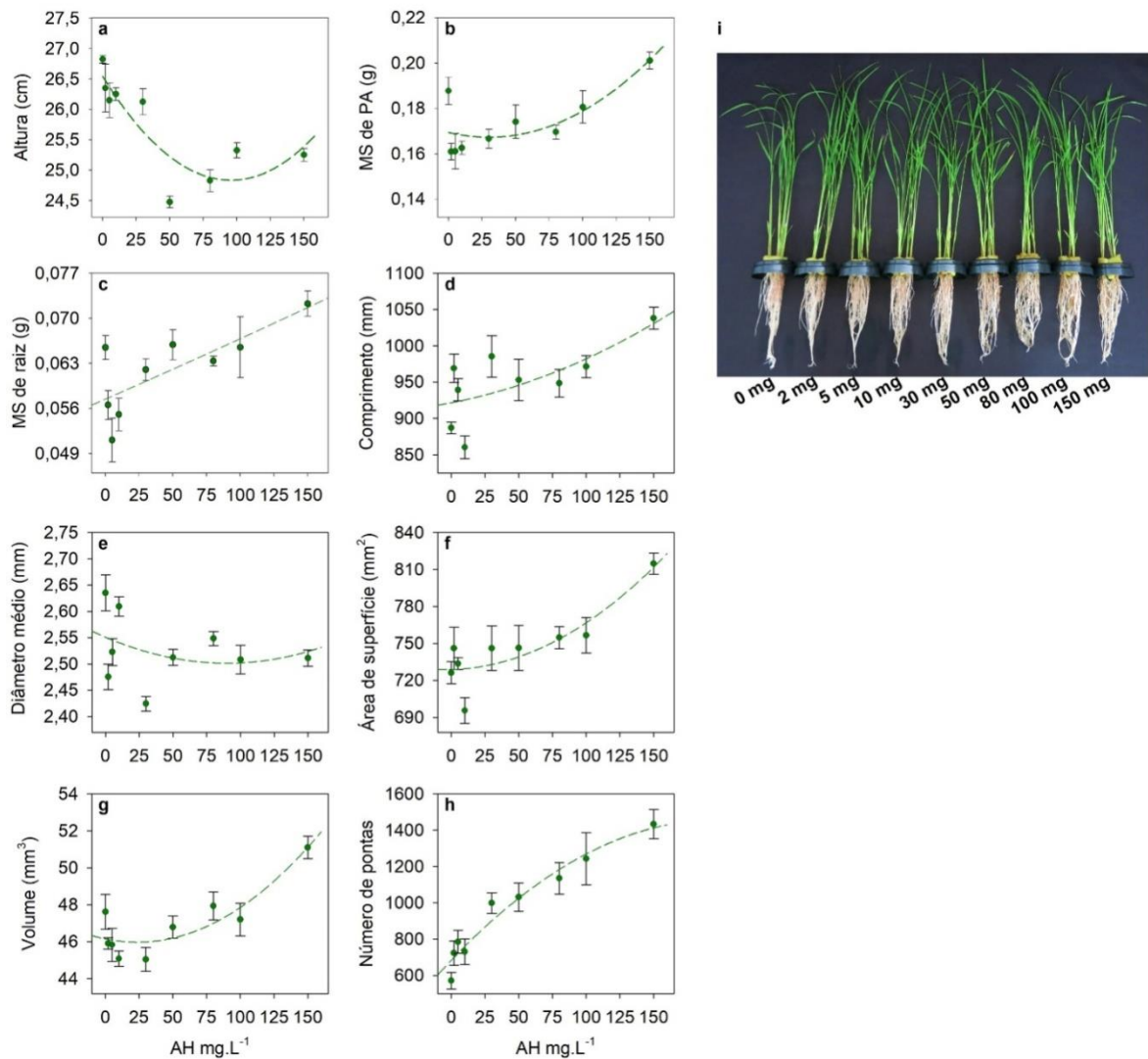


Figura 29. Curva de calibração das concentrações de AH. As plantas foram coletadas aos 16 DAG e foram realizadas duas aplicações de AH, aos 10 e aos 13 DAG. **(a-c)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao AH. **(d-h)**. Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao AH. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(i)** Plantas crescidas nas diferentes concentrações de AH. AH: ácido húmico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 2, 5, 10, 30, 50, 80, 100 e 150 mg de AH.L⁻¹.

