

UFRRJ

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

TESE

**Expressão Diferencial de Genes em Plantas de Arroz
Após Curto Período de Exposição ao Ácido Húmico**

José Nivaldo de Oliveira Sátiro

2024



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

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES EM PLANTAS DE ARROZ
APÓS CURTO PERÍODO DE EXPOSIÇÃO AO ÁCIDO HÚMICO**

JOSÉ NIVALDO DE OLIVEIRA SÁTIRO

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 **Doutor**, no
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Ciência do Solo, Área de
Concentração em Fertilidade do Solo e
Nutrição de Plantas.

Seropédica, RJ
Junho de 2024

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

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

S253e	Sátiro, José Nivaldo de Oliveira, 1989- Expressão diferencial de genes em plantas de arroz após curto período de exposição ao ácido húmico / José Nivaldo de Oliveira Sátiro. - Seropédica, 2024. 83 f. : il. Orientador: Leandro Azevedo Santos. Coorientador: Andrés Calderín García. Tese (Doutorado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo, 2024. 1. Ácido húmico. 2. Transcriptoma. 3. Expressão Gênica. 4. Arroz. I. Santos, Leandro Azevedo, 1981-, orient. II. García, Andrés Calderín, 1981-, coorient. III. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo. IV. Título.
-------	---

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

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



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



HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 32 / 2024 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)

Nº do Protocolo: 23083.053240/2024-15

Seropédica-RJ, 30 de setembro de 2024.

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

JOSÉ NIVALDO DE OLIVEIRA SÁTIRO

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

TESE APROVADA EM 23/08/2024.

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Ricardo Luiz Louro Berbara. Dr. UFRRJ

Flavio Couto Cordeiro. Dr. UFRRJ

Leandro Martins Ferreira. Dr. IFMS

Orlando Carlos Huertas Tavares. Dr. Embrapa Agrobiologia

(Assinado digitalmente em 30/09/2024 12:47)
FLAVIO COUTO CORDEIRO
PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR
DQA (11.39.00.22)
Matrícula: 2630672

(Assinado digitalmente em 30/09/2024 14:02)
RICARDO LUIZ LOURO BERBARA
PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR
DeptS (12.28.01.00.00.00.33)
Matrícula: 387406

(Assinado digitalmente em 04/10/2024 21:24)
LEANDRO MARTINS FERREIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 107.560.167-38

(Assinado digitalmente em 02/10/2024 09:36)
LEANDRO AZEVEDO SANTOS
COORDENADOR CURS/POS-GRADUACAO
CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)
Matrícula: 2626406

(Assinado digitalmente em 02/10/2024 21:39)
ORLANDO CARLOS HUERTAS TAVARES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 098.383.947-69

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **32**, ano: **2024**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão: **30/09/2024** e o código de verificação: **1fa56ff9d0**

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família, pelo incentivo constante ao longo desta
jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Maria José de Oliveira Sátiro e Nivaldo Sátiro, por sempre me incentivaram a estudar, trabalhar e nunca desistir dos meus objetivos e por todo o apoio e compreensão ao longo desses anos.

Aos meus amigos, em especial a Thaina Louzada do Santos e ao André Parente Nogueira por todo amparo, apoio e carinho no momento delicado da minha vida.

Aos meus parceiros de moradia, Stallone Soares e André Parente Nogueira com quem compartilhei meus medos, meus anseios, meus desafios e por vezes frustrantes durante o doutorado, mas aliviava em saber que tínhamos um ao outro e sem vocês teria sido bem mais difícil.

Aos meus professores da Escola Maria Santana de Almeida e do Instituto Federal do Paraná – Campus Palmas, por me proporcionar conhecimentos, instigar a pesquisa e pelo incentivo durante toda a minha jornada acadêmica.

Ao meu orientador, Leandro Azevedo Santos, agradeço por me conceder a oportunidade e confiar em mim para levar adiante este projeto e por compartilhar suas ideias e conhecimentos, contribuindo para moldar meu pensamento científico.

Ao meu coorientador, Andrés Calderin García, pelas contribuições ao projeto e pelo conhecimento compartilhado durante a disciplina de Química da Matéria Orgânica, permitindo novos conhecimentos.

Ao Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (LNMP), onde tive a oportunidade de adquirir e compartilhar conhecimentos teóricos e práticos. Agradeço em especial à Andressa Fabiane Faria de Souza, André Parente Nogueira, Clenya Oliveira, Maria Eduarda, Castro Junior e Erinaldo Gomes. Deixo aqui também meu agradecimento a Julia Silva, Dandara Soprani, Rômulo Vallim e a todo o suporte recebido de outros laboratórios, em especial ao Matheus Leal.

Aos professores e aos funcionários do Departamento de solo e da Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do solo por toda contribuição na minha formação.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por me proporcionar conhecimentos sólidos e ampliar minhas perspectivas.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

José Nivaldo de Oliveira Sátiro nascido em Santa Luzia do Pará e registrado em Ourém, Pará. Concluiu o ensino fundamental na Escola Pastor Jaconias Leite da Silva, Guarujá – SP e o ensino médio na Escola Maria Santana de Almeida - Sete Barras, SP. Em 2012, ingressou no curso de graduação em Agronomia do Instituto Federal do Paraná - Campus Palmas, PR. Durante a graduação, foi bolsista por dois anos do CNPq, no Laboratório de Fitopatologia do IFPR, estagiário voluntário em projetos de extensão, trabalhando com implantação de hortas e palestras na APAE de Palmas, PR e estagiário no Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição Mineral de Planta, trabalhando com recuperação de solos degradados. Obteve o título de Engenheiro Agrônomo em 2017. Em março de 2018, ingressou no Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, na Universidade Federal do Paraná, sob orientação do George G. Brown, pesquisador da Embrapa Floresta - Colombo, PR e sob co-orientação do Prof. Antônio Carlos Vargas Motta. Foi bolsista CAPES durante os dois anos do mestrado. Em março de 2020, ingressou no Doutorado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof. Leandro Azevedo Santos e co-orientação do Prof. Andrés Calderín García.

RESUMO GERAL

SÁTIRO, José Nivaldo de Oliveira. **Expressão diferencial de genes em plantas de arroz após curto período de exposição ao ácido húmico**. 2024. 83f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2024.

O uso de bioestimulante tem ganhado visibilidade científica e comercial, e é considerado uma técnica promissora para melhorar o crescimento e desenvolvimento de diversas espécies vegetais. Dentre as substâncias bioestimulantes, o ácido húmico (AH) tem sido objeto de estudo na agricultura devido à sua atuação na aquisição de nutrientes e água, por meio da modulação gênica. Apesar das evidências estabelecidas sobre os efeitos do ácido húmico, muitos aspectos transcricionais ainda necessitam de elucidação. A pesquisa desenvolvida nesta tese busca contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares e fisiológicos por meio do uso do sequenciamento em larga escala de RNA (RNA-Seq). Para tal, as seguintes perguntas foram levantadas: (i) quais concentrações de ácido húmico são capazes de estimular o crescimento do sistema radicular de arroz; (ii) a expressão gênica relativa é alterada com a exposição ao ácido húmico; (iii) o efeito bioativo do ácido húmico pode revelar genes com potencial biotecnológico para promoção de crescimento em plantas de arroz. Com intuito de verificar esses questionamentos, o objetivo dessa pesquisa experimentos foram conduzidos com o propósito final de usar os HA para identificar alvos biotecnológicos para promoção de crescimento em plantas de arroz da variedade Nipponbare. Os objetivos específicos foram: a) estabelecer a concentração ótima de ácido húmico para o maior estímulo ao crescimento do sistema radicular; b) estabelecer o tempo de exposição ao ácido húmico que mostre reposta transcricional; c) determinar os genes diferencialmente expressos por meio da análise de expressão gênica em larga escala (RNA-seq); d) Agrupar os genes diferencialmente expressos por meio de suas ontologias para avaliar os processos ou vias que são preferencialmente afetadas pelo tratamento com os ácidos húmicos. Os dados obtidos sugerem que a dose de 80 mg L⁻¹ AH altera os parâmetros morfológicos das raízes e a biomassa das plantas de arroz em sistema hidropônico. Esta dose proporcionou uma rápida e tardia indução de genes, em 4h e 72h de exposição as plantas, respectivamente. O sequenciamento identificou 239 genes diferencialmente expresso (DEG) na raiz, bem como 55 genes na parte aérea de arroz após 4h de exposição ao HA. Além disso, a maioria dos genes foram regulados negativamente em ambos os tecidos (raiz e parte aérea). A análise de enriquecimento funcional permitiu compreender o perfil funcional de 91 DEG na raiz e 5 DEG na parte aérea. Além disso, foram identificados genes da família DUF, responsáveis em codificar proteínas com funções ainda não conhecidas. Esses resultados fornecem novos *insights* para o desenvolvimento futuras pesquisas, visando obter plantas adaptada às condições adversas.

Palavras-chave: Ácido húmico. Transcriptoma. Expressão Gênica. Arroz.

GENERAL ABSTRACT

SÁTIRO, José Nivaldo de Oliveira. **Differential gene expression in rice plants after short-term exposure to humic acid.** 2024. 83f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2024.

The use of biostimulants has gained scientific and commercial visibility and is considered a promising technique to improve the growth and development of several plant species. Among the biostimulant substances, humic acid (HA) has been the subject of study in agriculture due to its role in the acquisition of nutrients and water through gene modulation. Despite the established evidence on the effects of humic acid, many transcriptional aspects still require elucidation. The research developed in this thesis seeks to contribute to the understanding of the molecular and physiological mechanisms through the use of large-scale RNA sequencing (RNA-Seq). To this end, the following questions were raised: (i) what concentrations of humic acid are capable of stimulating the growth of the rice root system; (ii) is relative gene expression altered with exposure to humic acid; (iii) can the bioactive effect of humic acid reveal genes with biotechnological potential for growth promotion in rice plants. In order to verify these questions, the objective of this research was to conduct experiments with the ultimate purpose of using HA to identify biotechnological targets for growth promotion in Nipponbare rice plants. The specific objectives were: a) to establish the optimal concentration of humic acid for the greatest stimulation of root system growth; b) to establish the time of exposure to humic acid that shows transcriptional response; c) to determine the differentially expressed genes through large-scale gene expression analysis (RNA-seq); d) to group the differentially expressed genes through their ontologies to evaluate the processes or pathways that are preferentially affected by treatment with humic acids. The data obtained suggest that the dose of 80 mg L⁻¹ HA alters the morphological parameters of the roots and the biomass of rice plants in a hydroponic system. This dose provided a rapid and delayed gene induction, in 4h and 72h of exposure to the plants, respectively. Sequencing identified 239 differentially expressed genes (DEG) in the root and 55 genes in the shoot of rice after 4 h of exposure to HA. In addition, most genes were downregulated in both tissues (root and shoot). Functional enrichment analysis allowed us to understand the functional profile of 91 DEG in the root and 5 DEG in the shoot. In addition, genes of the DUF family were identified, responsible for encoding proteins with functions not yet known. These results provide new insights for the development of future research, aiming to obtain plants adapted to adverse conditions.

Key words: Humic acid. Transcriptome. Gene expression. Rice.

LISTA DE ABREVIACÃO

SH	Substância Húmica
AH	Ácido Húmico
AF	Ácido Fúlvico
HU	Humina
AUX	Auxina
AIA	Ácido Indol-3-Acético
DR5-GUS	Promotor de auxina unido ao gene repórter β -glucuronidase
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
O₂[·]	Radical Superóxido
OH[·]	Radical Hidroxila
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
¹O₂	Oxigênio Singleto
SOD	Enzima Superóxido Dismutase
CAT	Enzima Catalase
APX	Enzima Ascorbato Peroxidase
H⁺ATPase	Enzima Transmembranar
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
RNA-Seq	Sequenciamento em Larga Escala de RNA

ÍNDICE DE TABELAS

- Figura 1.** Esquema de cultivo das plantas de arros da variedade Nipponbare, submetidas a dose de 0, 2, 5, 10, 30, 50, 80, 100 e 150 mg de AH L⁻¹ em uma solução de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) com pH 5,8, com suprimento de 2 mM de N (N- NO₃⁻ e N-NH₄⁺) e aos 19 DAG realizou a coleta. DAG: dias após a germinação. 18
- Figura 2.** Curva de calibração de dose resposta de ácido húmico na variável altura da Parte Aérea (A), profundidade radicular (B), Comprimento de Raiz (C), Volume Radicular (D), Massa Fresca de Parte Aérea (MF Parte Aérea) (E), Massa Seca de Parte Aérea (MS Parte (F), Área de Superfície (G), Área de Projeção (H), Massa Fresca de Raiz (MF Raiz) (I), Massa Seca de Raiz (MS Raiz) (J), Diâmetro Médio de Raiz (L), Volume de Raiz (M). Imagem digitalizada do sistema radicular (N, O e P) de plantas de arroz da variedade Nipponbare, tratadas com suprimento de 2 mM de N (N- NO₃⁻ e N-NH₄⁺) por 19 DAG. Tratamentos: 0 mg de AH L⁻¹ (N), 2 mg de AH L⁻¹ (N), 5 mg de AH L⁻¹ (N), 10 mg de AH L⁻¹ (O), 30 mg de AH L⁻¹ (O), 50 mg de AH L⁻¹ (O), 80 mg de AH L⁻¹ (P), 100 mg de AH L⁻¹ (P) e 150 mg de AH L⁻¹ (P). 26
- Figura 3.** Expressão gênica relativa (2^{-ΔΔCT}) dos genes *TOM1*, *OsNRT1.1*, *OsCPK7*, *COPD1*, *OsNRT2.1* e *OsTPC1* diferencialmente expressos em raiz de arroz da variedade Nipponbare, cultivada sem e com ácido húmico em diferentes tempos exposição (0,5h; 2h; 4h; 8h; 24h; 72h e 168h). C/AH = com ácido húmico, S/AH = sem ácido húmico. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos de um mesmo tempo de exposição e as letras minúsculas diferentes, indicam a diferença significativa do tratamento com ácido húmico entre os tempos de exposição pelo teste de Tukey (p< 0,05). 27
- Figura 4.** Expressão gênica relativa (2^{-ΔΔCT}) dos genes *BAS1*, *PRX11*, *GS3*, *GPX*, *CuZnSOD1* e *OsA7* diferencialmente expressos em raiz de arroz da variedade Nipponbare, cultivada sem e com ácido húmico em diferentes tempos exposição (0,5h; 2h; 4h; 8h; 24h; 72h e 168h). C/AH = com ácido húmico, S/AH = sem ácido húmico. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos de um mesmo tempo de exposição e as letras minúsculas diferentes, indicam a diferença significativa do tratamento com ácido húmico entre os tempos de exposição pelo teste de Tukey (p< 0,05). 29
- Figura 5.** Expressão gênica relativa (2^{-ΔΔCT}) dos genes *PHS1*, *SEC1B*, *EF1a*, *TOR*, *HXK5* e *AIA11* diferencialmente expressos em raiz de arroz da variedade Nipponbare, cultivada sem e com ácido húmico em diferentes tempos exposição (0,5h; 2h; 4h; 8h; 24h; 72h e 168h). C/AH = com ácido húmico, S/AH = sem ácido húmico. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos de um mesmo tempo de exposição e as letras minúsculas diferentes, indicam a diferença significativa do tratamento com ácido húmico entre os tempos de exposição pelo teste de Tukey (p< 0,05). 31
- Figura 6.** Eletroferograma de 16 amostra de RNA total de raiz e parte aérea (PA) de cultura de arroz, tratadas com (CAH) e sem (SAH) ácido húmico de vermicomposto por um período de 4h. Classificação de RIN: altamente degradado (RIN 1-3), integridade intermediária (RIN 4-6) e alta integridade (RIN 7-10). 39
- Figura 7.** Análise exploratória dos dados do mapeamento ao transcriptoma de referência por meio da análise de componentes principais (PCA). Tratamento: SAH: sem ácido húmico e CAH: com ácido húmico. 42
- Figura 8.** Frequência absoluta de genes diferencialmente expressos (DEG) (A) e sobreposição entre diferentes contrastes (B), (C) e (D). Contrastes: raiz (root) e parte aérea (shoot), Up-regulated genes: regulação positiva, Down-regulated genes: regulação negativa. 43