7.3 Apêndice III

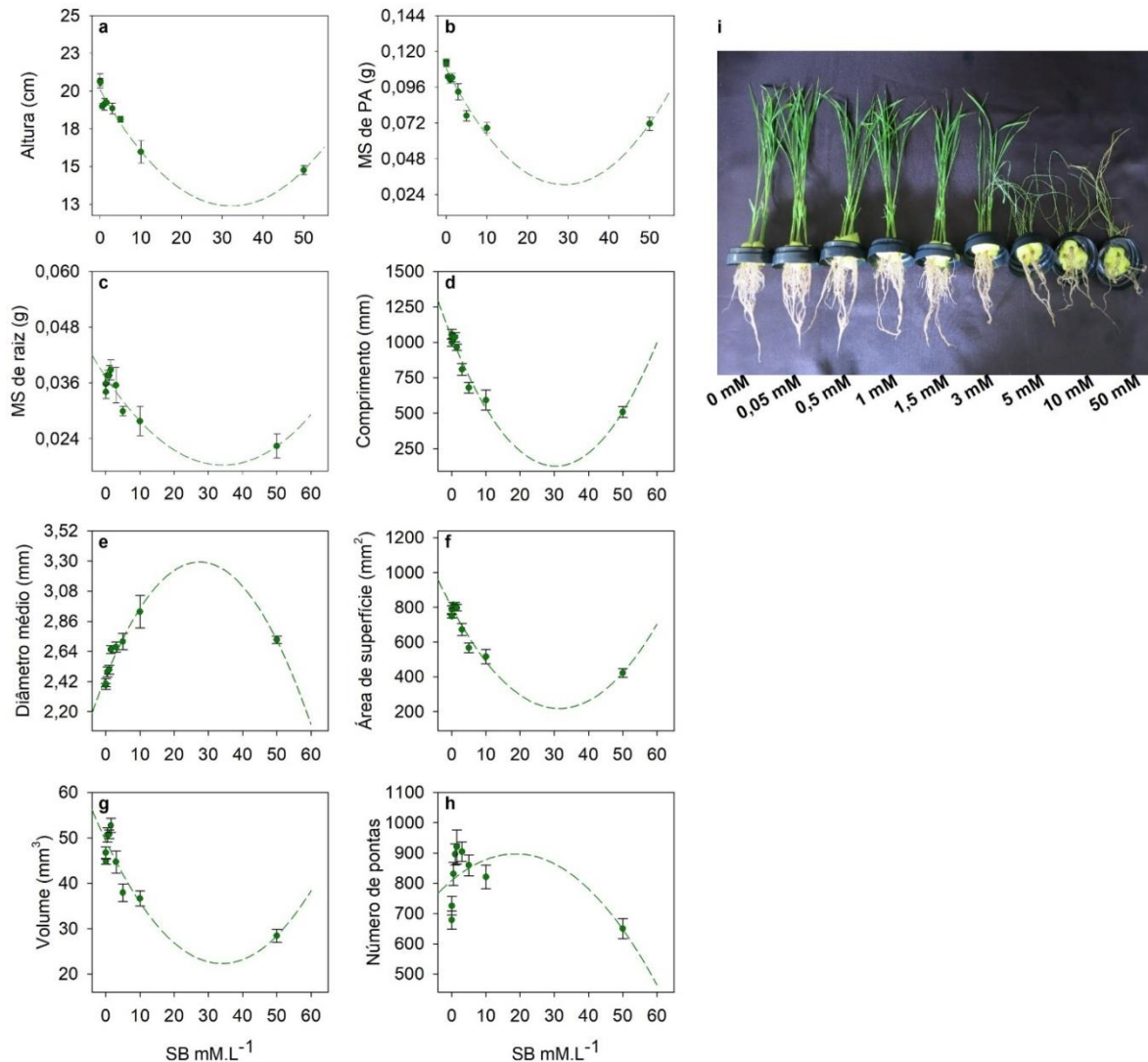


Figura 30. Curva de calibração das concentrações de SB, inibidor de HO*. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-c)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao SB. **(d-h)**. Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao SB. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(i)** Plantas crescidas nas diferentes concentrações de SB. SB: benzoato de sódio, HO*: hidroxila, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 0,05, 0,5, 1, 1,5, 3, 5, 10, 50 mM de SB.L⁻¹.

7.4 Apêndice IV

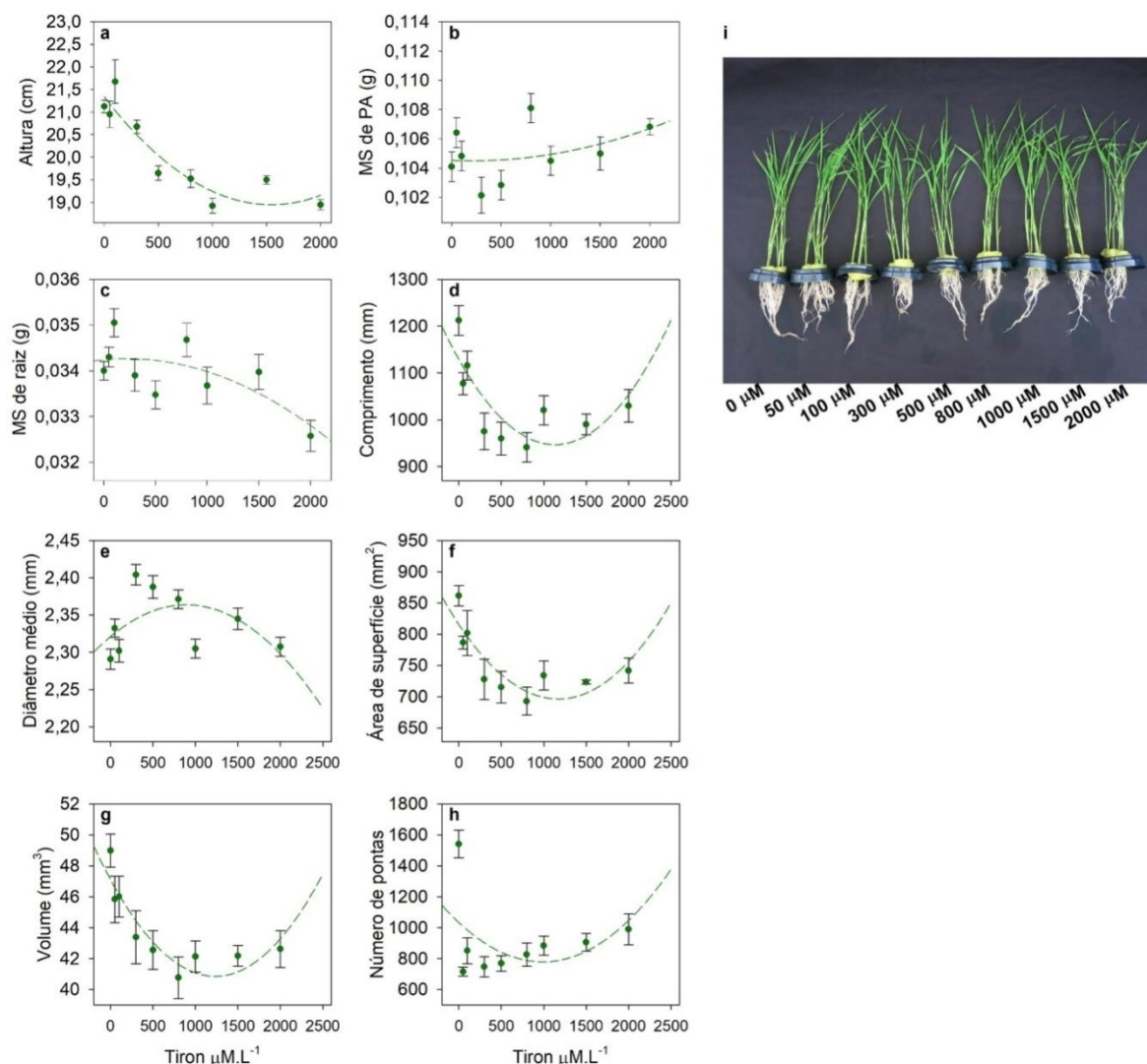


Figura 31. Curva de calibração das concentrações de TIRON, inibidor de $\text{O}_2^{\cdot -}$. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-c)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao TIRON. **(d-h)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao TIRON. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(i)** Plantas crescidas nas diferentes concentrações de TIRON. TIRON: Ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, $\text{O}_2^{\cdot -}$: superóxido, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 50, 100, 300, 500, 800, 1000, 1500, 2000 μM de TIRON.L⁻¹.

7.5 Apêndice V

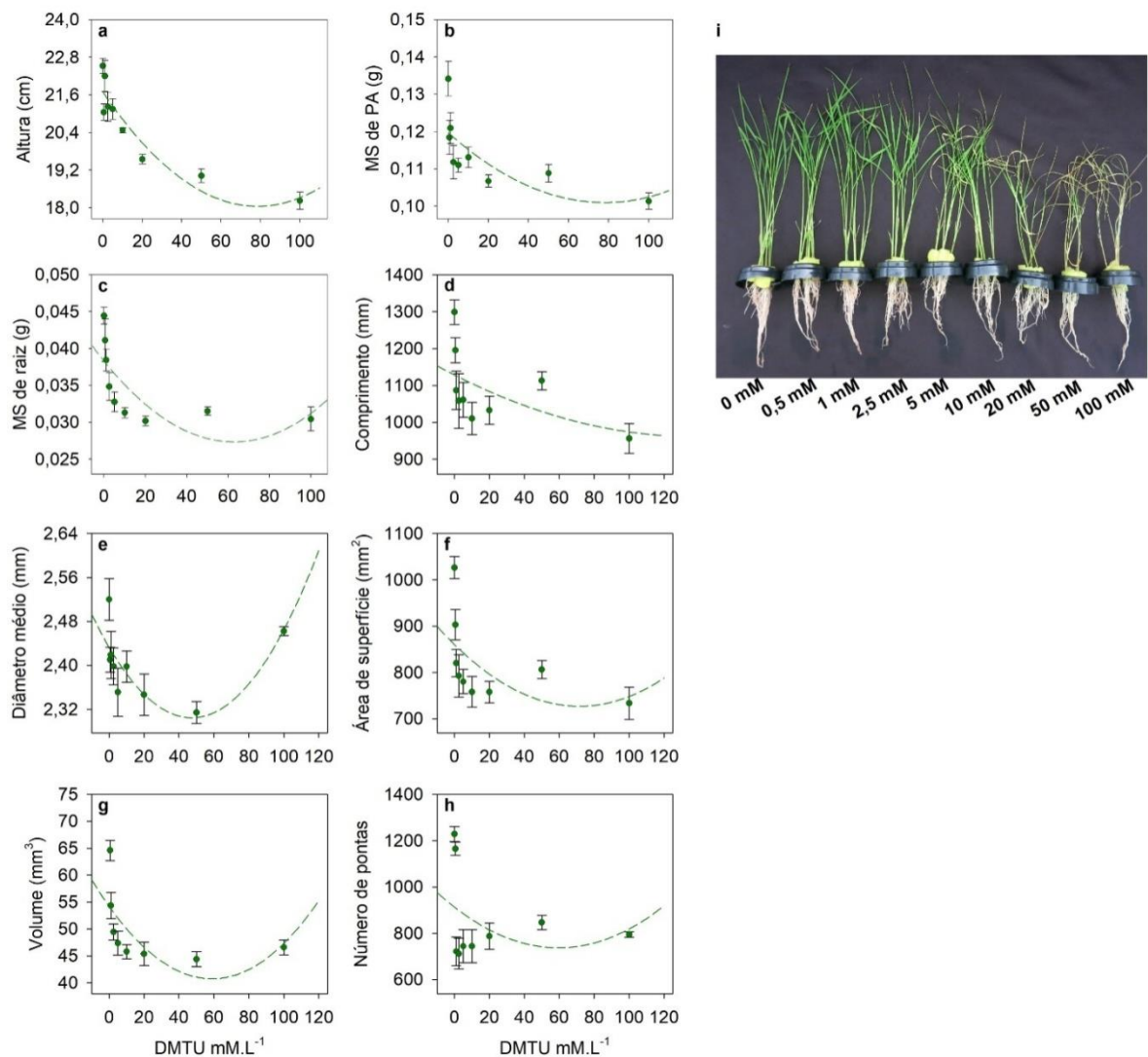


Figura 32. Curva de calibração das concentrações de DMTU, inibidor de H₂O₂. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-c)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao DMTU. **(d-h)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao DMTU. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(i)** Plantas crescidas nas diferentes concentrações de DMTU. DMTU: N N'-Dimethylthiourea, H₂O₂: peróxido de hidrogênio, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20 e 50, 100 mM de DMTU.L⁻¹.