- Figura 9.** Análise de enriquecimento funcional para diferentes categorias biológicas, representadas por termos da ontologia gênica (GO) e do bando de dados KEGG (Rota Metabólica). No eixo vertical (y) lista as categorias funcionais, enquanto o eixo horizontal (x) mostra os valores de $-\text{Log}_{10} P$ (p-value ajustado), que indicam o nível de significância estatística do enriquecimento de cada categoria biológica.45
- Figura 10.** Análise de interação de genes diferencialmente expressos (DEG) enriquecidos em resposta ao ácido húmico em plantas de arroz via diagrama de Venn. Raiz: Função Molecular (MF-raiz): cor azul, Processos Biológicos (BP-raiz): cor vermelha, Componentes Celulares (CC-raiz): cor verde, rota metabólica (KEGG): cor amarela. Parte aérea (PA): Componentes Celulares (CC-PA): cor marrom.....46
- Figura 11.** Enriquecimento funcional dos 34 genes diferencialmente expressos (DEG) da interação entre função molecular e processo biológico em resposta ao ácido húmico. Barra laranja: DEG negativamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq -1$, Barra bege: DEG positivamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$. $-\text{Log}_{10} P$: Indica a significância estatística do enriquecimento. Coluna ID: Lista os genes e as respectivas descrições.....48
- Figura 12.** Enriquecimento funcional dos 16 genes diferencialmente expressos (DEG) da interação entre processo biológico e Rota Metabólica em resposta ao ácido húmico. Barra laranja: DEG enriquecidos negativamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq -1$, Barra bege: DEG enriquecidos positivamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$. $-\text{Log}_{10} P$: Indica a significância estatística do enriquecimento. Coluna ID: Lista os genes e as respectivas descrições.51
- Figura 13.** Enriquecimento funcional de genes diferencialmente expressos (DEG) envolvidos em rota metabólica - KEGG (A), componente celular (B) e processo biológico (C) em resposta ao ácido húmico. Barra laranja: DEG enriquecidos negativamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq -1$, Barra bege: DEG enriquecidos positivamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$. $-\text{Log}_{10} P$: Indica a significância estatística do enriquecimento. Coluna ID: Lista os genes e as respectivas descrições.....56
- Figura 14.** Enriquecimento funcional de genes diferencialmente expressos (DEG) envolvidos no componente celular da parte aérea de arroz em resposta ao ácido húmico. Barra laranja: DEG regulados negativamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq -1$, Barra bege: DEG regulados positivamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$. $-\text{Log}_{10} P$: Indica a significância estatística do enriquecimento. Coluna ID: Lista os genes e as respectivas descrições.57

ÍNDICE DE FIGURAS

Tabela 1. Bandas de absorção e grupos funcionais de ácido húmico de vermicomposto via técnicas de espectroscópicas de infravermelho com reflectância atenuada (ATR-FTIR).	17
Tabela 2. Quantidade relativa (%) dos tipos de carbono em amostra de AH proveniente de vermicomposto.	17
Tabela 3. Genes responsivos ao ácido húmico em cultura de arroz (<i>Oryza sativa</i>) a partir de estudos prévios.....	19
Tabela 4. Os primers utilizados no experimento de expressão gênica relativa em cultura de arroz tratada com ácido húmico.....	20
Tabela 5. Valores da variabilidade dos genes de referência obtidos através do erro padrão, realizado na expressão gênica relativa. Ubiquitina 5 (OsUBQ5) e actina (OsACT1).....	22
Tabela 6. Sequências dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> usados nas reações de RT-PCR em Tempo Real.	22
Tabela 7. Cálculo das coordenadas do vértice das doses de ácido húmico nos parâmetros morfológicos de arroz da variedade Nipponbare.....	24
Tabela 8. Estatísticas descritivas do controle de qualidade de sequências RNA-Seq de amostras de raiz e parte aérea (PA) de cultura de arroz tratadas com e sem ácido húmico. CAH: Com ácido húmico e SAH: sem ácido húmico.....	40
Tabela 9. Porcentagem de mapeamento das reads no transcriptoma de referência.....	41
Tabela 10. Genes diferencialmente expressos (DEG) na raiz de arroz em resposta ao ácido húmico com relação comum entre processo biológico e componente celular em resposta ao ácido húmico. $\text{Log}_2 \text{FC} \geq -1$: Regulação negativa. $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$: Regulação positiva. $-\text{Log}_{10} \text{P}$: Indica a significância estatística do enriquecimento.	52
Tabela 11. Genes diferencialmente expressos (DEG) nas raízes de arroz em resposta ao ácido húmico. 6 DEG enriquecidos apresentam relação comum entre processo biológico – componente celular – KEGG e 4 DEG componente celular – KEGG enriquecidos apresentam relação comum entre componente celular – KEGG. $\text{Log}_2 \text{FC} \geq -1$: Regulação negativa. $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$: Regulação positiva. $-\text{Log}_{10} \text{P}$: Indica a significância estatística do enriquecimento.	53
Tabela 12. Genes diferencialmente expressos (DEG) na raiz de arroz em resposta ao ácido húmico com relação comum entre função molecular e KEGG em resposta ao ácido húmico. $\text{Log}_2 \text{FC} \geq -1$: Regulação negativa. $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$: Regulação positiva. $-\text{Log}_{10} \text{P}$: Indica a significância estatística do enriquecimento.	54
Tabela 13. Relação de genes estudados e seus respectivos detalhes.	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Cultura de Arroz	2
2.2 Substância Húmica	4
2.3 Ação do Ácido Húmico no Desenvolvimento da Planta	5
2.3.1 Efeito do ácido húmico sobre o sistema radicular	5
2.3.2 Ação fitohormonal tipo auxina do ácido húmico.....	7
2.3.3 Proteção do ácido húmico contra espécies reativas de oxigênio.....	8
2.3.4 Ação Direta do ácido húmico sobre expressão gênica relativa relacionada a nutrientes	10
2.4 Sequenciamento em Larga Escala de RNA	11
3 CAPÍTULO I EFEITOS DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO ÁCIDO HÚMICO NA RESPOSTA TRANSCRICIONAL EM PLANTAS DE <i>ORYZA SATIVA</i>	13
3.1 RESUMO.....	14
3.2 ABSTRACT.....	15
3.3 INTRODUÇÃO	16
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.4.1 Obtenção do ácido húmico.....	17
3.4.2 Experimento I: curva de calibração da dose reposta de ácido húmico	17
3.4.3 Estudo de expressão gênica relativa.....	19
3.4.4 Análise estatística.....	23
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.5.1 Dose resposta de maior estímulo de ácido húmico em plantas de arroz.....	24
3.5.2 Determinação do tempo de maior indução de genes responsivos ao ácido húmico.....	27
3.6 CONCLUSÃO	32
4. CAPÍTULO II RESPOSTA TRANSCRICIONAL DE <i>ORYZA SATIVA</i> À APLICAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO	33
4.1 RESUMO.....	34
4.2 ABSTRACT.....	35
4.3 INTRODUÇÃO	36
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.4.1 Obtenção do RNA	37
4.4.2 Análise da integridade das amostras de RNA total.....	37
4.4.3 Preparação das bibliotecas e sequenciamento de RNA.....	37
4.4.4 Análise dos dados do sequenciamento de RNA.....	37
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.5.1 Avaliação da integridade das amostras de RNA e pré-processamento das “reads”	39
4.5.2 Análise de genes diferencialmente expresso.....	43
4.5.3 Análise de enriquecimento funcional.....	44

4.5.4 Grupo de genes envolvidos na função molecular e no processo biológico.....	46
4.5.5 Grupo de genes envolvidos no processo biológico e na rota metabólica.....	49
4.5.6 Pequeno grupo de genes envolvidos em duas ou mais categorias biológicas.....	52
4.5.7 Grupo de genes exclusivos envolvidos em processo biológico, componente celular e rota metabólica	54
4.6 CONCLUSÃO	58
5 CONCLUSÃO GERAL	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7. APÊNDICE	83

1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é um dos cereais mais consumidos e produzidos no mundo (FAO, 2022), sendo de vital importância econômica e social para muitos países em desenvolvimento, constituindo a base alimentar de mais da metade da população global (FERREIRA, 2017; SOUZA, 2018). No Brasil, este cereal é um componente essencial da dieta fornecendo cerca de 20% da energia e 15% da proteína total necessária (LAM-SÁNCHEZ et al., 1994; OLIVEIRA NETO, 2015).

Devido ao aumento contínuo da população mundial e as mudanças climáticas têm gerado desafios significativos para o desenvolvimento e a produtividade do arroz (QIAN et al., 2016; FERREIRA, 2017). Neste contexto, as substâncias húmicas, particularmente o ácido húmico, emergem como alternativas promissoras para a rizicultura, proporcionando tolerância às adversidades ambientais as plantas (FERRERA, 2017; ZENKER, 2021; SILVA, 2020).

As substâncias húmicas são compostos complexos e multifuncionais obtidos a partir da decomposição da matéria orgânica e, é fracionada em ácido húmico, ácido fúlvico e humina, baseada na solubilidade (BORCIONI et al., 2016; PINTO, 2016; MARTINS, 2017). Estes compostos podem influenciar positivamente as plantas, atuando na sinalização celular, nutrição e proteção contra estresses, por meio de mecanismos de ação direta e indireta (DOBBSS et al., 2010; TREVISAN et al., 2011; AGUIAR et al., 2015; GARCÍA et al., 2018).

Especificamente, o ácido húmico tem demonstrado efeitos significativos na morfologia radicular, fisiologia, metabolismo e expressão gênica das plantas, contribuindo para uma melhor utilização dos recursos naturais e maior tolerância às condições adversas (VACCARO et al., 2015; OLAETXEA et al., 2017; GARCÍA et al., 2018). Estudos mostram que a substância húmica, quando aplicada ao sistema radicular de diversas culturas, pode acessar receptores hormonais e induzir a expressão de genes importantes para a síntese de H^+ -ATPase, que são essenciais para a absorção de nutrientes e o crescimento celular (TAVARES et al., 2017; AZEVEDO et al., 2019).

O uso de bioestimulante, como o ácido húmico está ganhando significativa visibilidade científica e comercial, por estar sendo considerado uma técnica promissora para melhorar a sustentabilidade ecológica da produção agrícola, desencadeando uma série de processos que promovem o crescimento e adaptação das plantas às condições de estresse, contribuindo para reduzir o uso de fertilizantes e pesticidas (CONSELVAN et al., 2017; GEMIN, MÓGOR, MOGOR, 2019; OLIVEIRA, 2020; CANELLAS et al., 2015, 2020; SILVA, 2022).

Com bases nessas informações, a pesquisa desenvolvida nessa tese busca contribuir para o entendimento das interações entre planta e o ácido húmico, utilizando tecnologias avançadas como a análise de transcriptômica. As seguintes perguntas foram levantadas: (i) quais concentrações de ácido húmico são capazes de estimular o crescimento do sistema radicular; (ii) se a expressão gênica relativa é alterada com a exposição ao ácido húmico; (iii) se o efeito bioativo do ácido húmico pode revelar genes com potencial biotecnológico para promoção de crescimento em plantas de arroz. Desta forma, o presente trabalho encontra-se dividido em capítulos que representam as diferentes etapas da pesquisa:

Capítulo I - Efeitos do tempo de exposição ao ácido húmico na resposta transcricional em plantas de *Oryza sativa*. Com objetivo de determinar o tempo de exposição ao AH de vermicomposto, necessário para obter resposta de plantas de arroz em nível transcricional, para, a partir desses dados, identificar alvos biotecnológicos potencialmente envolvidos com a promoção do crescimento vegetal e/ou envolvidos com mecanismos de tolerância a estresse.

Capítulo II - Resposta transcricional de *Oryza sativa* à aplicação de ácido húmico. Com objetivo de investigar a influência do AH nos níveis de expressão gênica em arroz por meio da tecnologia de sequenciamento em larga escala de RNA (RNA-Seq), para identificar genes potencialmente envolvidos em mecanismo de sinalização para a promoção do crescimento radicular e/ou tolerância das plantas a estresses.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura de Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das espécies de grande relevância mundial, tornando o segundo cereal mais produzido (FAO, 2022; PEREIRA et al., 2022). Este cereal é uma angiosperma monocotiledônea, da família Poaceae, da subfamília Ehrhartoideae (Oryzoideae), da tribo Oryzeae e do gênero *Oryza* (PINTO, 2017). Os inúmeros parentes silvestres deste cereal encontrados no continente Asiático, Africano, Australiano e nas Américas Central e do Sul, indica que a sua origem seja do antigo continente Gondwana, que a partir da fragmentação da Pangeia, permitiu que as espécies fossem derivadas em diferentes localidades geográficas (PINTO, 2017).

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.

Das 27 espécies existentes no mundo, somente duas são cultivadas: *Oryza sativa* L. de cariopse clara (Asiática) e a *Oryza glaberrima* de cariopse roxa (Africana) (FERNANDES, 2016; PINTO, 2017). A espécie asiática possui três subespécies, a Japônica, a Índica e a Javânica. A subespécie Japônica é amplamente produzida na Ásia, África e Europa em regiões de clima temperado e tropical. As espécies Índica e Javânica são cultivadas no Brasil e apresentam genótipos de arroz irrigado e sequeiro, respectivamente (SOARES, 2005; FERNANDES, 2016).

A domesticação do arroz sucedeu-se em vários locais da Ásia de forma independente e simultânea. Sendo cultivado em clareiras por meio de semeaduras diretas e sem alagamento do solo (PINTO, 2017). A partir do refinamento dos processos de cultivo na China, o arroz foi totalmente domesticado, permitindo, assim, a produção em diferentes sistemas de plantio (PINTO, 2017). Atualmente, cultiva-se o arroz em três sistemas: irrigado, várzeas e terras altas (sequeiros) (SANTOS, 2017). Sendo que, no sistema irrigado, o arroz é cultivado sob irrigação por inundação controlada. No sistema de várzeas a inundação acontece por meio da água pluvial que permanece por um tempo no terreno. No sistema de sequeiro, o cultivo do arroz é totalmente dependente de água da chuva ou de irrigação por aspersão (SANTOS, 2017). Esses sistemas são responsáveis, por 75%, 19% e 4%, respectivamente, da produção mundial de arroz (Santos, 2017).

O ciclo de desenvolvimento deste cereal é dividido em fase de plântula, vegetativa e reprodutiva (SOUZA, 2018). A duração de cada fase depende da cultivar, época de semeadura, região de cultivo e a fertilidade do solo (SOUZA, 2018). O ciclo das cultivares plantadas em sistema de inundação varia entre 100 a 140 dias e, para as cultivares do sistema de sequeiro o ciclo é de 110 dias (SOUZA, 2018).

O arroz (*Oryza sativa*) desempenha um importante papel na dieta básica de cerca de 2,4 bilhões de pessoas, por ser a principal fonte de energia, por possuir alto teor de amido e, também, por conter proteínas, vitaminas e nutrientes. Sua importância não restringe apenas econômica, mas também social (SOUZA, 2018). Este cereal ocupa cerca de 8% (157 milhões de hectares) das áreas cultivadas no mundo e representa 30% (740 milhões de toneladas) do total de grão produzidos mundialmente, totalizando 13% de todo valor comercial (US\$ 206 bilhões) (SATO; REIS, 2022).

Na Ásia concentra-se mais de 90% de toda a produção e consumo mundial do grão de arroz. Tornando-o o cultivo de maior importância para os habitantes dos países em desenvolvimento, como os pertencentes ao continente Asiático, em especial por alimentar mais de 60% da população da China e contribuir com 40% do consumo de calorias (SOUZA, 2018;

SATO, REIS, 2022). O consumo mundial médio de arroz é de cerca de 60 kg/ano por pessoa. O continente Asiático é o maior consumidor, com consumo médio de 100 a 150 kg/ano por pessoa. Sendo assim, nutrindo mais de 520 milhões de habitantes em situação precária (SOUZA, 2018; PEREIRA et al., 2022). A América Latina tem consumo médio de 30 kg/ano por pessoa e o Brasil tem consumo médio de 45 kg/ano por pessoa, ficando em décima posição (7,8 milhões de toneladas) no ranking mundial de consumo (SOUZA, 2018).

O arroz além de ser consumido *in natura* pela população japonesa, também é usado na fabricação de bebida alcoólica (saquê), de vinagre e já a palha é utilizada na confecção de utensílios (esteiras, calçados e cestas). Em outras partes do mundo, a palhada do arroz é usada para produção de ração animal, fertilizantes e cobertura do solo (SOUZA, 2018).

O cultivo de *Oryza sativa* L. no Brasil, iniciou-se em 1530 por meio de frotas de navios negreiros (CARNEY, 2017). Desde então, o cereal expandiu-se em pequenos cultivos de subsistência em regiões litorâneas do Maranhão. Em 1904 implantou-se o primeiro cultivo empresarial de arroz irrigado (CARNEY, 2017). Com 77,9% da produção de arroz, o Brasil tornou-se o maior produtor e consumidor deste cereal em relação aos demais países da América do Sul (SANTOS, TAVARES, 2018). É estimado na safra 2023/2024 aumento de 6,7% (1.254,7 mil ha) de áreas cultivadas com arroz em sistema irrigado e uma expansão de 5,5% na área cultivada em sistema sequeiro, estimando 320,2 mil ha para safra de 2023/2024, em comparação à safra de 2022/2023 (CONAB, 2024).

A rizicultura brasileira está presente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Maranhão, Tocantins, Mato Grosso, Pará e Goiás (CONAB, 2024). Os estados da região Norte apresentaram queda na produtividade de arroz (kg/ha) no sistema de sequeiro. No Tocantins, estima-se uma redução de 2.331 kg/ha para 2.292 kg/ha, e no Pará, de 2.600 kg/ha para 2.266 kg/ha, durante a safra 2023/2024. Para essa mesma safra, no estado do Pará, estima-se uma área cultivada de 29,9 mil ha no sistema de sequeiro e 5,2 mil ha no sistema irrigado, com produtividades de 2.466 kg/ha e 7.000 kg/ha, respectivamente (CONAB, 2024).

O Maranhão apresentou uma redução na área cultivada em sistema de sequeiro, passando de 91,5 mil ha para 83,1 mil ha, com uma produtividade de 2.062 kg/ha, enquanto a área em sistema irrigado foi de 3,6 mil ha, com uma produtividade de 5.977 kg/ha. Os estados de Mato Grosso e Goiás, por sua vez, totalizam uma área de 100,2 mil ha de cultivo de arroz em sistema de sequeiro na safra 2023/2024 (CONAB, 2024).

Entre os estados da região Sul, o Rio Grande do Sul se destaca, sendo responsável, sozinho, por cerca de 68% da produção nacional de arroz (SOUZA, 2018; SANTOS, TAVARES, 2018). A produção desse cereal pode alcançar aproximadamente 13,7 milhões de toneladas, representando um aumento de 11,1% em comparação à safra 2022/2023. O consumo doméstico também deve aumentar em 8,9%, chegando a 13,2 milhões de toneladas (SATO, REIS, 2022). Apesar da maior parte da produção de arroz ser destinada ao mercado interno, o Brasil ocupa a oitava posição entre os maiores exportadores do grão, tendo como principais compradores a Arábia Saudita, China, Estados Unidos e Irã (SOUZA, 2018).

No entanto, a rizicultura tem enfrentado inúmeros desafios devido aos estresses ambientais que comprometem a sua produtividade (WASSMANN et al., 2009; HISYAM et al., 2017). Fatores como seca prolongada, inundação e temperaturas extremas afetam diretamente o ciclo vegetativo, resultando em perdas significativas (WASSMANN et al; 2009; HISYAM et al., 2017; HUSSAIN et al., 2020; RATMINI, IRSAN, 2021). As mudanças climáticas globais intensificam esses estresses ambientais, ameaçando a segurança alimentar. O aumento das temperaturas acelera a evapotranspiração, diminuindo a disponibilidade de água no solo e exacerbando as condições de seca, além disso, eventos climáticos extremos, como enchentes, podem destruir plantações inteiras em poucas horas (WASSMANN et al; 2009; BHOWMICK et al., 2020).

Países asiáticos têm investidos em pesquisas ao desenvolvimento de variedades de arroz tolerante à seca, permitindo a produção em terras altas com potencial semelhante ao das terras baixas, com teor de água entre 70% e 100% da capacidade de retenção durante o crescimento das plantas (PARTHASARATHI, 2012). Portanto, é essencial investir em pesquisas para mitigar esses impactos, através do desenvolvimento de variedades de arroz resistentes e de práticas agrícolas sustentáveis que conservem recursos naturais e assegurem a produtividade ao longo dos anos (PARTHASARATHI, 2012; RATMINI, IRSAN, 2021).

2.2 Substância Húmica

A Substâncias Húmicas (SH) são compostos naturais formadas a partir da degradação química, física e microbiológica dos tecidos vegetais e animais por meio do processo de humificação (GARCÍA et al., 2018, 2019; BENTO, 2019; ILHA, 2022) e da variação das condições ambientais (tipo de vegetação, relevo e clima) e estão presentes em água, solos e sedimentos (GARCÍA et al., 2018).

Os primeiros relatos de publicações sobre a SH, em relação ao seu isolamento e fracionamento químico, aconteceram em 1786 por Franz Karl Achard, que ao submeter turfas a hidróxido de potássio obteve uma solução escura, denominada de ácido húmico, através da precipitação em meio ácido (SILVA, 2015; HAYES, SWIFT, 2018; ARAÚJO, 2019; ILHA, 2022). O fracionamento químico permitiu classificar a SH com base nas suas características de solubilidade em função do pH, em ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF) e humina (HU) (DIDONATO et al., 2016; PINHEIRO et al., 2017; SHAH et al., 2018; ILHA, 2022, SOUZA et al., 2022).

O AH pode ser constituído por estruturas de compostos hidrofóbicos. Apresenta coloração escura, é composto por macromoléculas de elevada massa molecular. É solúvel em meio alcalino e insolúvel em $\text{pH} < 2$ (BENTO, 2019; GARCÍA et al., 2019; SOUZA et al., 2022). O AF é a fração da SH considerada uma associação de moléculas hidrofílicas, com maior conteúdo de grupos funcionais oxigenados, que conferem maior reatividade. A presença de cadeia alifáticas aumenta a área superficial da estrutura do AF que permite manter-se solúvel em meio aquoso em qualquer faixa de pH (DIDONATO et al., 2016; GARCÍA et al., 2018; BENTO, 2019; GARCÍA et al., 2019; ILHA, 2022, SOUZA et al., 2022). A HU constitui aproximadamente metade da SH presentes no solo e mais de 70% daquelas encontradas em sedimentos litificados, sendo, portanto, a fração mais abundante das SH. Sua importância é destacada pela contribuição na melhoria das propriedades do solo e no sequestro de carbono atmosférico. No entanto, a HU tem sido a fração húmica menos estudada até o momento, em função das dificuldades associadas ao seu isolamento, que envolve uma série de problemas metodológicos (WEBER et al., 2022). A HU é insolúvel em qualquer faixa de pH e fortemente ligada à fração mineral do solo, o que explica sua elevada estabilidade no ambiente e sua insolubilidade em meio aquoso. Além disso, apresenta menor acidez em comparação aos ácidos fúlvicos (AF) e húmicos (AH) (CARON et al., 2015; DIDONATO et al., 2016; GARCÍA et al., 2018; ARAÚJO, 2019; SOUZA et al., 2022).

Portando, com o isolamento e fracionamento da SH, entende que as frações húmicas fazem parte de uma estrutura extremamente heterogênea que são diferenciadas, conforme, as variações na sua composição química, acidez, grau de hidrofobicidade e associações com moléculas (SOUZA et al., 2022).

No que diz respeito a estrutura das SH, por muitos anos é um desafio à comunidade científica em determinar um modelo estrutural único, devido a elevada heterogeneidade estrutural que explique e justifique a funcionalidade e propriedades químicas dos compostos de SH no ambiente (GARCÍA et al., 2018, 2019; ARAÚJO, 2019; BENTO, 2019). Durante esses anos de pesquisa, foram propostos três modelos estruturais: modelo macromolecular, modelo

micelar e modelo supramolecular, que explica com maior proximidade, os modos de ação das SH no ambiente (GARCÍA et al., 2018; ARAÚJO, 2019).

O Modelo Macromolecular explica a estrutura das SH como sendo macromoléculas orgânicas que apresentam espaços vazios de diferentes tamanhos que podem ligar monômeros de menor massa molecular e outros compostos orgânicos, hidrofílicos ou hidrofóbicos (carboidratos e lipídeos) (GARCÍA et al., 2018; WANDERLEY, 2018). O Modelo Micelar explica que as SH são macroestruturas, constituídas de macromoléculas aderidas de associações de pequenas moléculas em estruturas micelares, com regiões hidrofílicas, composta por agrupamentos polares e hidrofóbicas, com estruturas apolares (GARCÍA et al., 2018). E por último, o Modelo Supramolecular é uma associação de pequenas moléculas heterogêneas, estabilizadas por ligações fracas com características hidrofóbicas (GARCÍA et al., 2018; Araújo, 2019). Estruturalmente as frações húmicas apresentam similaridades e diferem no peso molecular e nos grupos funcionais (BORCIONI et al., 2016; PINTO, 2016; PINOS, 2018; CASTRO et al., 2019; ARAÚJO, 2019).

As estruturas das SH promovem ação na atividade biológica nas plantas, por apresentarem grande variabilidade e heterogeneidade organizacional e de grupos funcionais (SOUZA et al., 2022). Portanto, as características estruturais, tipo de carbono, grupamentos funcionais e interações entre fragmentos estruturais (π - π , CH- π , van der Waals e ponte de H) das frações húmicas (AH e AF), determinam as propriedades responsáveis pelas funções das SH nas plantas em promover o estímulo do crescimento do sistema radicular, atividade enzimática, indução e repressão de genes e o aumento da biomassa em diversas espécies vegetais (BORCIONI et al., 2016; SOUZA et al., 2022).

2.3 Ação do Ácido Húmico no Desenvolvimento da Planta

2.3.1 Efeito do ácido húmico sobre o sistema radicular

O efeito do ácido húmico (AH) no desenvolvimento da planta refere-se aos impactos que essa substância orgânica pode ter no crescimento, na fisiologia e na saúde geral das plantas (SOUZA, 2019; AMPONG et al., 2022). O AH é uma das frações das substâncias húmicas encontradas no solo, sendo conhecido por sua capacidade de interagir com as raízes das plantas e influenciar uma série de funções fisiológicas e bioquímicas (TAVARES, 2014; AMPONG et al., 2022; VIKRAM et al., 2022).

O desenvolvimento do sistema radicular é fundamental para o aumento do nível produtivo e do crescimento ideal de diversos vegetais (TAVARES, 2014). A distribuição do sistema radicular pode afetar diversas funções fisiológicas, como a absorção de água, aquisição de nutrientes, a capacidade de apresentar plasticidade em adaptação a condições adversas e a interação com os organismos da rizosfera (CANELLAS, OLIVEIRA, 2014; TAVARES, 2014; FERREIRA et al., 2020).

A arquitetura e distribuição do sistema radicular são fatores limitantes do crescimento e desenvolvimento das plantas, visto que são incumbidos em determinar a capacidade das plantas em perceber as mudanças dos fatores abióticos, como o nível de água no solo, textura do solo e a composição de nutrientes (FERREIRA et al., 2020). Por exemplo, o sistema radicular mais profundo pode ser crucial durante período de estresse hídrico (PIERRE et al., 2016), além de favorecer a absorção de nitrato, um ânion que apresenta alta mobilidade que pode ser facilmente lixiviado para as camadas mais profundas do solo (SILVA et al., 2017; LYU et al., 2024), enquanto o sistema radicular mais curto permite a exploração de nutrientes mais em superfície do solo, por investir no crescimento de raízes laterais que são úteis na absorção de nutrientes com baixa mobilidade no solo, em especial o fósforo (LYNCH, 2022).

O formato do sistema radicular da cultura do arroz é moldado, conforme a textura do solo, disponibilidade hídrica, compactação do solo e o método de cultivo. É caracterizado por um sistema radicular mais superficial em relação a outros cereais (GOWDA et al., 2011). Este cereal quando comparado com outras culturas de interesse agrícola, possui um sistema radicular menos eficiente para captação de água e nutrientes, provavelmente por um cereal considerado semiaquático, condição em que não há limitação hídrica, consequentemente os nutrientes estão mais homogeneamente distribuídos na solução do solo, isso explica em parte a baixa produtividade desta cultura em sistema de sequeiros (terras altas) (FAGERIA, 1984; GUIMARÃES et al., 2002; FERNANDES, 2016). Nos últimos anos muitos estudos têm comprovado a capacidade do AH em modificar o crescimento, a morfologia e a arquitetura radicular de várias espécies de plantas (CANELLAS et al., 2010; CASTRO et al., 2019; NARDI et al., 2016; HITA et al., 2020).

O efeito positivo das substâncias bioativas em diversas plantas, pode ser dividido em dois principais tipos (MORA et al., 2012; TAVARES, 2014). O efeito na morfologia das raízes individuais que envolve o número, tamanho e tipos de células, raízes laterais e pelos radiculares e, o efeito morfológico sobre toda a raiz, onde altera a arquitetura radicular, densidade e a ramificação da raiz secundária, como também, a espessura da raiz (MORA et al., 2012; TAVARES, 2014).

Estudo com diferentes concentrações das frações húmicas de vermicomposto têm mostrado efeitos significativos sobre o crescimento radicular em plantas de *Arabidopsis* e milho (CANELLAS et al., 2010). Em *Arabidopsis*, os AH promoveram o aumento da raiz principal quando aplicados em diversas concentrações. Além disso, as frações húmicas de vermicomposto demonstraram um efeito bioativo (auxínico), aumentando o número e o comprimento das raízes laterais, assim como a densidade das raízes tanto em *Arabidopsis* quanto em milho. Em relação ao número e comprimento das raízes laterais e a densidade das raízes nas plantas, o efeito bioativo das frações de AH (CANELLAS et al., 2010).

García et al. (2016a) ao realizar estudo de análise de componentes principais entre os dados espectrais de diferentes frações húmicas e os parâmetros de atividade biológica no sistema radicular observaram que a estrutura do AH contendo C-alifáticos substituídos (C-Alk [O, N], C-Alk-O), carboxílicos C-COOH e a alifaticidade, estimula a área superficial, comprimento da radícula e das raízes menores em plantas de arroz, enquanto os grupos de C-alifático substituído (A-Alk [di-O]), C-Alifático não substituído (A-Alk), C-Aromático e carbonil CC=O e a aromaticidade associaram-se ao estímulo do diâmetro radicular, número de raízes e o desenvolvimento das raízes maiores.

O AH acumula-se na superfície das paredes celulares, particularmente nas células epidérmicas por meio da interação com as raízes e ocasiona a obstrução dos poros (García et al., 2019). Para Asli e Neumann (2010) essa interação é denominada como estresse coloidal que tem efeito na redução da condutividade hidráulica das raízes, no crescimento das folhas e na resistência ao déficit hídrico sem causar danos na taxa de crescimento do sistema radicular. Jannin et al (2012) ao estudar Colza de inverno (*Brassica napus L.*) uma importante cultura agrícola para fins de produtos cosméticos e para aplicações industriais na alimentação animal notaram que aplicação de AH de turfa preta após 30 dias, as plantas tiveram melhor desenvolvimento e aumento significativo na massa seca total, em razão ao efeito bioativo sobre o aumento do peso total do sistema radicular em relação as plantas controle.

As substâncias bioativas podem ser disponibilizadas as plantas por meio da aplicação via sistema radicular e foliar (HITA et al., 2020). Por não ser normalmente utilizada, a aplicação via foliar de AH em plantas, Hita et al. (2020) avaliaram os efeitos desencadeados na parte aérea e no sistema radicular em cultura de pepino, por meio da aplicação foliar de AH obtido de Leonardita. Dentre as concentrações de AH via foliar, a de 40 mg AH/L⁻¹ possibilitou melhor peso seco da parte aérea e das raízes de pepino, após 72h do início do tratamento. Observaram,

também, na mesma concentração de AH, o efeito na arquitetura radicular e, por meio da análise qualitativa constataram a presença de raízes mais curtas e com maior proporção de raízes secundárias nas plantas controle e nas plantas tratadas com AH, apresentaram raízes principais mais longas, com menor densidade de raízes secundárias e maior volume.

Estudos tem demonstrado a capacidade da substância bioativa em influenciar o crescimento, a morfologia e a arquitetura do sistema radicular em diversas espécies de plantas, pode estar relacionada a ação de diferentes fitohormônios, como por exemplo a auxina (ZANDONADI et al., 2010; MORA et al., 2012; NARDI et al., 2016; RATHOR et al., 2024). Em muitos desses estudos, o potencial do desenvolvimento radicular é atribuído as atividades semelhantes ao efeito auxínico disparados pelo AH (MORA et al., 2012; NARDI et al., 2016).

2.3.2 Ação fitohormonal tipo auxina do ácido húmico

Os fitohormônios são pequenas substâncias orgânicas produzidas nas plantas. Em baixas concentrações, regulam muitos processos, desde a germinação até a senescência das plantas (BHATLA, 2018; RATHOR et al., 2024). Entre os fitohormônios, a auxina (AUX) foi o primeiro agente sinalizador a ser descoberto, desempenha um papel essencial em diversos processos fisiológicos e bioquímicos ao longo da vida de diversos vegetais (TAIZ, ZEIGER, 2013; CANELLAS, OLIVEIRA, 2014; RATHOR, 2024). Entre as AUX existentes, o ácido indol-3-acético (AIA) é o mais estudado por ser a AUX mais abundante nos vegetais e, é responsável em regular diversos processos como a iniciação e proliferação do crescimento radicular, formação de tecidos vasculares, dominância apical e tolerância a condições adversas (RATHOR et al., 2024).

A liberação de prótons e ácido orgânicos na rizosfera, resulta em alteração do pH que possibilita a dissociação da supraestrutura do ácido húmico, liberando estruturas semelhantes a AUX ao sistema radicular (CASTRO et al., 2019; RATHOR et al., 2024). No entanto, há muito tempo, têm sido discutidos as propriedades semelhantes a AUX do ácido húmico. Em razão da baixa concentração aplicada destes compostos e da quantidade de AIA contida no AH, seja insuficiente para obter efeitos significativos fisiológicos nos vegetais (RATHOR et al., 2024). Entretanto, há estudo que evidencia o efeito da aplicação exógena de ácido húmico e AIA que induziram respostas semelhantes nas plantas, endossando que o AH atua como fitohormônio tipo auxina (RATHOR et al., 2024).

Zandonadi et al. (2010) estudaram a aplicação de ácido húmico associado ou não a inibidores de sinalização (ácido p- clorofenoxiisobutírico - PCIB, 20 μ M) e de transporte (ácido 2,3,5-triidobenzóico - TIBA, 20 μ M) de AIA em mudas de milho. Observaram que as mudas submetidas somente aos inibidores reduziram a formação de raízes laterais em cerca de 50% em relação ao tratamento controle. Quando ambos os inibidores foram usados em combinação, a emissão de raízes laterais foi inibida em 60%. No entanto, a combinação dos inibidores com AH não conseguiu reduzir o número de raízes laterais, sendo este superior ao controle. Já Jindo et al. (2012) comprovaram a presença de propriedades semelhantes a auxina na estrutura do ácido húmico de diferentes matérias de origens, por meio da cromatografia gasosa-espectrometria de massa e pelo promotor de auxina (DR5) unido ao gene repórter β -glucuronidase (GUS) (DR5-GUS) em cultura de milho. Observaram, efeitos significativos de todos os ácidos húmicos sobre os parâmetros morfológicos da cultura de milho. Por meio de análise de expressão de GUS de plantas *Arabidopsis thaliana* transformadas com a construção DR5:GUS, permitiu que Rathor et al. (2024) comprovassem o efeito auxínico do ácido húmico.