7.6 Apêndice VI

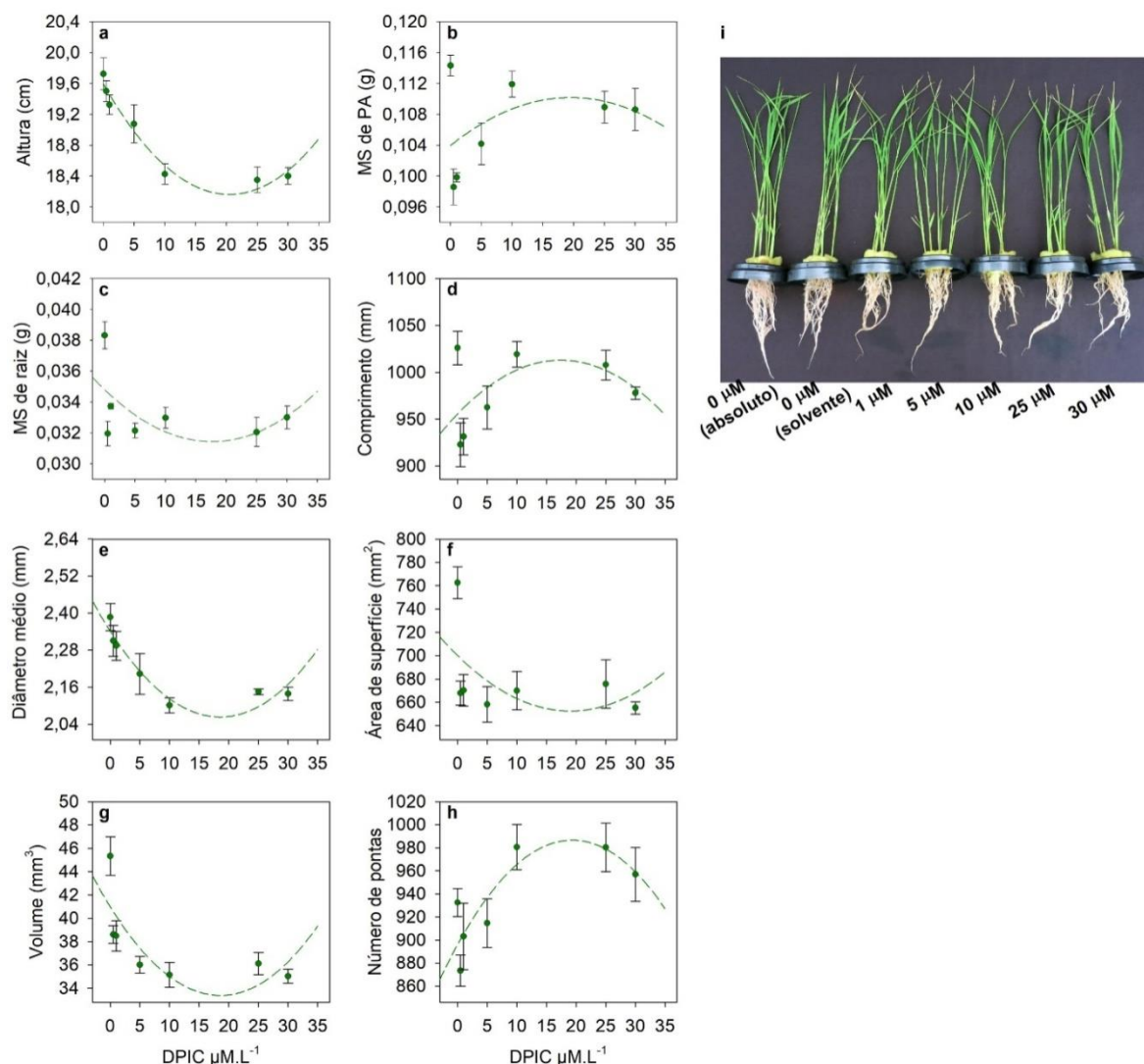


Figura 33. Curva de calibração das concentrações de DPIC, inibidor de NADPH oxidase. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-c)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao DPIC. **(d-h)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao DPIC. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(i)** Plantas crescidas nas diferentes concentrações de DPIC. DPI: Diphenyleneiodonium chloride, NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0 (controle absoluto), 0 (controle contendo solvente, DMSO), 1, 5, 10, 25, 30 $\mu\text{M.L}^{-1}$.

7.7 Apêndice VII

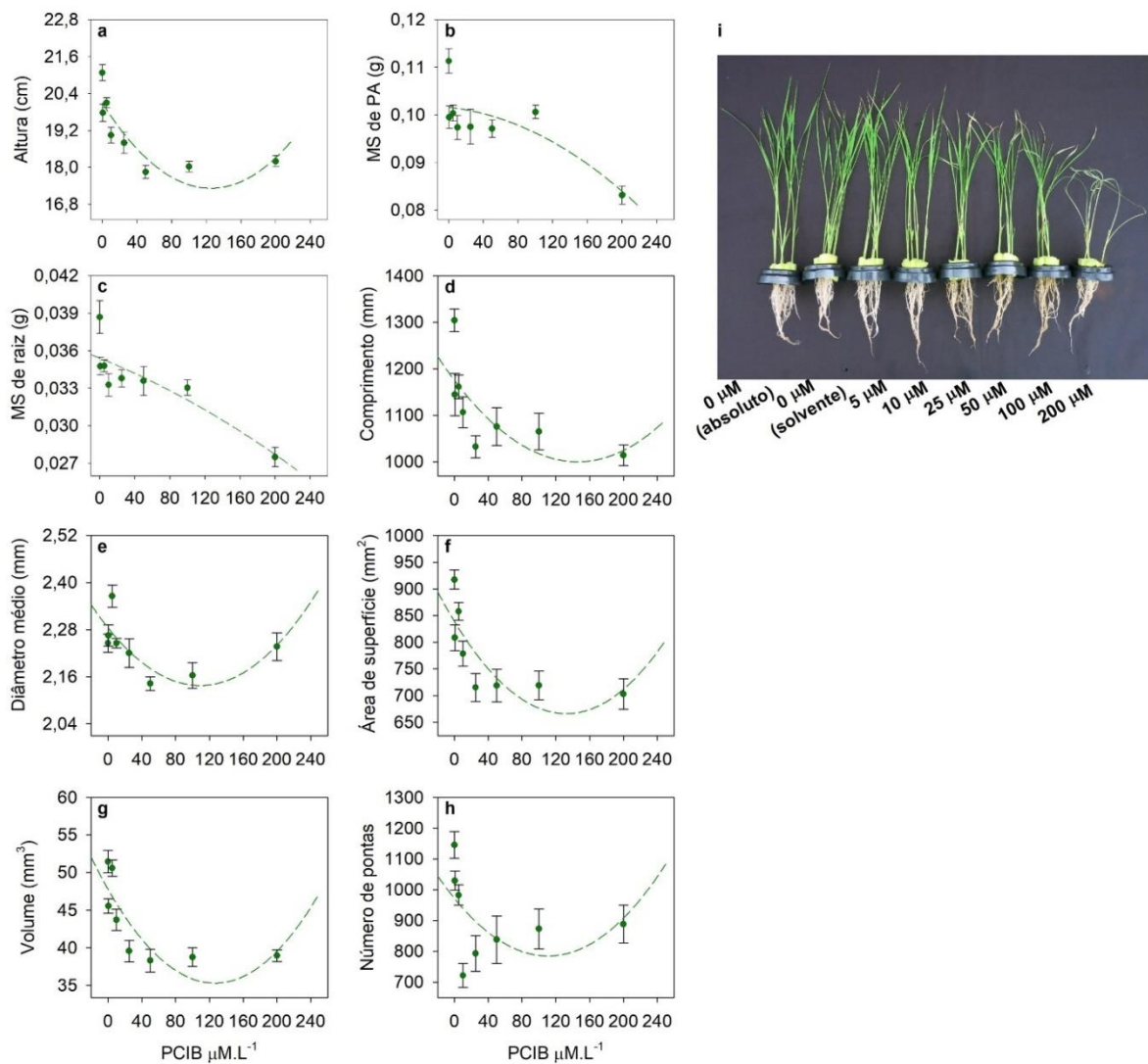


Figura 34. Curva de calibração das concentrações de PCIB, inibidor de ação da auxina. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-c)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao PCIB. **(d-h)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao PCIB. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(i)** Plantas crescidas nas diferentes concentrações de PCIB. PCIB: Ácido 2-(*p*-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0 (controle absoluto), 0 (controle contendo solvente, DMSO), 5, 10, 25, 50, 100, 200 μM de PCIB $\cdot \text{L}^{-1}$.