A ação da AIA e ácido húmico exógeno altera tanto os parâmetros morfológicos quanto a indução de genes codificadores de H^+ -ATPase da membrana plasmática (H^+ -ATPase PM) (ZANDONADI et al., 2010; CANELLAS, OLIVEIRA, 2014; GARCÍA et al., 2018). A auxina é responsável em aumentar o bombeamento de íons H^+ via H^+ -ATPase PM da raiz para o

compartimento da parede celular, ativando enzimas e proteínas suscetíveis ao pH que aumenta a plasticidade da parede celular, possibilitando o processo de crescimento e divisão celular (ZANDONADI et al., 2010; CANELLAS, OLIVEIRA, 2014; GARCÍA et al., 2016b; GARCÍA et al., 2018; RUWER, 2019).

Além da hipótese do fornecimento da auxina pelo ácido húmico, que seria responsável pelo desenvolvimento radicular e indução de genes, estudos tem mostrado efeito das espécies reativas de oxigênio (ERO) como possíveis moléculas sinalizadoras para regulação e expressão dos efeitos do AH na proliferação das raízes laterais nos vegetais (GARCÍA et al., 2016b; CORDEIRO et al., 2019, SOUZA et al., 2022).

2.3.3 Proteção do ácido húmico contra espécies reativas de oxigênio

Muitas plantas em ambiente natural são submetidas a estresse bióticos e abióticos e a sua capacidade em responder por alterações fisiológicas e bioquímicas é extremamente flexível e equilibrada devido a interação com as moléculas sinalizadoras, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) (FARNESE et al., 2016, BARBOSA, 2016). Em níveis normais (homeostase redox) as ERO são moléculas que regulam diferentes processos vegetais através da ativação de mensageiros secundários, da indução de genes e da alteração na atividade enzimática (FARNESE et al., 2016).

As ERO são formadas em eventos metabólicos que acontecem nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos e as mais comuns incluem as formas de radicais livres (radical superóxido (O_2^-) e radical hidroxila ($OH^\cdot$) e as formas não radicais (peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (PANDEY et al., 2015; BARBOSA, 2016; OZFIDAN-KONAKCI et al., 2018).

O O_2^- é formado a partir da redução de moléculas de oxigênio por um único elétron, durante o transporte de elétrons na fotossíntese. Entre os vários processos de formação de O_2^- , as principais fontes de produção deste radical é a cadeia transformadora de elétrons, processo respiratórios e fotossintéticos, realizados nas mitocôndrias e nos cloroplastos, respectivamente (BARBOSA, 2016).

O $OH^\cdot$ tem papel importante na degradação de compostos orgânicos voláteis, por ser altamente reativo e oxidante dentre as ERO, tendo como principal alvo de ação as moléculas de DNA que ocasiona modificações nas bases nitrogenadas, levando à quebra da dupla fita. Ainda, pode atuar na desnaturação de proteína, retirar átomos de hidrogênio de grupos de ácidos graxos poli-insaturados e causar danos nas moléculas de carboidratos (BARBOSA et al., 2014; BARBOSA, 2016).

O H_2O_2 é produzido da redução univalente de O_2^- (BARBOSA, 2016). O H_2O_2 é reativo e em excesso nas células dos vegetais causa estresse oxidativo, inativando enzimas pela oxidação, entretanto, pode agir como regulador em diversos processos, como, por exemplo, a senescência foliar, fotorrespiração, fotossíntese, movimentação dos estômatos, ciclo celular, como também, no crescimento e desenvolvimento em geral (BARBOSA, 2016). O tamanho pequeno de H_2O_2 permite-lhe atravessar as membranas celulares e deslocar em diferentes compartimentos. Assim, permite difundir os danos, como também, atuar como mensageiros de condição de estresse. Por participar da reação de formação de $OH^\cdot$, o H_2O_2 dispõe de uma ação deletéria (BARBOSA et al., 2014).

O 1O_2 é formado quando acontece o fechamento dos estômatos pela baixa disponibilidade de CO_2 que pode ser ocasionado por diversos fatores abióticos, como por exemplo, o déficit hídrico. Assim, o 1O_2 é um subproduto da fotossíntese que é mais reativo do que O_2^- e o H_2O_2 e a partir do sítio de produção pode se difundir a distância significativa e, mesmo com tempo de vida igual ou inferior a 3 μs causa efeito prejudicial em todo o aparato

fotossintético, como também, causa peroxidação lipídica nos cloroplastos (BARBOSA et al., 2014; BARBOSA, 2016).

O déficit hídrico é um dos estresses abióticos mais frequente e nocivo às plantas, por aumentar os níveis de ERO que estimula distúrbios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, resultando em danos celulares irreversíveis através do processo denominado estresse oxidativo que reflete no crescimento e desenvolvimento das plantas (BARBOSA, 2016; CHOUDHURY et al., 2017; JUNIOR et al., 2018; DONG et al., 2019; KOZULEVA et al., 2020; CASTRO et al., 2022). As ERO podem ser eliminadas via respostas antioxidativas do sistema antioxidante enzimático que envolve as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) (FANG, XIONG, 2015; AGUIAR et al., 2016; MOTA, CANO, 2016; BARBOSA, 2016; CHOUDHURY et al., 2017). Estudos tem demonstrado a capacidade do AH em diminuir os efeitos negativos causados pelo déficit hídrico em diversas espécies de plantas (AGUIAR et al., 2016; GARCÍA et al., 2018), por estimular o aumento da atividade do sistema antioxidante enzimático que atenua os efeitos do estresse oxidativo causado pelas ERO (CANELLAS et al., 2015; AGUIAR et al., 2016; SOARES et al., 2017; ROCHA, 2018; RUWER, 2019; CAMPOS, 2020; BEGUELINE, 2021; CASTRO et al., 2022).

A aplicação de AH em sistema radicular na cultura de arroz sob déficit hídrico tem mostrado efeitos antiestresses pelo aumento da atividade da peroxidase sobre as concentrações de H_2O_2 comparado ao tratamento controle (sem AH + estresse hídrico) (GARCÍA et al., 2012). A isoenzima SOD mais importante em desintoxicar as raízes de arroz do O_2^- é a forma citosólica de Cu/Zn-SOD, que apresenta aumento de atividade na presença de AH em relação as demais isoenzimas estudadas por García et al. (2016b). Já na cultura de cana-de-açúcar o AH aumentou significativamente a atividade das enzimas SOD, CAT e APX no tecido foliar e radicular, permitindo a proteção dos lipídios da peroxidação e maior tolerância ao déficit hídrico (AGUIAR et al., 2016).

Shen et al. (2020) ao estudarem o efeito de diferentes concentrações de AH sobre as características fisiológicas e fotossintéticas em mudas de milho sob estresse hídrico, observaram que o AH promove melhor desenvolvimento das mudas de milho sob condição de estresse hídrico por diminuir o acúmulo de ERO, por meio do aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX). Lofti et al. (2015) observaram, também, o aumento das enzimas ascorbato peroxidase e catalase em plantas de colza (*Brassica napus L.*) e maior conteúdo de clorofila *a* e clorofila *total* quando submetidas ao AH sob estresse hídrico, contribuindo para melhor atividade fotossintética.

Por outro lado, Alsamadany (2022) observou que o bioestimulante vegetal, como o AH aumenta a taxa de fotossíntese, a condutância estomática e a taxa de respiração, por meio do aumento da clorofila, assim mantendo o equilíbrio fisiológico dos diferentes genótipos de feijão mungo em condição de estresse hídrico. Ainda neste estudo, os efeitos das ERO foram anulados mediante ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes. Isso pode ser atribuída a capacidade do AH em ativar enzimas transmembranares (H^+ ATPase) conferindo maior estabilidade à membrana e menores danos as plantas (ALSAMADANY, 2022).

Além de ativar enzimas antioxidantes, responsáveis em manter o equilíbrio entre a produção e eliminação das ERO, o AH por meio da sua bioatividade pode influenciar na alteração dos metabólitos primário e secundários em diferentes vegetais (VACCARO et al., 2015; GARCÍA et al., 2018; AGUIAR et al., 2018; OTHIBENG et al., 2021; CANELLAS et al., 2022;).

2.3.4 Ação Direta do ácido húmico sobre expressão gênica relativa relacionada a nutrientes

A disponibilidade adequada e equilibrada de nutrientes, influencia em um bom desenvolvimento e crescimento de diferentes culturas (CRUSCIOL et al., 2013; SHRESTHA et al., 2020). Cada macro ou micronutriente, apresenta característica própria que influencia em diversos processos metabólicos nas plantas (SHRESTHA et al., 2020). Durante o ciclo de vida dos vegetais é necessário dezessete nutriente (incluindo C, O, H), onde nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) são os macronutrientes mais requeridos pelas plantas, o magnésio (Mg), cálcio (Ca) e enxofre (S) são os macronutrientes secundários e o zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), níquel (Ni), boro (B), molibdênio (Mo) e cloro (Cl) são os micronutrientes exigidos em menor proporção pelas plantas (SHRESTHA et al., 2020).

Estudo têm demonstrado que o AH, principal componente da SH, tem influenciado diretamente no aumento da absorção de macronutrientes e de micronutrientes, devido a sua capacidade em atuar na expressão de genes que contribui para melhorar eficiência das plantas em absorver, transportar e assimilar os nutrientes (SAHA et al., 2013; GARCÍA et al., 2018).

A absorção de NO_3^- é favorecida pela indução da expressão de genes NRT que codificam transportadores de alta e baixa afinidade de NO_3^- e pela expressão de isoformas de PM H^+ -ATPase (AZEVEDO et al., 2019). Quando a cultura de arroz foi submetida em tratamento com AH de vermicomposto apresentou maior taxa de absorção de NO_3^- pela maior expressão dos transportadores OsNRT2.1 e OsNRT2.2 e das isoformas OsA2, OsA3, OsA4, OsA5, OsA8 de PM H^+ -ATPase (TAVARES et al., 2017; GARCÍA et al., 2018). Para que aconteça absorção de NO_3^- é necessário que o transportador seja energizado (ativado) por uma força próton-motriz cujo mecanismo ação é um simporte com dois H^+ ($\text{NO}_3^- / 2\text{H}^+$). Essa ativação dá-se por meio do bombeamento de H^+ realizado pela enzima H^+ -ATPase, tornando-a a chave principal para que ocorra a absorção do NO_3^- (TAVARES, 2017). A SH não tem somente melhorado a absorção de nitrogênio como também a sua assimilação. Vaccaro et al., (2015) ao estudarem a interação de AH de solo vulcânico com a cultura de milho, verificou que a interação AH-raiz aumentou a expressão de genes responsáveis em codificar a enzima nitrato redutase-NR, responsável pela redução do NO_3^- no processo de assimilação de N pelas plantas.

Apesar da importância do P e do S ao desenvolvimento das plantas, existem poucos estudos relatando sobre a ação das SH no metabolismo destes nutrientes (García et al., 2018). Entretanto, sabe-se que o AH podem disponibilizar o P do solo às plantas, por intermédio da diminuição da adsorção de P nas superfícies de óxido (JINDO et al., 2016). JINDO et al. (2016) ao avaliarem a influência do AH em cultura de tomate observaram aumento da expressão de genes (LePT2) codificadores de transportador de P de alta afinidade, como também, maior biomassa radicular e distribuição de espécies de P (glicorofosfodiéster e fosforilcolina) nas folhas. Estudo realizado com AH isolado de turfas em *Brassica napus* demonstrou efeito positivo para expressão de transportadores de S, onde o AH induziu a expressão de transportadores de membrana plasmática (BnSultr1.1 e BnSultr1.2) e do tonoplasto (BnSultr4.1 e BnSultr4.2) (JANNIN et al., 2012).

O micronutriente Fe realiza um grande papel no processo fotossintético e na respiração mitocondrial e, também, atua como cofator de enzimas essenciais para o desenvolvimento das plantas (LABRADA et al., 2023). Apesar da grande abundância deste nutriente no solo há baixíssima disponibilidade às plantas, devido a uma alta taxa de Fe no solo na forma de Fe^{3+} que é insolúvel (LABRADA et al., 2023). Comumente é recomendado a aplicação de quelatos sintéticos para redução da deficiência de Fe, no entanto, podem ser pedidos por adsorção nas partículas do solo ou lixiviação. Nesse sentido, estudo realizado por Labrada et al. (2023) tem demonstrado que adição de AH em solução nutritiva e aplicada via irrigação em cultura de

tomate, resultou em maior expressão dos genes LePEPC1 e LeFRO1 no tecido foliar e no sistema radicular aumentou a expressão do gene LeHA1, enquanto reprimiu a expressão do LeFRO1, influenciando na nutrição de Fe em tomateiro cultivado em solo calcário.

A busca por genes induzidos ou reprimidos pela ação do AH, tem despertado o interesse da sociedade científica em contribuir para um melhor desempenho nutricional as plantas cultivadas (JINDO et al., 2016; TAVARES et al, 2017; GARCÍA et al, 2018; LABRADA et al., 2023). No entanto, sabe-se que alteração da expressão de genes torna-se necessário estudos profundos que permitam a identificação de genes associados com a resposta ao AH para o desenvolvimento de novas variedades. Para tal fim, tem usadas tecnologias de nova geração de análise de transcriptoma, como o sequenciamento em larga escala de RNA (RNA-Seq) que possibilita uma rápida e precisa identificação desses genes (FIETTO, MACIEL, 2015)

2.4 Sequenciamento em Larga Escala de RNA

A tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) está revolucionando o modo de como os transcriptomas estão sendo analisados (MACIEL, 2015; FERREIRA, 2017, FIETTO, FAGUNDES, CAGLIARI, 2019). O transcriptoma é o conjunto de todos os transcritos de uma célula, órgão ou organismo em uma determinada fase de desenvolvimento sob diferentes condições ambientais ou fisiológica (FAGUNDES, CAGLIARI, 2019). O uso do NGS não restringe unicamente ao estudo do genoma estático, pois a tecnologia permite explorar análise do transcriptoma dinâmico que promove um novo método de mapeamento e quantificação de transcriptomas, por meio do sequenciamento em larga escala de RNA (RNA-Seq) (GARBER et al., 2011; FAGUNDES, CAGLIARI, 2019).

O RNA-Seq pode ser utilizada para construir mapa completo de transcriptoma, por meio de poderosas ferramentas computacionais e técnicas de bioinformática para compreender o metabolismo e os estudos gerados em diferentes condições experimentais (GARBER et al., 2011; FAGUNDES, CAGLIARI, 2019). Aplicação desta tecnologia em diferentes campos da ciência, possibilita análise de transcriptomas em alta resolução que permite quantificar os níveis de transcritos, confirmar ou revisar sequências gênicas, proporcionando resolver problemas biológicos, como a quantificação de *splicing* alternativo, descoberta de novos genes e novos transcritos, quantificação da expressão gênica, entre outros (FERREIRA, 2017; GONÇALVES, 2017; FAGUNDES, CAGLIARI, 2019).

Para realizar a aplicação do RNA-Seq é necessário de um conjunto de RNA total ou fracionado, com qualidade e integridade adequada. Posteriormente, é convertido em uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores fixados em um ou ambas as extremidades. Cada molécula pode ser ou não amplificada, para, posteriormente, ser sequenciada para obter as sequências curtas em uma única extremidade ou em ambas as extremidades (sequenciamento pareado das extremidades) e realizar análises de bioinformática (WANG et al., 2009; HAN et al., 2015; GONÇALVES, 2017; FAGUNDES, CAGLIARI, 2019).

A técnica de RNA-Seq pode ser aplicada por diferentes plataformas. Conforme, as plataformas de sequenciamento, os fragmentos sequenciados (reads) podem gerar leituras de vários tamanhos. Geralmente é entre 30-400 pb, sendo alinhadas a um genoma de referência ou transcritos de referência, assim, produzindo o mapa de transcritos ou nível de expressão de cada gene (WANG et al., 2009; FERREIRA, 2017). As principais plataformas utilizadas são: Illumina, Ion-Torrent, Nanopore e Pacbio (WANG et al., 2009; HITZEMANN et al., 2012). Essas plataformas possuem características comuns e podem gerar informações muitas vezes maiores, do que o sequenciamento Sanger por meio da economia de tempo e do baixo custo por base para o sequenciamento (FERREIRA, 2017).

As plataformas de sequenciamento, em relação as etapas de obter os pequenos fragmentos, apresentam peculiaridades. O sequenciamento Sanger é feito por meio da síntese

que utiliza DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. O Ion-Torrent é uma plataforma de pequena e baixa profundidade de leitura e a Illumina é fundamentada em sequenciamento por meio de síntese e tem a vantagem de gerar milhões de reads com maior robustez, precisão e rapidez (HITZEMANN et al., 2012; FERREIRA, 2017).

Na agricultura, a técnica de RNA-Seq possibilita a análise das variações dos níveis de expressão gênica, visando elucidar os efeitos biológicos decorrentes das mudanças ambientais. Essas mudanças acontecem por meio de uma perturbação externa introduzida no sistema, incluindo infecções por patógenos ou parasitas, alterações nutricionais, restrição hídrica e outros tipos de estresses enfrentados pelas plantas (FAGUNDES, CAGLIARI, 2019).

Zhang et al. (2023) por meio da análise de transcriptômica estudaram o efeito do AH no alívio da inibição do alto teor de N na nodulação da soja, com intuito de identificar genes diferencialmente expressos. Identificaram-se 2.995 genes diferencialmente expressos, sendo 2036 genes regulados positivamente e 959 genes regulados negativamente após adição do AH e por meio da anotação funcional, identificou genes envolvidos na resposta à citocina, na via de sinalização MAPK, na transdução de sinal de hormônio vegetal e na biossíntese de fenilpropanóides, demonstrando que o AH mantém o nível normal de nodulação e restauração da atividade de fixação de N em condição de nível alto de N na cultura da soja.

Existem diversas aplicações da técnica de RNA-Seq para investigar o transcriptoma da cultura de arroz em diferentes genótipos, condições ambientais e interações com outros organismos. OONO et al. (2013) ao estudarem a diversidade do transcriptoma entre variedades de arroz submetidas à deficiência de P, identificaram cerca de 500 transcritos responsivos a essa deficiência para cada variedade e muitos desses transcritos possuem função desconhecida.

Silveira et al. (2015) ao realizarem análise de transcriptoma em folhas de duas variedades de arroz de sequeiro em diferentes níveis de estresse hídrico. Identificaram vários genes com potencial de serem incorporados em programas de melhoramento genético que visa o aumento da tolerância ao estresse hídrico. Por sua vez, Singh et al. (2016) examinaram o transcriptoma de duas variedades de arroz com características contrastantes em relação ao sistema radicular. Através dessa abordagem, conseguiram identificar vários genes envolvidos com o desenvolvimento do sistema radicular e à resposta aos estresses ambientais e compreendendo maior tolerância ao estresse em uma das variedades.

A técnica de RNA-Seq oferece inúmeras vantagens para a identificação e caracterização de transcriptomas de diversas espécies vegetais em relação aos demais métodos até então usados (FERREIRA, 2017). Portanto, os estudos das alterações dos níveis de expressão gênica possibilitam a compreensão do comportamento das plantas em diferentes momentos de desenvolvimento e em diferentes ambientes. Esses estudos, também, podem agilizar a identificação de genes relacionados a característica fenotípicas de relevância econômica em plantas de importância agrônômica (FAGUNDES, CAGLIARI, 2019).

3 CAPÍTULO I

EFEITOS DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO ÁCIDO HÚMICO NA RESPOSTA TRANSCRICIONAL EM PLANTAS DE *ORYZA SATIVA*

3.1 RESUMO

O ácido húmico (AH) é uma das frações das substâncias húmicas que atua sobre a morfologia, fisiologia, arquitetura e biologia molecular do sistema radicular de diversas espécies de plantas, contribuindo para melhor aquisição de nutrientes e água, por meio da regulação da expressão de genes. Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi determinar o tempo de exposição ao AH necessário para verificar resposta em nível transcricional de genes potencialmente regulados por essas substâncias. Para isso, sementes de arroz da variedade Nipponbare foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio 2,5%, agitadas por inversão por 15 minutos, e lavadas com água deionizada repetidas vezes. Em seguida, foram acondicionadas sobre gaze em vasos com capacidade de 3L e colocadas para germinar em água deionizada. A germinação e o cultivo foram realizados em câmara de crescimento de plantas do Departamento de Solos da UFRRJ, com fluxo de fótons fotossintéticos dentro de uma faixa de 318 a 330 $\mu\text{mol s}^{-1}$; fotoperíodo 14horas/10horas (luz/escuro), 70% umidade e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna). Foi fornecida uma solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada com 1/2 força iônica contendo 2 mM de N (1,5 mM de N- NO_3^- e 0,5 mM de N- NH_4^+) com o pH mantido a 5,8. Esta solução foi renovada a cada 3 dias após a germinação (DAG). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Após 12 DAG as plantas foram submetidas a concentração de 80 mg AH L^{-1} e coletado o tecido radicular nos tempos: 0,5h, 2h, 4h, 8h, 24h, 72h e 168h após à exposição. Foram analisados expressão de genes relacionados a absorção de nutrientes, metabolismo de espécies reativas de oxigênio e sinalização pela auxina. Esses genes foram regulados pelo tratamento com substância húmica em diferentes tempos de exposição. Os resultados mostram que após a exposição ao ácido húmico por 4h, já é possível observar regulação transcricional, indicando um possível envolvimento desses genes em mecanismos de sinalização para promoção do crescimento do sistema radicular em plantas de arroz. Os resultados, também, demonstraram que mesmo após longos períodos de exposição ao AH ainda é possível observar alterações no nível de expressão para diversos genes.

Palavras-chave: Ácido Húmico. Expressão de Gene. Nutriente. Auxina.

3.2 ABSTRACT

Humic acid (HA) is one of the humic substance fractions that acts on the morphology, physiology, architecture and molecular biology of the root system of several plant species, contributing to better nutrient and water acquisition through the regulation of gene expression. Based on the above, the objective of this study was to determine the time of exposure to HA necessary to verify the transcriptional response of genes potentially regulated by these substances. For this purpose, Nipponbare rice seeds were disinfected with a 2.5% sodium hypochlorite solution, shaken by inversion for 15 minutes, and washed with deionized water repeatedly. They were then placed on gauze in 3L pots and allowed to germinate in deionized water. Germination and cultivation were performed in a plant growth chamber of the Soil Department of UFRRJ, with photosynthetic photon flux within a range of 318 to 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photoperiod 14h/10h (light/dark), 70% humidity and temperature 28°C/24°C (day/night). A modified Hoagland & Arnon (1950) nutrient solution with $\frac{1}{2}$ ionic strength containing 2 mM N (1.5 mM N- NO_3^- and 0.5 mM N- NH_4^+) with pH maintained at 5.8 was provided. This solution was renewed every 3 days after germination (DAG). The experimental design was completely randomized with 4 replicates. After 12 DAG, the plants were subjected to a concentration of 80 mg HA L^{-1} and the root tissue was collected at the following times: 0.5h, 2h, 4h, 8h, 24h, 72h and 168h after exposure. The expression of genes related to nutrient absorption, metabolism of reactive oxygen species and auxin signaling were analyzed. These genes were regulated by treatment with humic substance at different exposure times. The results show that after exposure to humic acid for 4h, it is already possible to observe transcriptional regulation, indicating a possible involvement of these genes in signaling mechanisms to promote root system growth in rice plants. The results also demonstrated that even after long periods of exposure to HA, it is still possible to observe changes in the expression level of several genes.

Key words: Humic acid. Gene expression. Nutrient. Auxin.

3.3 INTRODUÇÃO

O arroz é um cereal primordial para dieta básica da população mundial, por ser a principal fonte de energia e proteína e, por possuir alto teores de amido, vitaminas e nutrientes (FERREIRA, 2017; SOUZA, 2018). Este cereal é considerado uma grande potência na segurança alimentar, no entanto, as mudanças climáticas, tem causado impactos direto no desenvolvimento e na produtividade deste cereal (QIAN et al., 2016; FERREIRA, 2017). Neste sentido, a substância húmica (SH) torna-se uma alternativa interessante para rizicultura, uma vez que a aplicação dessas substâncias tem resultado em plantas capazes de tolerar melhor as adversidades ambientais (FERRERA, 2017; ZENKER, 2021; SILVA, 2020).

As SH são compostos da matéria orgânica estáveis e obtidas a partir de transformações bioquímicas, não possuem características químicas e físicas bem definidas e, é fracionada em ácido húmico, ácido fúlvico e humina, com base na sua solubilidade (BORCIONI et al., 2016; PINTO, 2016; MARTINS, 2017). Podem exercer uma série de efeitos nas plantas tanto nos processos de sinalização celular, na nutrição e na proteção antiestresse via mecanismos de ação indireta e direta que agem como promotores de crescimento nas plantas (DOBBSS et al., 2010; TREVISAN et al., 2011; AGUIAR et al., 2015; GARCÍA et al., 2018).

Dentre as frações das SH, o ácido húmico exerce efeito na morfologia e arquitetura do sistema radicular, na fisiologia, no metabolismo e na expressão de genes que contribui para melhorar a eficiência das plantas em utilizar os recursos naturais e a tolerar aos efeitos adversos do ambiente (VACCARO et al., 2015; OLAETXEA et al., 2017; GARCÍA et al., 2018;). Vários trabalhos sobre as SH de diferentes fontes, vêm mostrando a sua habilidade em promover o crescimento e a nutrição de diferentes espécies vegetais por meio do estímulo de expressão gênica (TAVARES, 2014).

As SH em contato com o sistema radicular da cultura de milho podem acessar receptores hormonais que desencadeiam a expressão dos genes Mha1 e Mha2 que estão envolvidos na síntese da H^+ -ATPase que são capazes de gerar energia e gradiente eletroquímico, mediante a hidrólise do ATP que permite a energização dos sistemas responsáveis em translocar íons fundamentais para absorção de macro e micronutrientes e o aumento da plasticidade da parede celular, permitindo o crescimento e a divisão celular dos vegetais (AZEVEDO et al., 2019). Quando submetido ao tratamento com ácido húmico de vermicomposto, a cultura de arroz apresentou elevada taxa de absorção de NO_3^- , pela maior expressão dos transportadores OsNRT2.1 e OsNRT2.2 e das isoformas OsA2, OsA3, OsA4, OsA5, OsA7 e OsA8 de H^+ -ATPase (TAVARES et al., 2017, GARCÍA et al., 2018). O Ácido húmico isolado de turfas aplicados em *Brassica napus* demonstrou efeito positivo para expressão de transportadores de S, induzindo tanto a expressão dos transportadores de S de membrana plasmática (BnSultr1.1 e BnSultr1.2) como do tonoplasto (BnSultr 4.1 e BnSultr 4.2) (JANNIN et al., 2012).

Como visto, as SH têm a capacidade de regular a expressão gênica em diferentes processos celulares de forma coordenada, promovendo o crescimento dos vegetais, possivelmente por atuar como moléculas elicitoras responsáveis pela ativação das vias de transdução de sinais que culminam em respostas fisiológicas diversas (MORGANTE et al., 2020). Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi determinar o tempo de exposição ao AH de vermicomposto, necessário para obter resposta de plantas de arroz em nível transcricional, para, a partir desses dados, identificar alvos biotecnológicos potencialmente envolvidos com a promoção do crescimento vegetal e/ou envolvidos com mecanismos de tolerância a estresse.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Obtenção do ácido húmico

A fração húmica foi obtida pelo Laboratório de Química Biológica do Solo - UFRRJ a partir de vermicomposto de esterco bovino, produzido na fazendinha Agroecológica do km 47, Seropédica-RJ. O Vermicomposto foi estabilizado ao fim de 50 dias, por minhocas “Vermelha-da-Califórnia” (*Eisenia foetida*), conforme descrito em Oliveira (2011).

A caracterização da fração húmica foi obtida a partir das técnicas de espectroscopia 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). Essas técnicas confirmaram a predominância de fragmentos alifáticos e de carbono carboxílico na fração húmica. Confere ao ácido húmico uma característica mais alifática, o que resulta em um caráter mais hidrofilicidade e maior labilidade. Essas propriedades influenciam a labilidade e a recalcitrância das estruturas, contribuindo para o aumento da bioatividade (Tabela 1 e Tabela 2). Para uma caracterização mais detalhada da fração húmica, consulte Souza (2023).

Tabela 1. Bandas de absorção e grupos funcionais de ácido húmico de vermicomposto via técnicas de espectroscópicas de infravermelho com reflectância atenuada (ATR-FTIR).

Bandas de absorção (cm^{-1})	Fórmula Geral	Grupos Funcionais
3660-3284	-OH e/ou -NH	Álcool, ácidos carboxílicos e/ou aminas
~2979	-CH	-CH ₃ alifáticos
1828-1602	C=O e C=C	Aromáticos, carbonila, amida, éster
1384	-CH	-CH ₃ alifáticos
1242	C-N	Nitrila
1124	C-O	Álcoois primários
1.030	-OH	Álcoois alifáticos e polissacarídeos
671	C=C	Alcenos

Fonte: Souza (2023).

Tabela 2. Quantidade relativa (%) dos tipos de carbono em amostra de AH proveniente de vermicomposto.

C _{Alq-H,R} 0-45	C _{Alq-O,N} 45-60	C _{Alq-O} 60-90	C _{Alq-di-O} 90-110	C _{Ar-H,R} 110-140	C _{Ar-O} 140-155	C _{COO-H,R} 155-185	C _{C=O} 185-230
----- % -----							
31,3	12,6	13,1	6,1	13,1	6,1	13,1	4,5
		Arom ¹	Alif ²	HB/HL ³	P ⁴		
----- % -----							
		19,22	80,78	1,02	1,25		

¹aromaticidade; ²alifaticidade; ³índice de hidrofobicidade; ⁴índice de polaridade. Fonte: Souza (2023).

3.4.2 Experimento I: curva de calibração da dose reposta de ácido húmico

Sementes de arroz da variedade Nipponbare foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% sob agitação por inversão durante 15 minutos, e lavadas com água deionizada repetidas vezes (Figura 1). Em seguida, foram acondicionadas sobre gaze em vasos com capacidade de 1,7 L e colocadas para germinar em água deionizada. 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 $\mu\text{mol s}^{-1}$;

fotoperíodo 14horas/10horas (luz/escuro), 70% umidade e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna).

Para estabelecer a dose ideal do ácido húmico foram avaliadas as seguintes doses: 0, 2, 5, 10, 30, 50, 80, 100 e 150 mg de AH L⁻¹ que foram solubilizados em uma solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) com pH 5,8. As concentrações do ácido húmico foram baseadas no experimento de Tavares et al. (2017).

Aos 3 dias após a germinação (DAG) as plantas foram transferidas para potes plásticos com capacidade de 1000 mL (4 plantas por pote) e submetidas a uma solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada com ¼ FI de 2 mM de N (1,5 mM de N- NO₃⁻ e 0,5 mM de N-NH₄⁺) com o pH sendo mantido a 5,8, e a fonte de nitrogênio foi nitrato de cálcio e nitrato de amônio (Fig.1). A cada 3 dias foi fornecida uma solução nutritiva de ½ FI de 2 mM de N (1,5 mM de N- NO₃⁻ e 0,5 mM de N-NH₄⁺). Aos 12 DAG foram realizadas as aplicações das diferentes doses de ácido húmico. Para cada dose de ácido húmico dissolvido em solução de KOH com pH 8,0, foi preparado uma solução nutritiva de ½ FI de 2 mM de N (1,5 mM de N- NO₃⁻ e 0,5 mM de N-NH₄⁺). Aos 19 DAG, as plantas foram coletadas, após três horas do início do período de luz para excluir as variações diurnas (Figura 1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições (cada repetição foi composta por dois potes) para cada dose de ácido húmico (9 doses x 8 repetições x 8 plântulas), totalizando 288 plântulas.

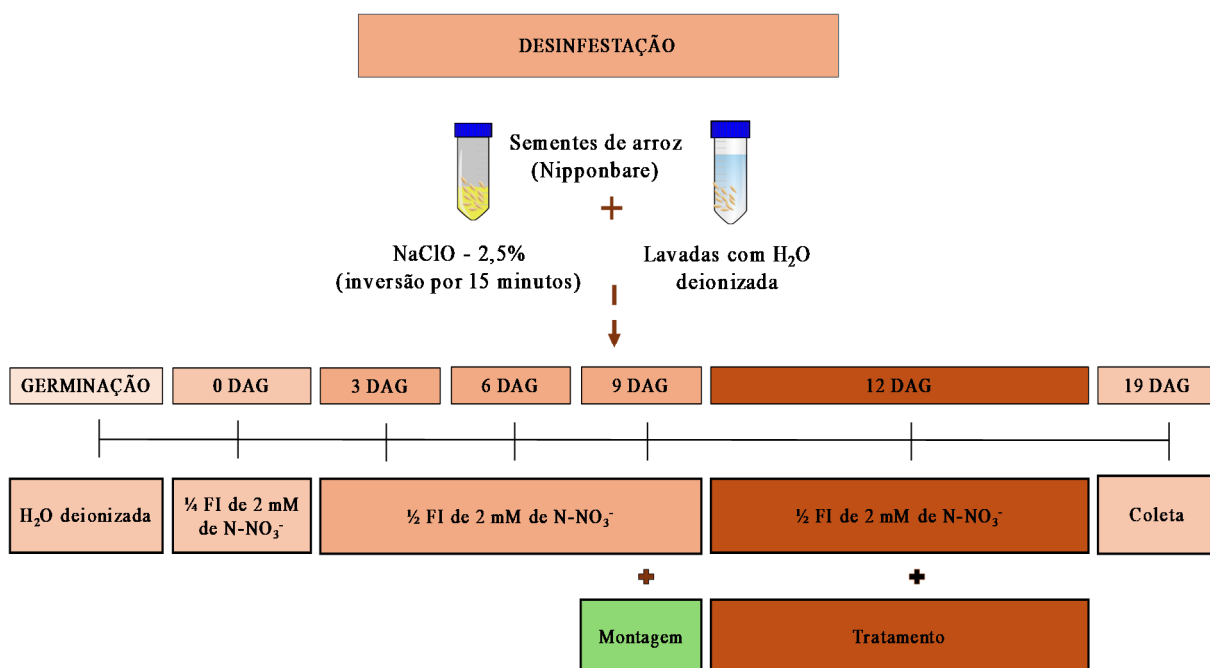


Figura 1. Esquema de cultivo das plantas de arros da variedade Nipponbare, submetidas a dose de 0, 2, 5, 10, 30, 50, 80, 100 e 150 mg de AH L⁻¹ em uma solução de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) com pH 5,8, com suprimento de 2 mM de N (N- NO₃⁻ e N-NH₄⁺) e aos 19 DAG realizou a coleta. DAG: dias após a germinação.

a) Análise de parâmetros morfológicos

No momento da coleta as plantas foram particionadas em raiz e parte aérea e pesadas para obter a massa fresca (g), posteriormente, foi mensurado o comprimento da parte aérea e o comprimento máximo das raízes, em centímetros. Em seguida, as raízes foram armazenadas em tubo Falcon contendo etanol 50% para posterior análise dos parâmetros radiculares.