7.8 Apêndice VIII

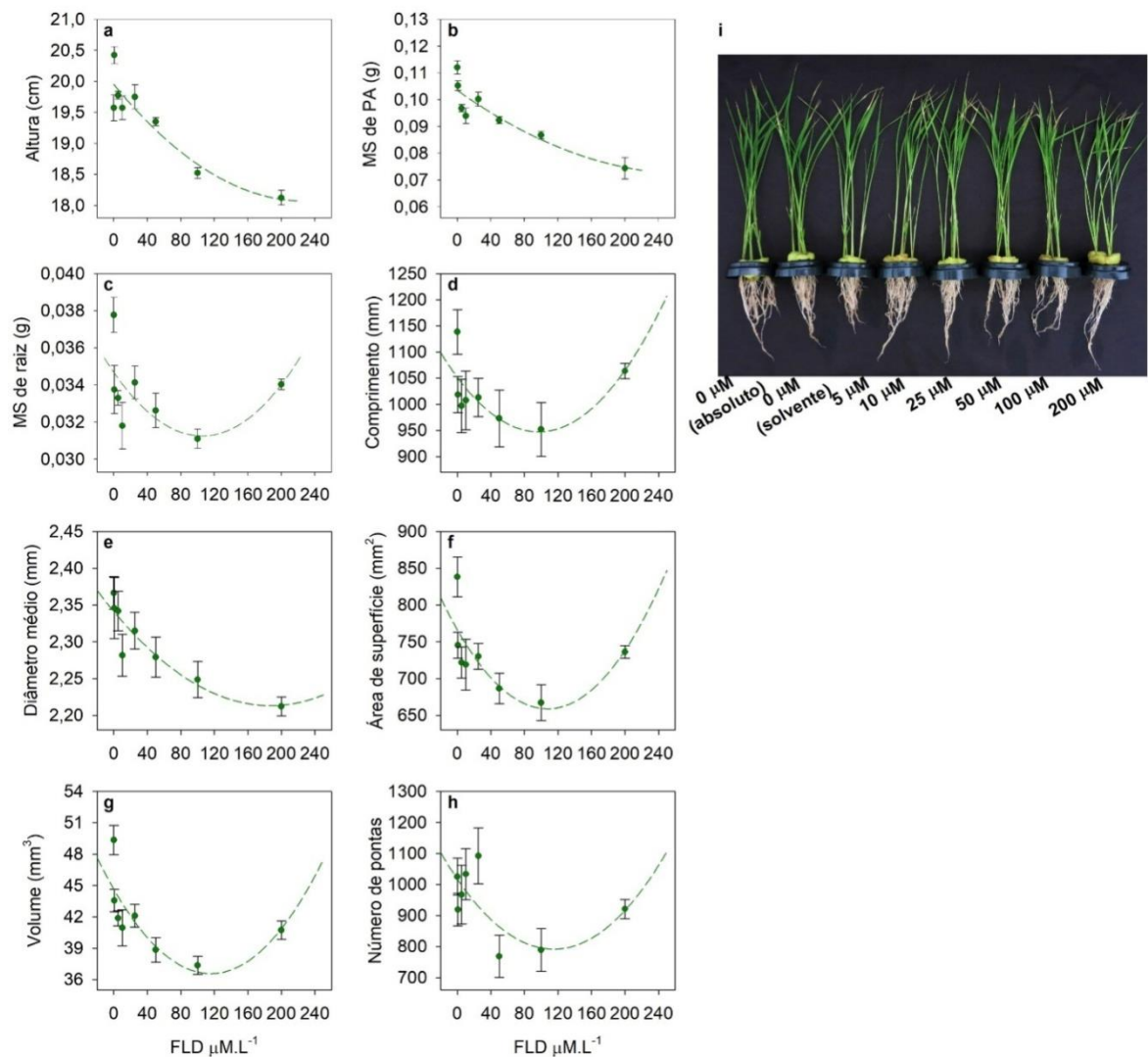


Figura 35. Curva de calibração das concentrações de FLD, inibidor de ABA. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-c)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao FLD. **(d-h)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição ao FLD. A análise foi realizada utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. **(i)** Plantas crescidas nas diferentes concentrações de FLD. FLD: Fluridone, ABA: ácido abscísico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas. Concentrações utilizadas: 0 (controle absoluto), 0 (controle contendo solvente, DMSO), 5, 10, 25, 50, 100, 200 μM de FLD . L^{-1} .

7.9 Apêndice IX

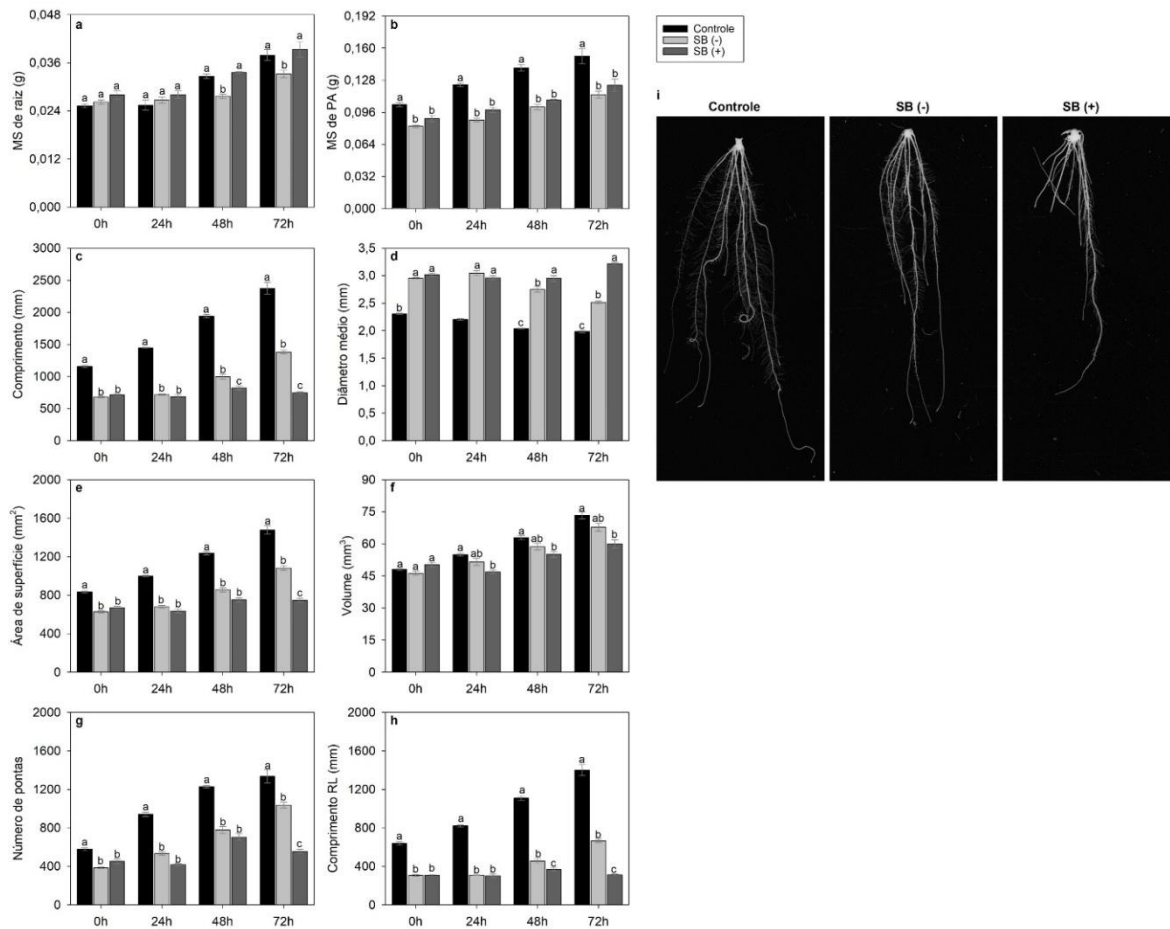


Figura 36. *Time-course* do inibidor SB, inibidor de HO*. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-b) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao SB. (c-h) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição SB. (i) Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. SB: benzoato de sódio, HO*: hidroxila, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