Para obtenção da massa seca da parte aérea (g), as amostras foram secas em papel toalha, armazenadas em sacos de papel e mantidas em estufa a 60°C durante 72h e pesadas posteriormente. Para obtenção da massa seca da raiz (g), seguiu-se o mesmo procedimento realizado para a parte aérea, após a análise dos parâmetros radiculares.

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 WinRhizo Arabdopsis (2012) na definição de 600 dpi (pontos por polegada). Os parâmetros determinados foram: comprimento total de raízes (mm), área de superfície (mm²), volume radicular (mm³), número de pontas de raízes, diâmetro médio de raízes (mm/10).

3.4.3 Estudo de expressão gênica relativa

a) Seleção de genes responsivos ao ácido húmico

O estudo da Expressão gênica relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi fundamentado em estudos prévios que já relataram o efeito de AH sobre a expressão de genes relacionados a diversos processos fisiológicos, bem como de estudos que destacaram proteínas diferencialmente expressas em plantas submetidas ao tratamento de AH (Trevisan et al., 2011; Roomi et al., 2018). 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 identificação e a escolha dos genes levaram em consideração aos valores da “identidade”, do “E-value” e do “Score”. Quanto mais baixo o “E-value”, mais significativo é o “Score” e o alinhamento.

Os genes selecionados estão envolvidos nas vias de sinalização, tais como, genes associados as proteínas regulatórias (proteínas quinases), genes do metabolismo oxidativo de plantas, genes relacionados a vias hormonais, genes de respostas fisiológicas ligados ao crescimento radicular e absorção de nutrientes (Tabela 3).

Tabela 3. Genes responsivos ao ácido húmico em cultura de arroz (*Oryza sativa*) a partir de estudos prévios.

Genes	Locus do gene	ID
2-Cis peroxirredoxina BAS1	LOC_Os02g33450.2	BAS1
Glutathione peroxidase	LOC_Os02g44500	GPX
Glutamina sintetase isozima citosólica 1-2	LOC_Os03g12290	GS3
Peroxidase 2	LOC_Os07g48030	PRX11
Superóxido dismutase [Cu-Zn] semelhante a 1	LOC_Os03g22810	CuZnSOD1
Serina/treonina-proteína quinase semelhante a TOR	LOC_Os05g14550	TOR
transporte de proteína Sec1b	LOC_Os06g04450	SEC1B
Hexoquinase-5	LOC_Os05g44760	HXK5
Proteína 9 semelhante a TOM1	LOC_Os01g12880	TOM1
Fator de alongação 1 alfa	LOC_Os03g08050	EF1a
subunidade de coatômero delta-1	LOC_Os05g24601	COPD1
Membrana plasmática ATPase	LOC_Os04g56160.1	OsA7
Proteína responsiva a auxina	LOC_Os03g43400	AIA11
Transportador de nitrato	LOC_Os10g40600	OsNRT1.1
Transportador de nitrato	LOC_Os02g02170	OsNRT2.1
Proteína quinase 7 dependente de cálcio	LOC_Os03g03660	OsCPK7
Canal de cálcio putativo de dois poros	LOC_Os01g48680	OsTPC1
Proteína fosfatase PHS1	LOC_Os01g20940	PHS1

b) Desenho dos primers dos genes selecionados

Todos os primers (Tabela 4) foram desenhados a partir de sequências de mRNA depositadas no GenBank e com auxílio da ferramenta Primer-BLAST, contra o banco RefSeq RNA de arroz, disponibilizado pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para conferir as propriedades dos primers foi utilizado a ferramenta OligoAnalyzer (GeneLink - <https://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>).

Tabela 4. Os primers utilizados no experimento de expressão gênica relativa em cultura de arroz tratada com ácido húmico.

Genes	Locus	Foward Primer	Reverse Primer
BAS1	LOC_Os02g33450.2	5'-GTC TGC CCG ACC GAG ATT AC-3'	5'-CCA AGC CCA CCA GAT TTC CT-3'
GPX	LOC_Os02g44500	5'-CTG CGT TGC ATT GAG CAC TT-3'	5'-GGG GCA AAG TGA TGC AGT AAG-3'
GS3	LOC_Os03g12290	5'-TAC GCC GGG ATC AAC ATC AG-3'	5'-AAC CCA CAC TTG GTC AGC AG-3'
PRX112	LOC_Os07g48030	5'-ACA TCT CGC CCT TGA CTG GA-3'	5'-CAA TGT CGG GGC CTA GCT TT-3'
CuZnSOD1	LOC_Os03g22810	5'-AGA TTC CAA ACC AGC AGG AGT-3'	5'-AAG CAC AAC AAC AGC CTT CAC-3'
TOR	LOC_Os5g0235300	5'-GGC TGA ATG GAT GAG GCA CT-3'	5'-CTC ACG ACC AAC AGA AGG CT-3'
SEC1B	LOC_Os06g04450	5'-CGA AGC TGA AGA TGC TAA CTG C-3'	5'-CGT AGC AAT GGG TTT CTT ACC AA-3'
HXK5	LOC_Os05g44760	5'-CAA GAT GCC AAA AGA CGG CA-3'	5'-CCA CCG AAG ACG AGA CAT CA-3'
TOM1	LOC_Os01g12880	5'-TAC AGC AAC AGC CAA GGG AG-3'	5'-TGT AGA GTA GGG CGA GCT GT-3'
EF1a	LOC_Os03g08050	5'-ACT GAT GCT CTG AGT CCG AT-3'	5'-AGC AGG GAA TAG CAC AAA CGA-3'
COPD1	LOC_Os05g24601	5'-CTG GAA TCC GTC CTC TGA AGG-3'	5'-GTG AGG CAA CAA ACA TCC CT-3'
OsA7	LOC_Os04g56160.1	5'-TCC AAC ACG CTC TTC AAC GA-3'	5'-CCT TCA GCT TCA CCA CCG AT-3'
IAA11	LOC_Os03g43400	5'-AGC TGA GAG ATG ACC TGG AGT-3'	5'-AAG GCC AAT GGC TTC AGA CC-3'
OsNRT1.1	LOC_Os10g40600	5'-AGG GGG TAC GTC TAC AAG GA-3'	5'-AGC TTG CGT ATG TCA TGC TG-3'
OsNRT2.1	LOC_Os02g02170	5'-CCA CGG TGC AAG TCT CAA GT-3'	5'-GTC GCA GAA TTG TTT ACG CCT-3'
OsCPK7	LOC_Os03g03660	5'-TAG CCC TCG AAG AAG CAA GG-3'	5'-TCC CCA ACC TTA CGA GAC CT-3'
OsTPC1	LOC_Os01g48680	5'-CGG AGC CCA CTG TTT GAG TA-3'	5'-TCT TGC CAC ACT TTC TGC GA3'
PHS1	LOC_Os01g20940	5'-TTA CCA AGG CGT TCG CTG AT-3'	5'-ACA TCA CCA CAC TGC CAC AA-3'

c) Experimento II: efeito da dose resposta do ácido húmico na indução de genes

Com a dose resposta de maior estímulo de crescimento em plantas de arroz, foi conduzido um experimento nas mesmas condições do descrito acima (item 3.4.2), com objetivo de determinar os tempos de exposição ao ácido húmico para indução de alguns genes já sabidamente responsivos ao ácido húmico.

Após 12 DAG, plantas de arroz cultivadas sobre as mesmas condições do experimento 1 (item 3.4.2), foram submetidas ou não à dose de maior estímulo de ácido húmico (80 mg de HA L⁻¹) e coletadas no tempo 0,5h, 2h, 4h, 8h, 24h, 72h e 168h. Em seguida, parte aérea e raiz foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C, para posterior extração de RNA total e análise de expressão gênica relativa da raiz.

d) Extração de RNA total

A extração do RNA total foi realizada de acordo com 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%)]. O material vegetal coletado foi macerado em N₂ líquido, transferido para um tubo eppendorf de 2 ml e homogeneizado por 10 minutos em vórtex numa mistura contendo 800 µL de tampão NTES e 600 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Posteriormente, as amostras de material vegetal foram centrifugadas a 18.000xg por 20 minutos a 4°C e o

sobrenadante transferido para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL e novamente centrifugado por 20 minutos com 400 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico.

Depois do procedimento, o RNA total foi precipitado pela adição de 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 foi mantido em -80°C por 1 hora. Em seguida, foi centrifugado a 18.000xg por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol_{DEPC} 70% gelado e centrifugado a 18.000xg por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado, e os tubos eppendorf 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 H₂O_{DEPC} e novamente precipitado com 500 µL de cloreto de lítio 4M (LiCl_{DEPC}) durante 16 horas a 4°C. Decorrido esse período a solução foi centrifugada a 18.000 xg por 20 minutos a 4°C e o precipitado (pellet) foi novamente solubilizado em 450 µL H₂O_{DEPC}. Após a completa dissolução foi adicionado acetato de sódio 2 M pH 4,8 (NaOAc_{DEPC}) (50 µL) e etanol absoluto (800 µL). A mistura foi mantida por 30 min a uma temperatura de -80°C e centrifugada a 18.000 xg por 20 min a 4°C.

O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol_{DEPC} 70% gelado, posteriormente foi centrifugado a 18.000xg por 10 minutos. Decorrido a centrifugação, o etanol foi pipetado para não desfazer o precipitado e os tubos eppendorf foram mantidos abertos no gelo para evaporação total do etanol por cerca de 15 minutos. Após a secagem, o precipitado foi solubilizado com H₂O_{DEPC} (60 µL), transferido para tubo eppendorf de 500 µL e armazenado a -80°C.

e) Controle da integridade do RNA total

Para o controle da integridade do RNA total realizou-se a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A integridade foi avaliada pela diferença de intensidade das bandas 28S e 18S, que deve ser de aproximadamente duas vezes mais forte para 28S. Também avaliou-se a presença ou não de arraste, que indica a degradação. Todas as amostras foram consideradas adequadas.

f) Quantificação do RNA total

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop One© da Thermo Scientific. A qualidade do RNA total extraído foi verificada por meio das relações de absorvância A_{260/230} capaz de detectar reagentes orgânicos utilizados na lise química e A_{260/280} capaz de detectar contaminação por proteínas, cujo valor deve estar entre 1,8 e 2,0, além de obter a concentração do RNA total.

g) Tratamento de DNase e a síntese de cDNA

Para realizar a síntese de cDNA, as amostras de RNA total foram diluídas em H₂O_{DEPC} para uma concentração de 0,5 µg/ µL para padronizar as amostras. Depois disso, foram tratados 2 µg de RNA total com a DNase I (Sigma-Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante e a síntese de cDNA foi feita por meio do kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits 200 reactions” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante.

h) PCR em tempo real (RT-qPCR)

As reações de RT-PCR, foram realizadas no aparelho “StepOne Plus Real-Time PCR System” (Applied Biosystems) utilizando o “kit Power SYBR® Green PCR Master Mix”

(Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante e todas as reações foram feitas em duplicata.

A reação foi montada em placas de PCR de 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), com volume final de 10 µL. 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.

A reação de cada placa foi da seguinte maneira: 10 minutos a 95°C, passo necessário para ativação da DNA polimerase AmpliTaq Gold®; 40 (quarenta) ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos para acontecer a desnaturação e 1 minuto a 60°C para ocorrer o anelamento/extensão e a coleta da fluorescência. Ainda, foi adicionado na programação uma curva de dissociação (“melting curve”), padrão do aparelho para identificar possíveis amplificações inespecíficas dos primers testados. A expressão gênica foi calculada pelo método do delta-delta-Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

i) Escolha do gene de referência

Foi realizado uma análise preliminar com todas as amostras para selecionar o gene candidato a normalização da expressão gênica conforme a sua estabilidade de expressão. Analisou-se os genes de referência (controle endógeno) ubiquitina 5 (UBQ5) e actina1 (ACT1), comumente utilizados para a normalização nas análises de expressão gênica relativa em arroz. Após o término da reação foi obtido os valores de C_T (*threshold cycle*) e realizada uma análise de desvio padrão da média dos valores de C_T entre todas as amostras para identificar o gene de referência mais estável.

Conforme a Tabela 5, o gene ACT1 foi o gene de referência que apresentou menor variação entre os diferentes tratamentos analisados, assim sendo, o mais estável e escolhido para a normalização dos cálculos.

Tabela 5. Valores da variabilidade dos genes de referência obtidos através do erro padrão, realizado na expressão gênica relativa. Ubiquitina 5 (OsUBQ5) e actina (OsACT1).

Genes de referência	Desvio Padrão
OsUBQ	0,607
OsACT1	0,360

Na Tabela 6 estão elencadas as sequências do “*Primer Forward e Reverse*”, utilizados para cada gene de referência avaliado.

Tabela 6. Sequências dos *primers forward e reverse* usados nas reações de RT-PCR em Tempo Real.

Genes	Forward primer	Reverse primer
OsUBQ5	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3'	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'
OsACT1	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGG-3'	5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGC-3'

3.4.4 Análise estatística

Os resultados do experimento I foram submetidos a análise de regressão quadrática, utilizando o software SIGMAPLOT 10 com o objetivo de verificar o grau de variabilidade das amostras a 5 % de probabilidade ($p\text{-value}<0,05$).

Os dados obtidos no experimento II foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se software R. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio dos seguintes testes: verificação de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e análise de variância (ANOVA). Quando observado efeito significativo da ANOVA, as médias foram posteriormente comparadas através de testes de Tukey ($p<0,05$).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Dose resposta de maior estímulo de ácido húmico em plantas de arroz

Devido à complexidade da ação do AH, é imprescindível analisar a concentração ou concentrações que permitam uma melhor resposta ao desenvolvimento das plantas (GARCÍA, 2013). Sendo assim, estudou-se diferentes concentrações de AH (0 mg L^{-1} ; 2 mg L^{-1} ; 5 mg L^{-1} ; 10 mg L^{-1} ; 30 mg L^{-1} ; 50 mg L^{-1} ; 80 mg L^{-1} ; 100 mg L^{-1} e 150 mg L^{-1}) em plantas de arroz da variedade Nipponbare.

Na Figura 2 observa-se um efeito quadrático no estímulo dos parâmetros morfológicos das plantas de arroz à medida que aumenta a dose de AH. Aplicação do AH resultou no aumento da altura da parte aérea, sendo que, as doses acima de 80 mg L^{-1} AH ($R^2=0,9263$) influenciou de forma negativa no desenvolvimento da parte aérea das plantas de arroz (Figura 2A).

De acordo com os resultados deste trabalho, o cálculo das coordenadas do vértice (Tabela 7) e o modelo polinomial de segunda ordem criou um ajuste satisfatório para os parâmetros: massa fresca (MF) e seca (MS) da parte aérea ($R^2=0,9614$) e da raiz ($0,8509$). Sendo, a concentração de 80 mg L^{-1} AH, a de maior efeito e a concentração de 150 mg L^{-1} AH como a de menor efeito na biomassa em relação a das plantas controle (Figura 2E, F, I, J).

Tabela 7. Cálculo das coordenadas do vértice das doses de ácido húmico nos parâmetros morfológicos de arroz da variedade Nipponbare.

Parâmetros		Função Quadrática					V_x
		a		b	c		$V_x=(-b/2.a)$
Altura (cm)	$f(x)=$	0,000	x^2	0,071	x	39,318	88,25
Profundidade Radicular (cm)	$f(x)=$	0,000	x^2	-0,010	x	12,014	123,05
Massa Fresca - Raiz (g)	$f(x)=$	0,000	x^2	0,012	x	1,289	70,93
Massa Seca - Raiz (g)	$f(x)=$	0,000	x^2	0,001	x	0,091	77,86
Massa Fresca - PA (g)	$f(x)=$	0,000	x^2	0,025	x	3,587	123,50
Massa Seca - PA (g)	$f(x)=$	0,000	x^2	0,004	x	0,567	85,88
Comprimento (mm)	$f(x)=$	-0,029	x^2	6,249	x	2940,952	108,87
Área de Projeção (mm)	$f(x)=$	-0,016	x^2	2,716	x	652,680	85,96
Área de Superfície (mm)	$f(x)=$	-0,050	x^2	8,534	x	2050,454	85,85
Diâmetro Médio (mm)	$f(x)=$	0,000	x^2	0,004	x	2,236	71,05
Volume da Raiz (mm)	$f(x)=$	-0,005	x^2	0,726	x	114,616	78,86
Pontas da Raiz (mm)	$f(x)=$	0,049	x^2	3,471	x	4111,354	-35,14
Média do Vértice (V_x) – Dose							80,41

Nos últimos anos, diversos autores têm observado um aumento na biomassa fresca e seca de plantas de arroz submetidas ao ácido húmico (AH). Esse acúmulo pode ser atribuído à aglomeração criada pela interação do AH com a superfície radicular, que atua como um eustressor químico que pode influenciar o processo fotossintético (CASTRO et al., 2021). Ao analisar o efeito do AH na emissão da fluorescência da clorofila a em plantas de arroz, Castro et al. (2021) observaram um aumento no índice de desempenho fotossintético e uma redução na perda de energia na forma de calor após dois dias de exposição ao eustresse químico nas plantas tratadas com AH. Isso indica que a interação do AH com a raiz pode desencadear alterações no metabolismo das plantas de arroz, induzindo seu crescimento e desenvolvimento.