7.10 Apêndice X

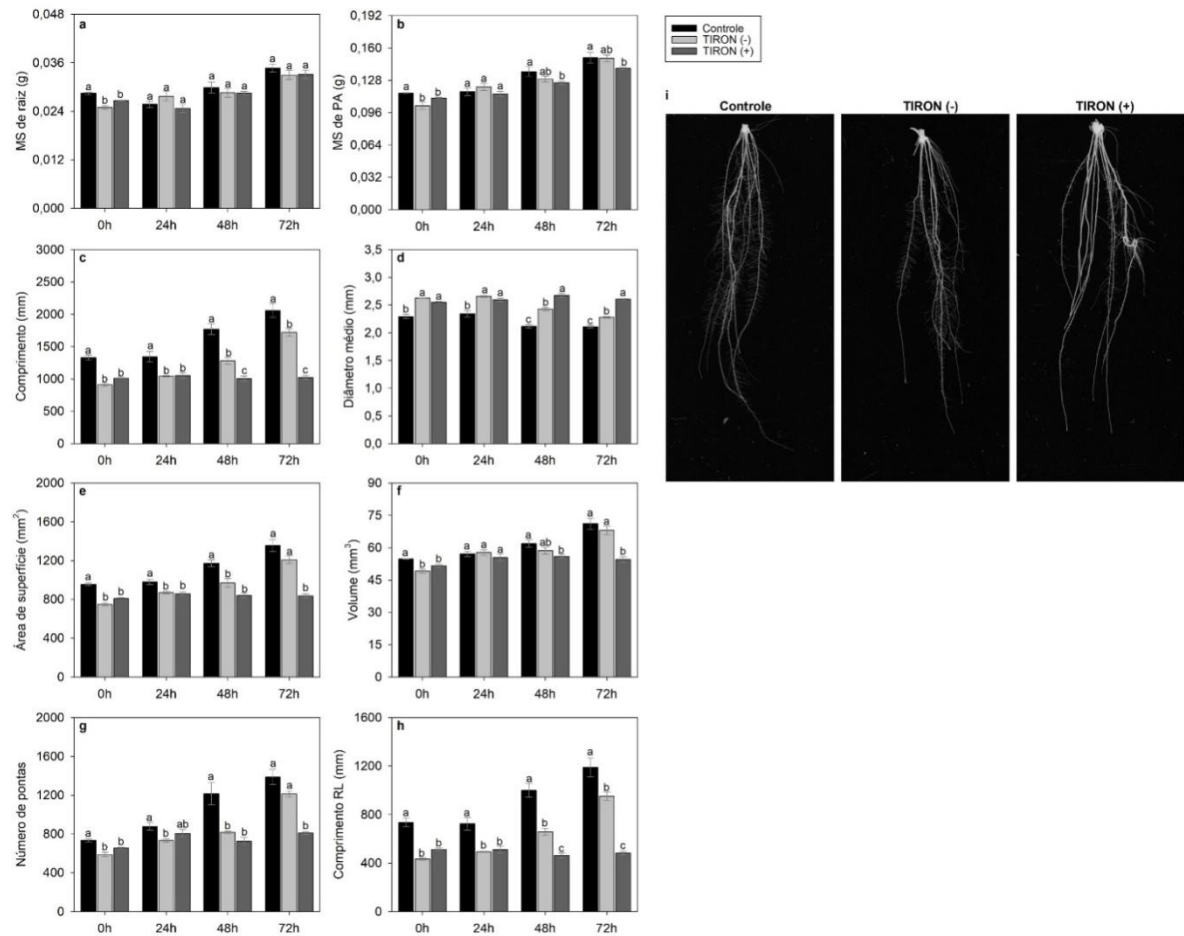


Figura 37. Time-course do inibidor TIRON, inibidor de $O_2^{\cdot -}$. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-b) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao TIRON. (c-h) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição TIRON. (i) Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. TIRON: Ácido 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic, $O_2^{\cdot -}$: superóxido, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