O acúmulo de biomassa também tem sido atribuído ao estímulo da absorção de nutrientes, facilitado pelas características estruturais do AH, que tem a capacidade de interagir com íons metálicos (por exemplo, Mg, Cu, Zn, Ni) através da presença de grupos funcionais oxigenados (COOH , C=O , OH), da ligação eletrostática e da concentração do íon metálico e do

AH. Isso permite a formação de complexos organo-metálicos de alta estabilidade, favorecendo o desenvolvimento e crescimento das plantas (MELO et al., 2016; TOWN e LEEUWEN, 2016; GARCÍA et al., 2018; MINDARI et al., 2019; SOUZA et al., 2022).

O comportamento das plantas tratadas com AH também respondeu com um maior estímulo do comprimento e volume de raiz (Figura 2C, D), área de superfície e projeção de raiz (Figura 2G, H) e diâmetro médio de raiz (Figura 2L). De forma semelhante à altura da parte aérea e a biomassa, a concentração 80 mg L⁻¹ AH foi mais promissora, enquanto, a concentração de 150 mg L⁻¹ AH exerceu o menor efeito nos parâmetros radiculares (Figura 2P). Diferentemente do observado nos parâmetros radicular, houve maior estímulo do número de pontas de raiz à medida que aumenta a concentração do AH em relação as plantas controle (Figura 2M). Sendo, o mesmo efeito observado por Tavares et al. (2020) em plantas tratadas com doses crescentes de AH em plantas de arroz.

Por meio das alterações conformacionais da estrutura do AH, promovido pelos exsudados das raízes de plantas e dos microrganismos, liberam fragmentos húmicos no solo com bioatividade que resulta em diversos efeitos benéficos, desencadeando no sistema radicular de plantas tratadas, o estímulo de formação, alongamento, espessamento das raízes que influencia no aumento de o seu volume e área de superfície (CASTRO et al., 2021; GARCÍA et al., 2018; VACCARO et al., 2015). Para García et al. (2018) o desenvolvimento do sistema radicular está envolvido com a heterogeneidade estrutural dos fragmentos húmicos. Visto que, as estruturas alifáticas saturadas (C_{Alkyl-H,R}), grupos carbonil (CC=O) e carboxil (CCOO-H,R) foram responsáveis pelo número de raízes desenvolvidas, volume e diâmetro de raiz e o crescimento de raízes menores de plantas de arroz. Já as estruturas aromáticas (CAr-H, R; CAr-O,N) e as estruturas alifáticas substituídas (C_{Alq-O,N}; C_{Alkyl-O}; C_{Alkyl-di-O}) proporcionaram o desenvolvimento de raízes maiores em plantas tratadas com AH.

Além das alterações estruturais e dos grupos funcionais do AH, os fragmentos mimetizam efeito fitormônio (tipo AUX) e o euestresse no sistema radicular, desencadeando o estímulo da emissão de raízes. O AH em contato com o sistema radicular pode acessar receptores hormonais que desencadeiam expressão de genes que são capazes de gerar energia e gradiente eletroquímico, mediante a hidrólise do ATP que permite a energização de sistemas responsáveis em translocar íons fundamentais para absorção de macro e micronutrientes e o aumento da plasticidade da parede celular, permite o crescimento e a divisão celular dos vegetais, assim, desenvolvendo o sistema radicular que é de grande importância ao crescimento de plantas, por afetar diversas funções fisiológicas (absorção de água e nutrientes, capacidade de adaptação ao estresse ambiental, entre outros) (TAVARES et al., 2017, GARCÍA et al., 2018; AZEVEDO et al., 2019).

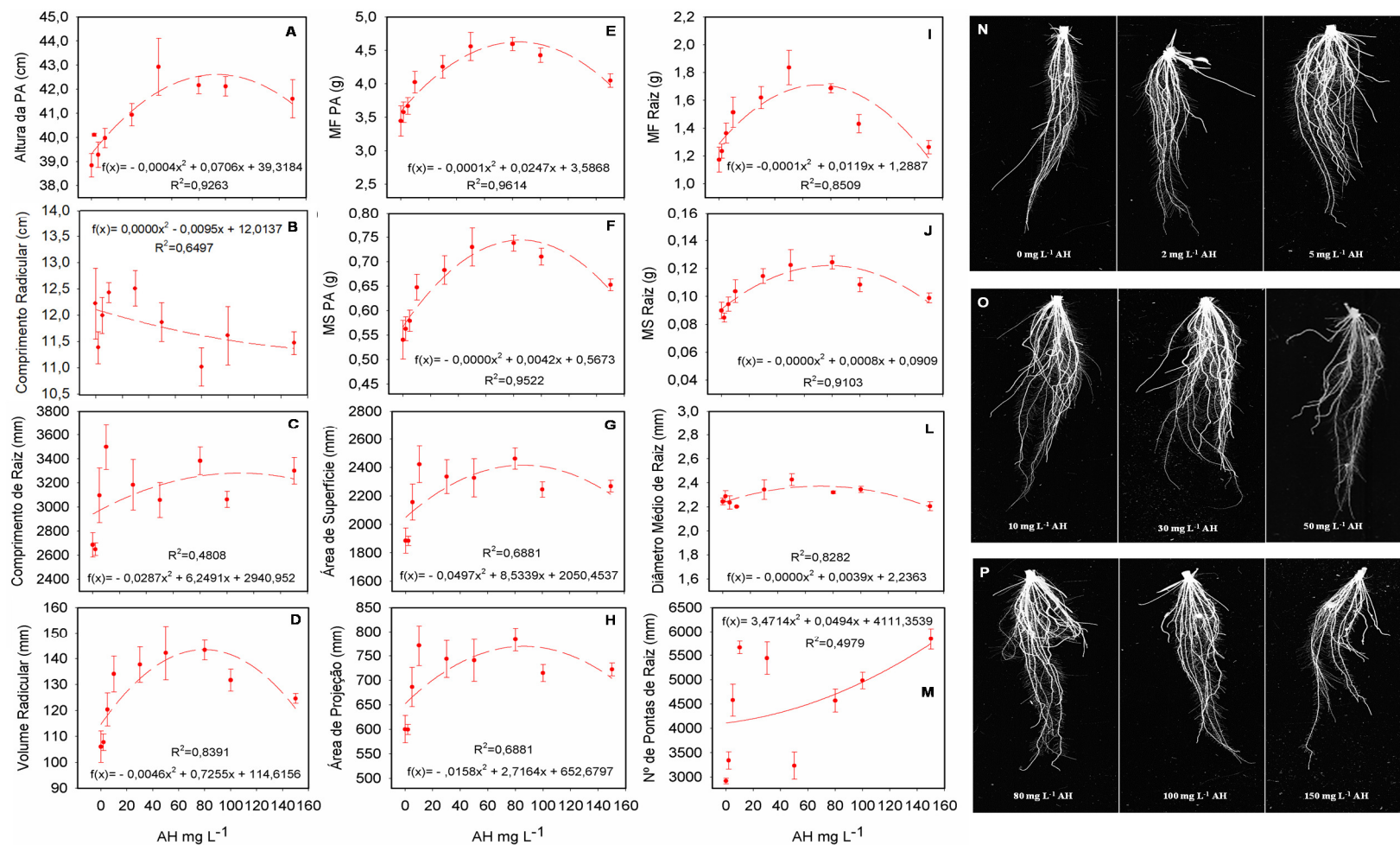


Figura 2. Curva de calibração de dose resposta de ácido húmico na variável altura da Parte Aérea (A), profundidade radicular (B), Comprimento de Raiz (C), Volume Radicular (D), Massa Fresca de Parte Aérea (MF Parte Aérea) (E), Massa Seca de Parte Aérea (MS Parte (F), Área de Superfície (G), Área de Projeção (H), Massa Fresca de Raiz (MF Raiz) (I), Massa Seca de Raiz (MS Raiz) (J), Diâmetro Médio de Raiz (L), Volume de Raiz (M). Imagem digitalizada do sistema radicular (N, O e P) de plantas de arroz da variedade Nipponbare, tratadas com suprimento de 2 mM de N (N- NO₃⁻ e N-NH₄⁺) por 19 DAG. Tratamentos: 0 mg de AH L⁻¹ (N), 2 mg de AH L⁻¹ (N), 5 mg de AH L⁻¹ (N), 10 mg de AH L⁻¹ (O), 30 mg de AH L⁻¹ (O), 50 mg de AH L⁻¹ (O), 80 mg de AH L⁻¹ (P), 100 mg de AH L⁻¹ (P) e 150 mg de AH L⁻¹ (P).

3.5.2 Determinação do tempo de maior indução de genes responsivos ao ácido húmico

Os genes diferencialmente expressos nas raízes de arroz da variedade Nipponbare apresentaram significância entre as plantas controle e as tratadas com AH (80 mg L⁻¹ de AH) nos diferentes tempos de exposição (Figura 3, 4, 5). Notou-se que os genes *TOM1* (Figura 3A), *CuZnSOD1* (Figura 4E) e o *OsNRT2.1* (Figura 3E) apresentaram a maior expressão gênica relativa ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) em diferentes tempos de exposição ao AH, comparado aos demais genes submetidos ao tratamento sem AH.

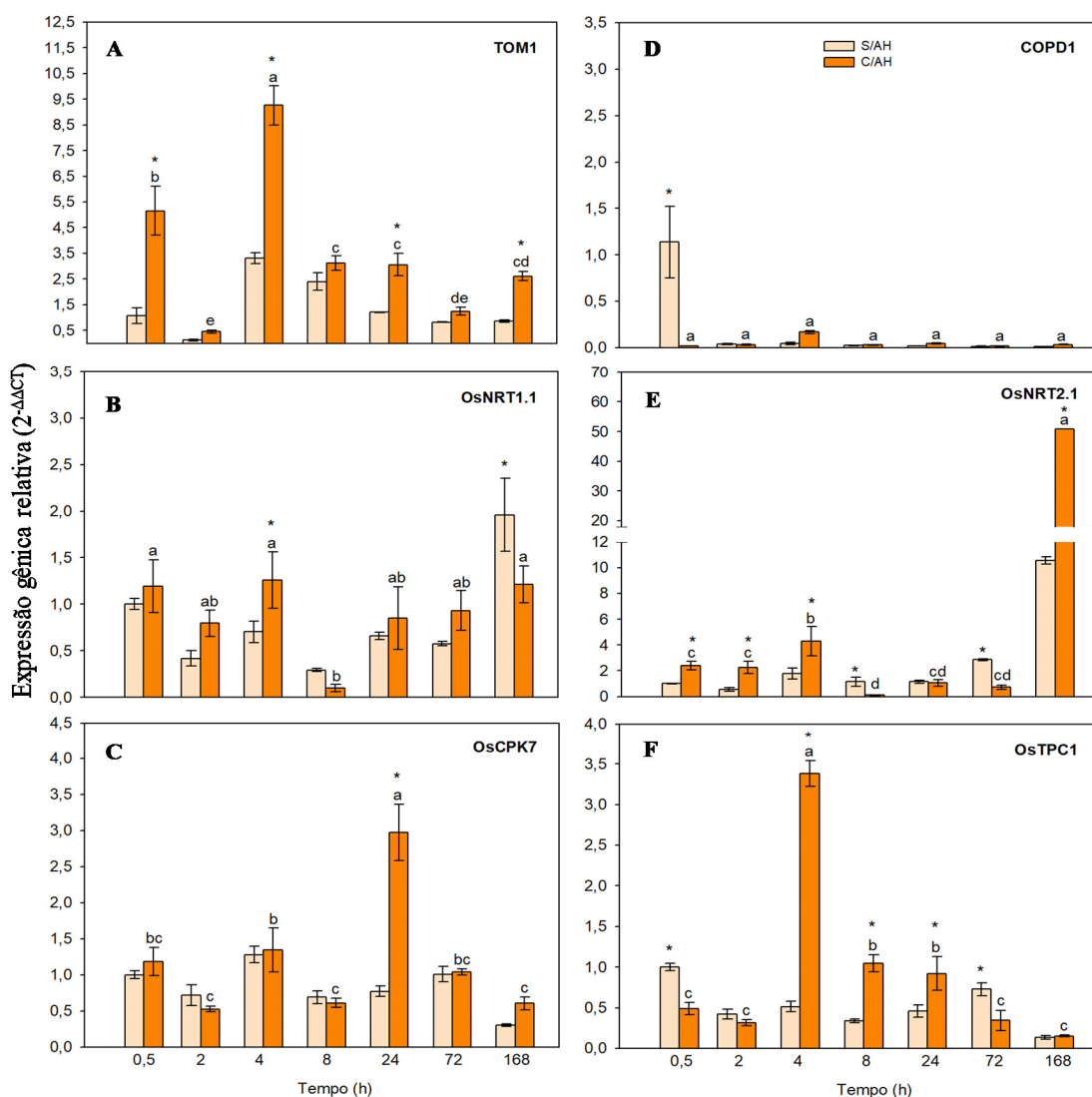


Figura 3. Expressão gênica relativa ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) dos genes *TOM1*, *OsNRT1.1*, *OsCPK7*, *COPD1*, *OsNRT2.1* e *OsTPC1* diferencialmente expressos em raiz de arroz da variedade Nipponbare, cultivada sem e com ácido húmico em diferentes tempos de exposição (0,5h; 2h; 4h; 8h; 24h; 72h e 168h). C/AH = com ácido húmico, S/AH = sem ácido húmico. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos de um mesmo tempo de exposição e as letras minúsculas diferentes, indicam a diferença significativa do tratamento com ácido húmico entre os tempos de exposição pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A indução deste gene *TOM1* (Figura 3A) permite o transporte de quelante natural de Fe, o ácido 2-desoximugínico (DMA) à rizosfera, permitindo solubilizar o Fe³⁺ (insolúvel) em um

complexo de Fe^{3+} -DMA, assim sendo absorvido pelo sistema radicular por transportadores específicos (YS1), e na presença de AH teve a maior indução no período de exposição de 4 horas. (AUNG et al., 2018; NOZOYE et al., 2019). O ferro (Fe) é um nutriente essencial a todos os organismos vivos. Para as plantas tem um papel fundamental na transferência de elétrons no processo de fotossíntese e respiração que acontece nos cloroplastos e nas mitocôndrias e a sua deficiência leva à clorose foliar e baixo rendimento das plantas.

Os genes envolvidos no transporte de NO_3^- de alta (*OsNRT2.1*) (Figura 3E) e baixa (*OsNRT1.1*) (Figura B) afinidade apresentaram expressão gênica relativa bastante distinta entre si. Para evitar a interferência do efeito da fonte de NO_3^- na análise da expressão dos transportadores de nitrato (NRTs), as plantas foram submetidas a uma concentração constante de nitrogênio (1,5 mM de N-NO_3^- e 0,5 mM de N-NH_4^+) na solução nutritiva. O gene *OsNRT1.1* demonstrou maior expressão nas primeiras horas (0,5h, 2h e 4h) após exposição ao tratamento com AH. Isso pode ser atribuído ao fato de que o *OsNRT1.1* faz parte do mecanismo de sinalização para o reconhecimento de NO_3^- na solução nutritiva (ARAÚJO et al., 2015).

O *OsNRT2.1* é considerado crucial para o uso eficiente de nitrogênio na cultura do arroz (TAVARES et al., 2016). Contudo, os níveis de expressão do *OsNRT2.1* apresentaram picos de resposta variados ao longo da exposição ao AH. Estudos como o de Tavares et al. (2016) têm demonstrado a importância do AH no aumento dos níveis de expressão do *OsNRT2.1* em plantas de arroz, observando-se o aumento de NO_3^- e da biomassa em relação aos maiores níveis de expressão deste gene, corroborando os resultados obtidos de biomassa neste estudo.

Ainda em relação aos genes associados ao transporte de nutrientes, temos o gene *OsTPC1* (Figura 3F), responsável por codificar a proteína transportadora de cálcio (Ca^{2+}) (RAMOS et al., 2015). Neste estudo, observou-se que a exposição das plantas de arroz ao AH por um período de 4 h aumentou significativamente o nível de expressão desse gene. Os íons de Ca^{2+} há muito tempo é conhecida por sua importância na sinalização celular, seja por meio da ativação de transportadores ou como mensageiro secundário. Ramos et al. (2015) verificaram que o aumento da expressão do gene *OsTPC1* foi acompanhado pelo aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico, refletindo na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas de arroz tratadas com AH. Como mensageiro secundário, o Ca^{2+} ativa proteínas quinases (*OsCPK7*), que são de suma importância na transdução de sinal celular (RAMOS et al., 2015). Neste estudo, observou-se também o aumento da expressão do gene *OsCPK7* em plantas de arroz tratadas com AH, sendo o mesmo observado no estudo de Ramos et al. (2015).