7.11 Apêndice XI

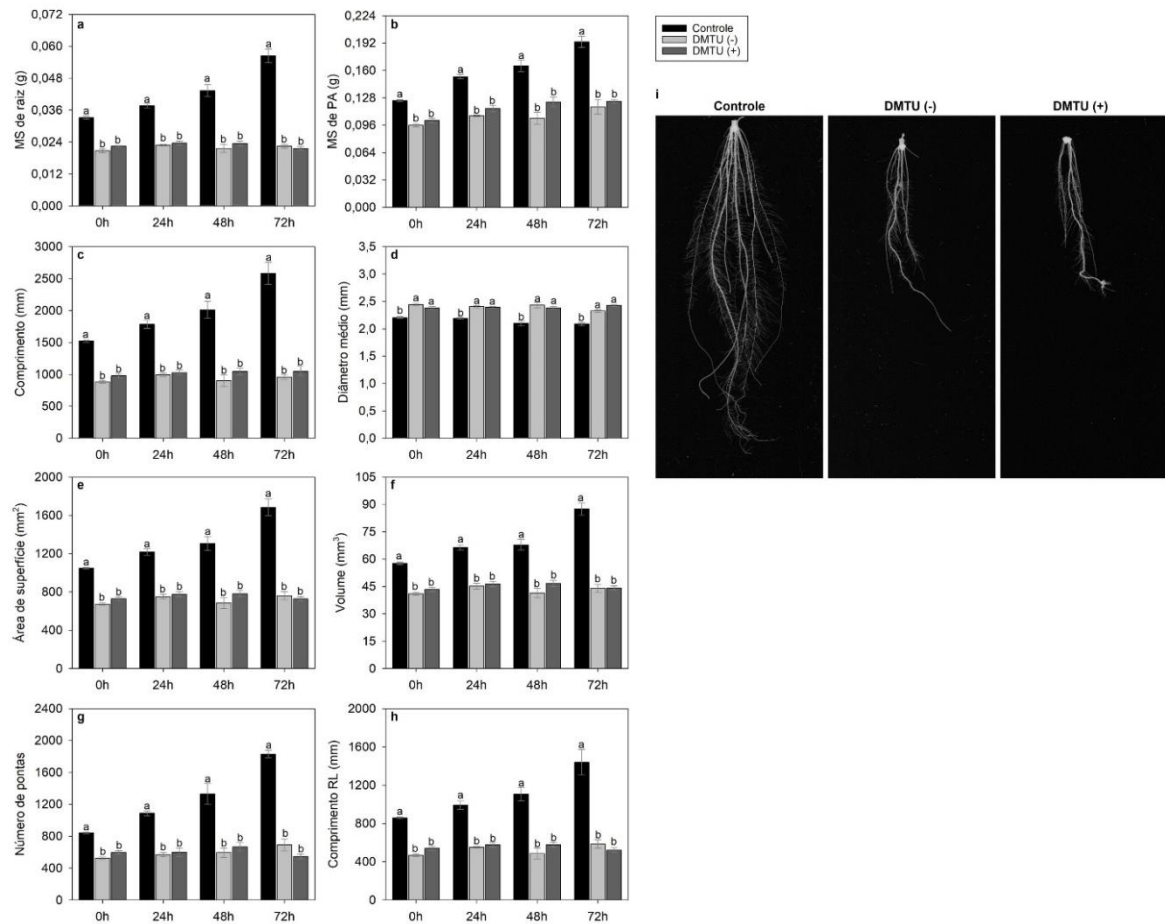


Figura 38. Time-course do inibidor DMTU, inibidor de H_2O_2 . As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-b) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao DMTU. (c-h) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição DMTU. (i) Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. DMTU: N N'-Dimethylthiourea, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em grammas.

7.12 Apêndice XII

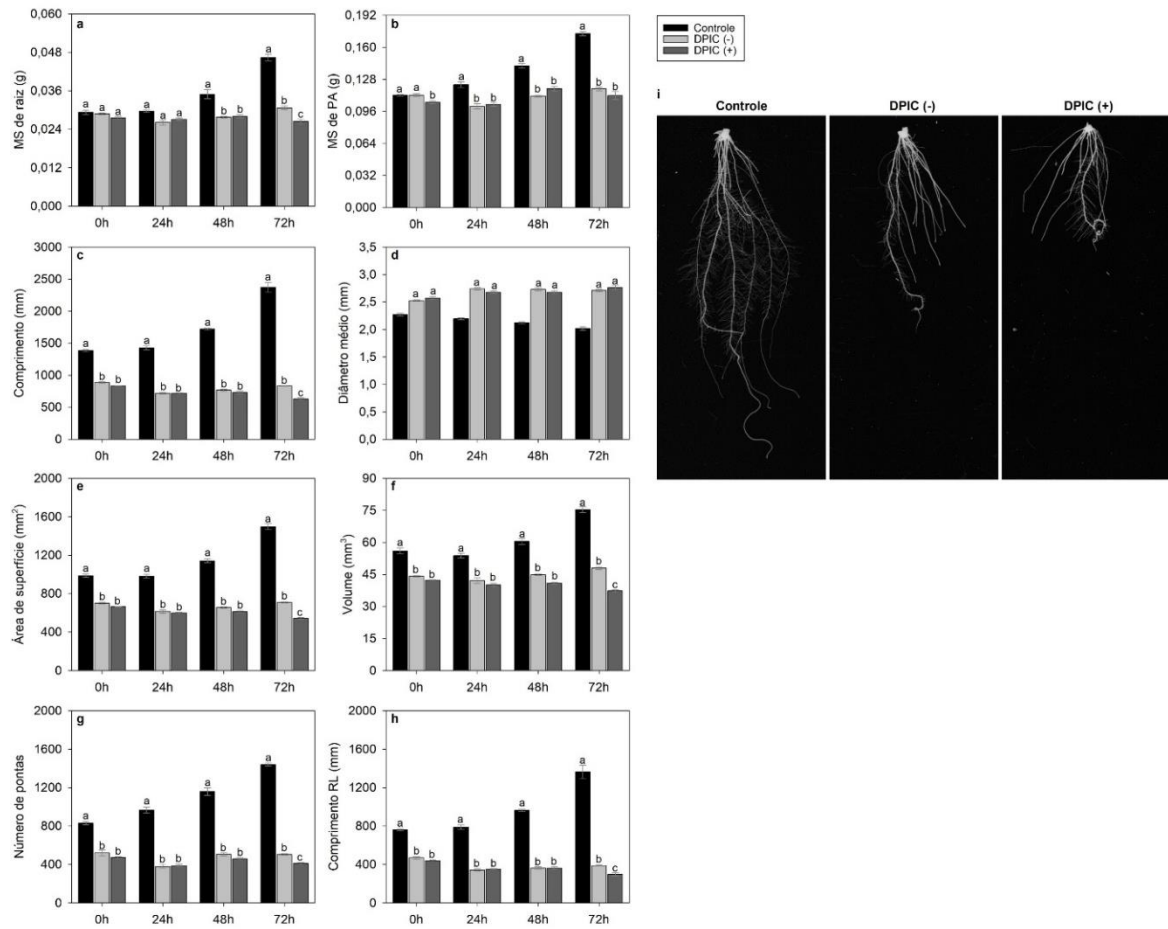


Figura 39. *Time-course* do inibidor DPIC, inibidor de NADPH oxidase. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-b)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao DPIC. **(c-h)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição DPIC. **(i)** Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. DPI: Diphenyleneiodonium chloride, NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

7.13 Apêndice XIII

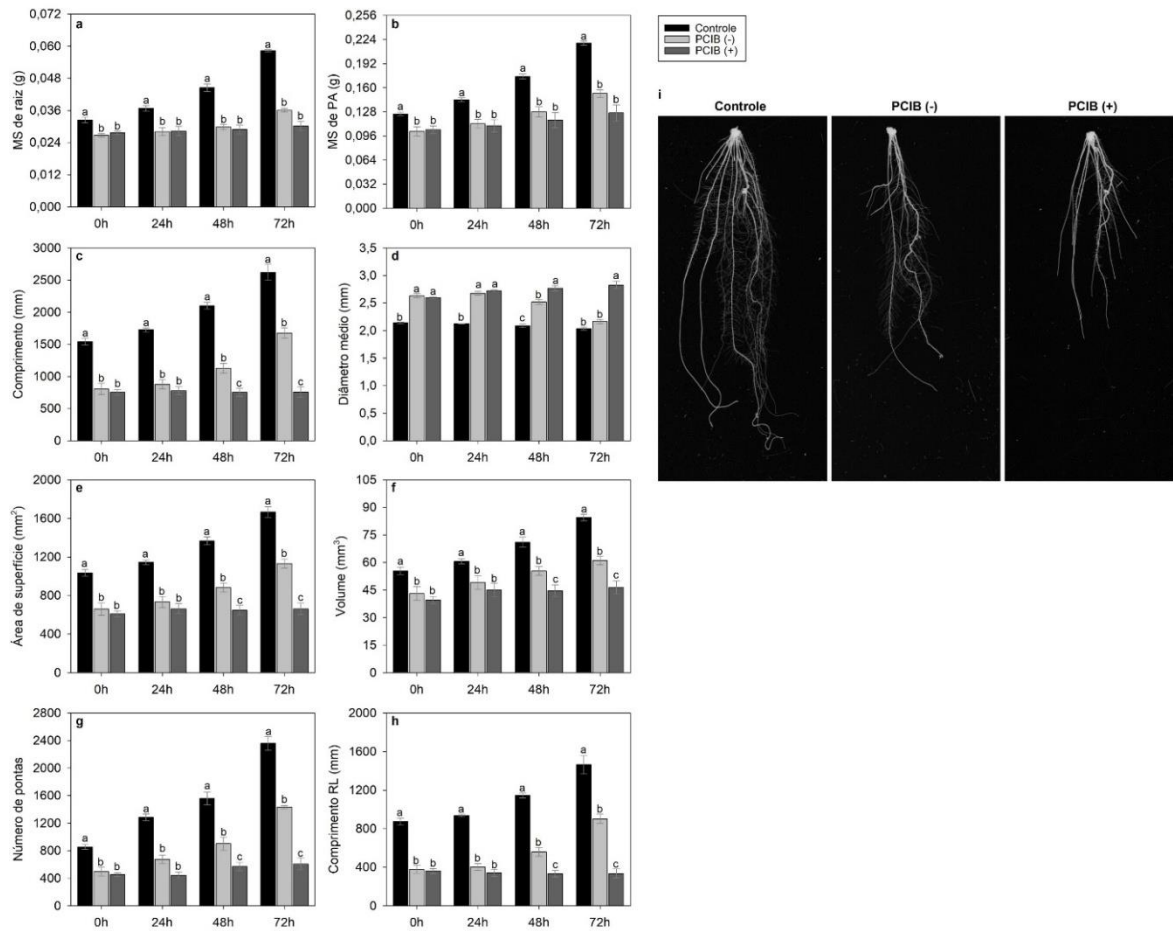


Figura 40. Time-course do inibidor PCIB, inibidor de ação da auxina. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. (a-b) Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao PCIB. (c-h) Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição PCIB. (i) Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. PCIB: Ácido 2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.

7.14 Apêndice XIV

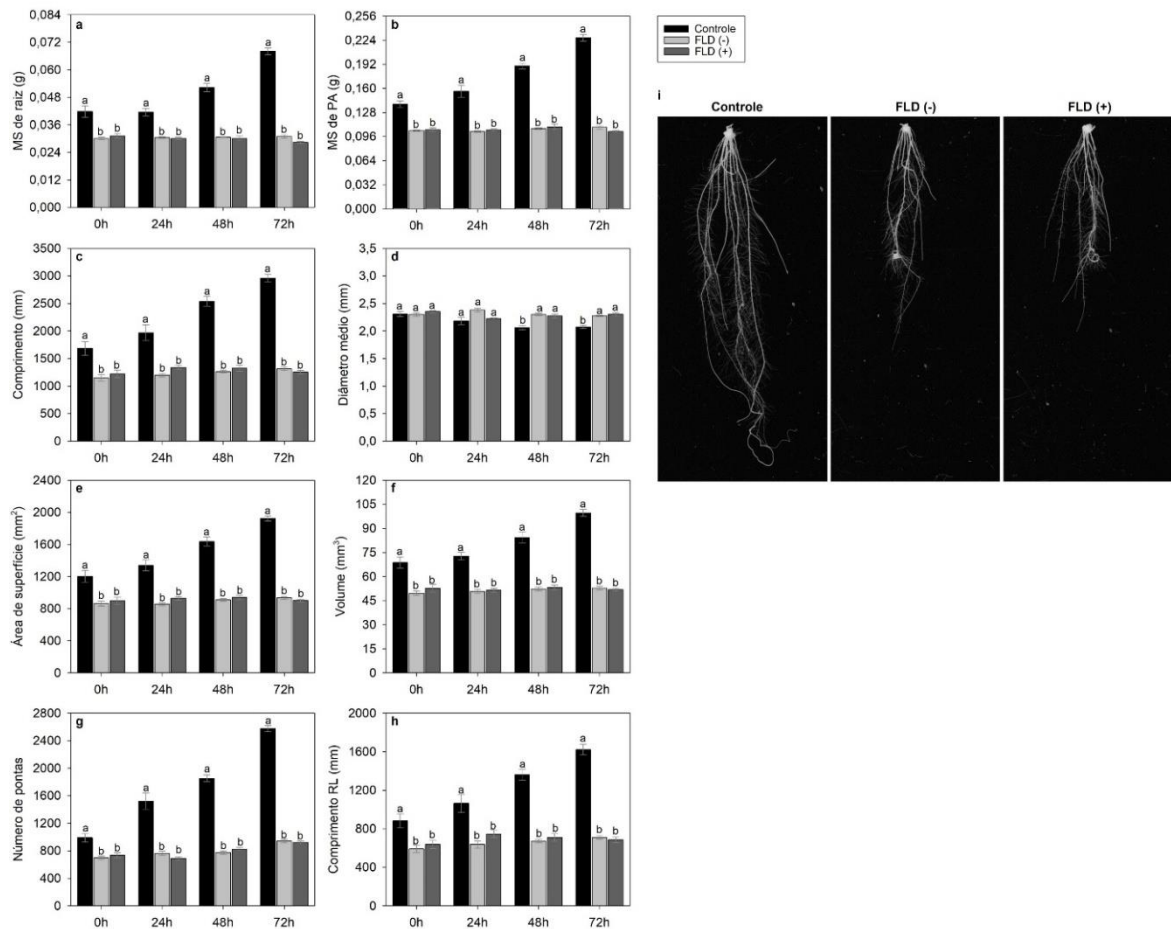


Figura 41. *Time-course* do inibidor FLD, inibidor de ABA. As plantas foram coletadas aos 12 DAG. **(a-b)** Mensuração fisiológica de plantas de arroz durante a exposição ao FLD. **(c-h)** Morfologia radicular de plantas de arroz durante a exposição FLD. **(i)** Imagem de raízes submetidas aos diferentes tratamentos obtidas através do escaneamento utilizando o software WinRhizo Arabidopsis. FLD: Fluridone, ABA: ácido abscísico, DAG: dias após a germinação, PA: parte aérea, MS (g): massa seca em gramas.