Em relação aos genes associados à homeostase redox, o gene *CuZnSOD1* (Figura 4E) foi expresso de forma significativa na presença do AH nos períodos de exposição de 0,5h, 4h, 8h e 168h. Esse gene desempenha um papel crucial na resposta tanto rápida quanto tardia à defesa contra o estresse oxidativo. Por outro lado, os demais genes (*BAS1*, *PRX11*, *GS3* e *GPX*) (Figura 4A, 4B, 4C, 4D) associados à resposta antiestresse apresentaram uma expressão mais rápida, especialmente no tempo de 4h. Estudos mostraram que aplicação de AH em sistema radicular na cultura de arroz sob déficit hídrico aumentou efeitos antiestresse pelo aumento da atividade da peroxidase comparado ao tratamento controle (sem AH+estresse hídrico) e maior atividade da forma citosólica de *CuZnSOD*, responsável em destoxificar as raízes de arroz do O_2^- (GARCIA et al., 2012, 2016). Já na cultura de cana-de-açúcar o AH aumentou significativamente atividade das enzimas SOD e outras enzimas envolvidas na atividade de peroxidase (catalase-CAT e ascorbato peroxidase-APX) no tecido foliar e radicular, permitindo a proteção dos lipídios da peroxidação e maior tolerância ao déficit hídrico, induzido pela regulação do conteúdo das espécies reativas de oxigênio (O_2^- e H_2O_2) (AGUIAR et al., 2015; GARCÍA et al., 2019).

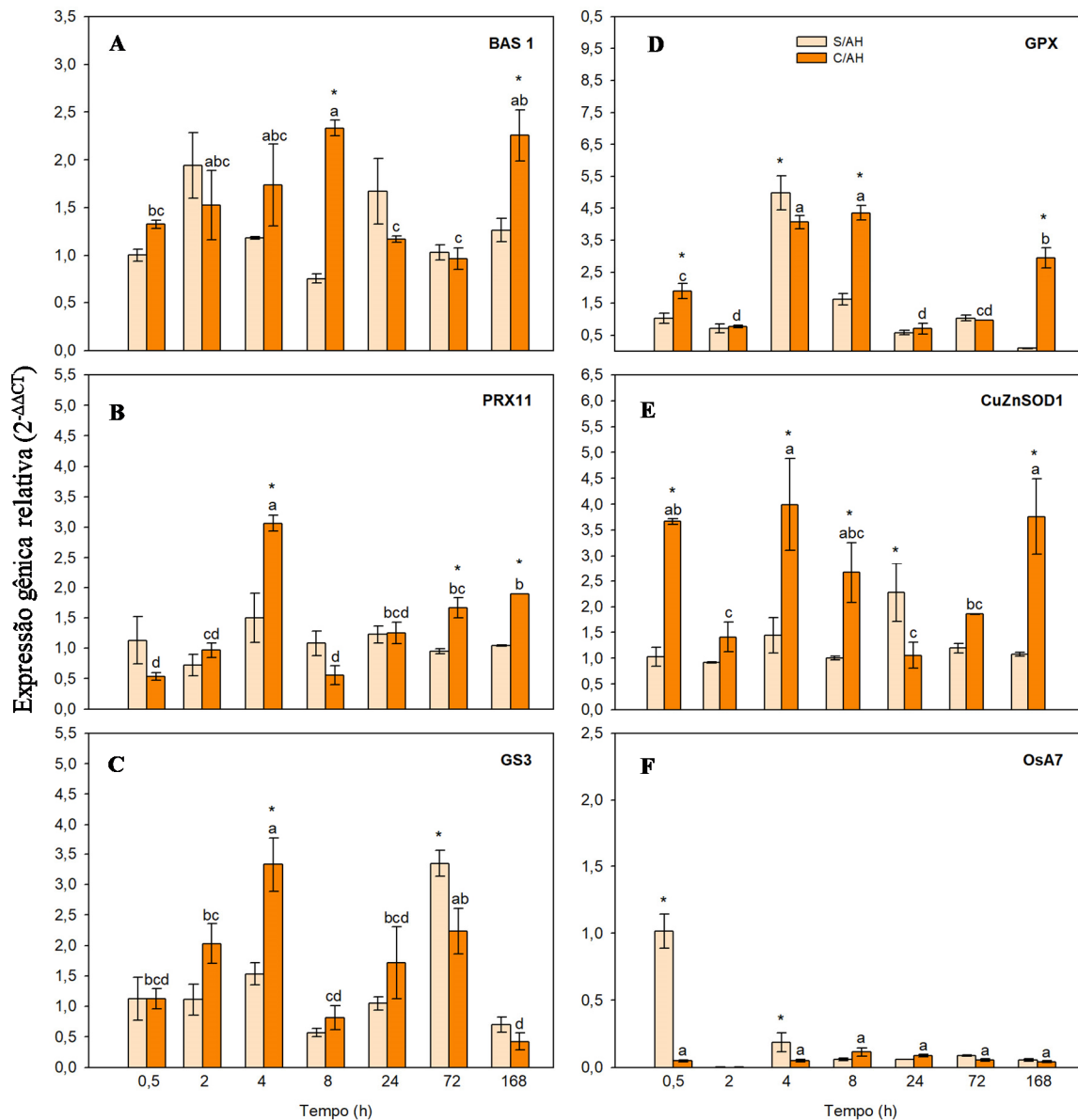


Figura 4. Expressão gênica relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos genes BAS1, PRX11, GS3, GPX, CuZnSOD1 e OsA7 diferencialmente expressos em raiz de arroz da variedade Nipponbare, cultivada sem e com ácido húmico em diferentes tempos exposição (0,5h; 2h; 4h; 8h; 24h; 72h e 168h). C/AH = com ácido húmico, S/AH = sem ácido húmico. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos de um mesmo tempo de exposição e as letras minúsculas diferentes, indicam a diferença significativa do tratamento com ácido húmico entre os tempos de exposição pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Comparando os tratamentos com e sem AH em diferentes períodos de exposição ao sistema radicular, observou-se que os genes *COPD1* (Figura 3D), *OsA7* (Figura 4F) e *SEC1b* (Figura 5B) apresentaram maior expressão em 0,5h de exposição das raízes ao tratamento sem AH. O gene *COPD1* tem grande importância no sistema endomembranoso, onde é responsável pelo transporte de proteínas do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi (AHAN et al., 2015; NUNES et al., 2019). Estudo realizado por Ahan et al. (2015) analisaram o silenciamento deste gene em *N. benthamiana* e *Arabidopsis*, que resultou em depleção da expressão e indução do interrompimento da biogênese de Golgi. No estudo de Nunes et al. (2019), a presença da substância húmica nas plantas de milho influenciou positivamente a expressão do *COPD1*,

impactando o tráfico de vesículas e os mecanismos de transporte, de modo que, essas substâncias influenciam no desenvolvimento das plantas.

No estudo de Sperandio et al. (2021) e Tavares et al. (2019), ao expor raízes de arroz ao AH e NO_3^- , a isoforma OsA7 apresentou expressão extremamente elevada. Tavares et al. (2019) analisaram o AH extraído com água (H_2O) e com hidróxido de potássio (KOH), observando que a expressão de OsA7 foi reprimida na presença do AH extraído com KOH, o que também ocorreu no presente estudo. Em contraste aos resultados deste estudo, Trevisan et al. (2011) observaram que em *Arabidopsis thaliana* submetida ao AH, houve a indução da expressão do gene SEC1B, relacionado à regulação do tráfego de vesículas. Em *Arabidopsis thaliana*, o gene KNOLLE codifica a proteína syntaxina KNOLLE, que ao interagir com o SEC1B, desempenha um papel na citocinese e na morfogênese dos pelos radiculares, fornecendo mais evidências da interação entre substâncias húmicas e o desenvolvimento das raízes (TREVISAN et al., 2011). Esses resultados indicam que o método de extração do AH influencia sua bioatividade em relação à expressão gênica.

Já os demais genes *PHS1* (Figura 5A), *EF1a* (Figura 5C), *TOR* (Figura D), *HXK5* (Figura 5E), e *IAA11* (Figura 5F) todos apresentaram indução na presença do AH, porém, cada gene apresentou uma particularidade. O gene *PHS1* extremamente induzido quando permaneceu em contato com o AH por 0,5h e 4h em relação ao demais período de exposição, atua no crescimento da planta via a organização do citoesqueleto e via modulação e estabilidade dos microtúbulos (NAOI et al., 2004). O gene *TOR* e o *EF1a* foram extremamente induzidos pelo AH no período de exposição de 4h. São genes cruciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas, pois o gene *TOR* codifica uma proteína quinase que atua na regulação do crescimento celular desde o embrião até a produção da semente (MAEGAWA, 2015; KRAVCHENKO, 2015; JINDO et al., 2020), e o gene *EF1a* está envolvido na síntese proteica, auxiliando a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo durante a fase de alongamento da cadeia polipeptídica da proteína (SARAIVA et al., 2013; ALVEZ, GOLDENBERG, 2015).

Observou-se que o gene *HXK5* (Figura 5E), associado ao metabolismo hexose (frutose/glicose), que funciona como fonte energia e componentes estruturais para o crescimento e desenvolvimento de plantas (CHO et al., 2006; FERREIRA, SONNEWALD, 2020), apresentou maior indução tardiamente na presença do AH durante o período de exposição de 168h. No entanto, essa indução tardia (168h) não diferiu significativamente dos demais períodos de exposição ao tratamento com AH.

Em relação ao gene *AIA11* (Figura 5F), observa-se uma resposta significativa à expressão do gene quando exposto ao AH, com aumentos notáveis nos períodos de 8h e 24h em comparação ao tratamento sem AH. Esse efeito pode estar relacionado à liberação de prótons e ácidos orgânicos pelas raízes, que alteram o pH do meio, promovendo a dissociação da estrutura do AH. Essa dissociação libera fragmentos de AH com propriedades semelhantes à auxina, que são então absorvidos pelo sistema radicular, induzindo a expressão do gene responsivo à auxina (CASTRO et al., 2019; RATHOR et al., 2024).

O gene *AIA11* é responsável pela codificação de transportadores de auxina, hormônio essencial na sinalização de processos fisiológicos e no desenvolvimento das plantas. A auxina interage com proteínas receptoras em rotas de transdução de sinais, regulando a tolerância ou suscetibilidade das plantas a diversos estresses e influenciando o desenvolvimento do sistema radicular (TREVISAN et al., 2010; RYU et al., 2015; GARCÍA et al., 2016c).

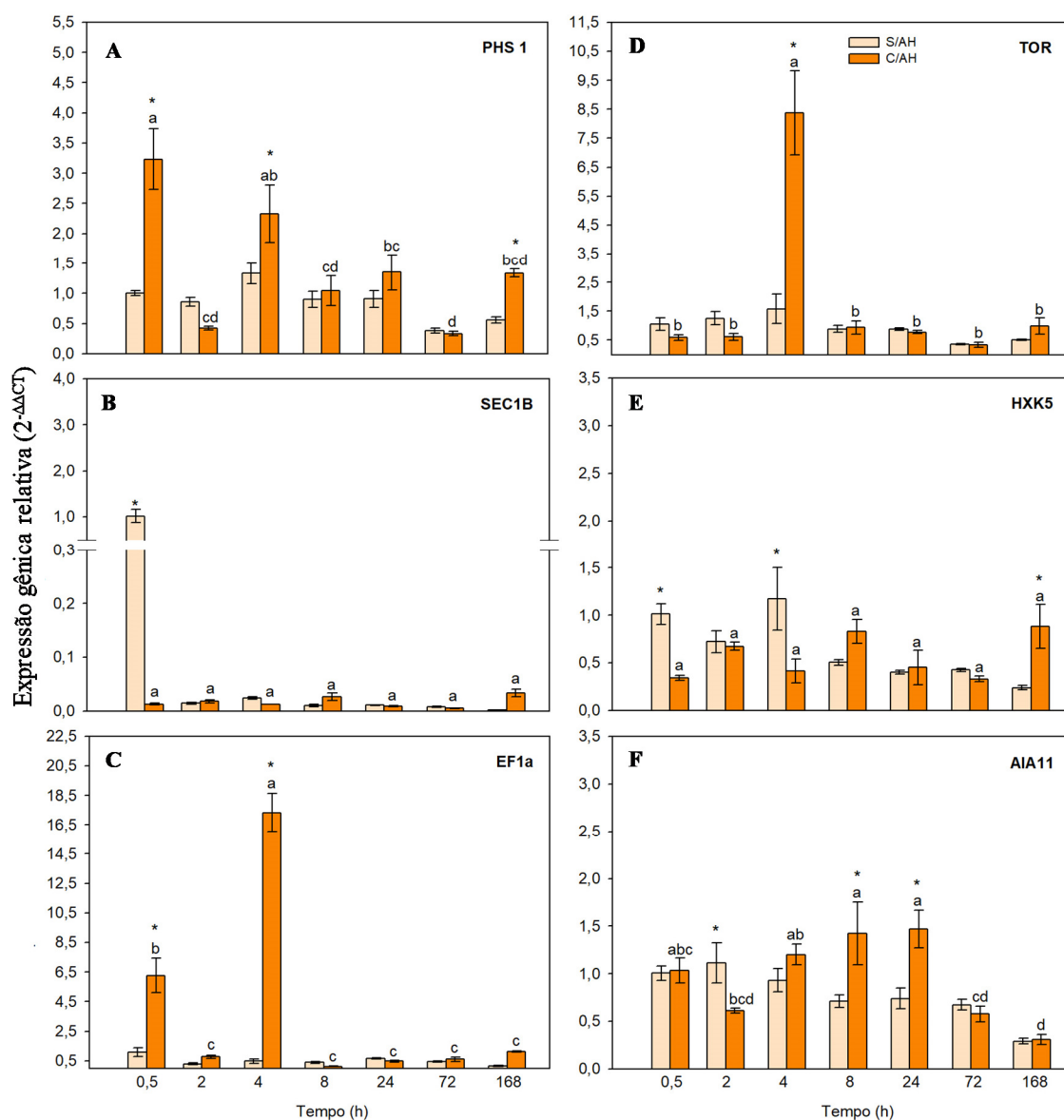


Figura 5. Expressão gênica relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos genes *PHS1*, *SEC1B*, *EF1a*, *TOR*, *HXK5* e *AIA11* diferencialmente expressos em raiz de arroz da variedade Nipponbare, cultivada sem e com ácido húmico em diferentes tempos exposição (0,5h; 2h; 4h; 8h; 24h; 72h e 168h). C/AH = com ácido húmico, S/AH = sem ácido húmico. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tratamentos de um mesmo tempo de exposição e as letras minúsculas diferentes, indicam a diferença significativa do tratamento com ácido húmico entre os tempos de exposição pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.6 CONCLUSÃO

Os tratamentos com ácido húmico promoveram alterações nos parâmetros morfológicos do sistema radicular e no incremento da biomassa das plantas de arroz em solução nutritiva. Entre os tratamentos estudados, a dose de 80 mg L⁻¹ de ácido húmico promoveu o maior estímulo aos parâmetros morfológicos nas plantas de arroz da variedade Nipponbare.

O tempo de exposição de 4h com 80 mg L⁻¹ de AH em sistema radicular de cultura de arroz, já foi suficiente para provocar significativas alterações da expressão de diversos genes, possivelmente envolvidos em mecanismos de sinalização. Os resultados também mostraram que apesar de serem responsivos ao tratamento com AH, os genes possuem pico de resposta transcricional em tempos variados, evidenciando uma dinâmica de alterações no metabolismo da planta enquanto dura a exposição ao AH.

4. CAPÍTULO II

RESPOSTA TRANSCRICIONAL DE *ORYZA SATIVA* À APLICAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO

4.1 RESUMO

O ácido húmico (AH) é uma das frações das substâncias húmicas e tem sido objeto de estudo na agricultura, com foco em determinar a dose ideal para maximizar o crescimento e o desenvolvimento das plantas. No entanto, diante dos desafios agrícolas e das mudanças climáticas globais, é crucial desenvolver conhecimentos que permitam melhorar a tolerância das plantas às condições adversas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi compreender a influência do AH nos níveis de expressão gênica em arroz por meio da tecnologia de sequenciamento em larga escala de RNA (RNA-Seq), para identificar genes envolvidos com a promoção do crescimento das plantas e/ou envolvido com a tolerância a estresses. Para isso, amostras de RNA total foram obtidas a partir das raízes e parte aérea de plantas de arroz da variedade Nipponbare, tratadas com 80 mg AH L⁻¹ por um período de 4h. Essas amostras de RNA total foram sequenciadas no equipamento Illumina HiSeq 2000, com profundidade 30 milhões de reads por amostras. Os resultados revelaram 294 genes diferencialmente expressos (DEG), sendo 239 genes na raiz e 55 genes na parte aérea das plantas de arroz. Essa diferença significativa entre os diferentes tecidos sugere que, quando aplicado via radicular, o AH tem um efeito maior sobre as raízes. Além disso, a maioria dos genes apresentou regulação negativa ($\text{Log}_2 \text{FC} \geq -1$) em ambos os tecidos, indicando que após um curto período de exposição ao AH a resposta transcricional é predominantemente de repressão. Com a análise de enriquecimento funcional foi possível compreender melhor o perfil funcional desses DEG. Foram identificados 91 DEG associados a função molecular, processos biológicos e componente celular na raiz, bem como 5 DEG na parte aérea, relacionados a componente celular. Estes genes estão envolvidos em atividade de transporte transmembrana, atividade de fosfoenolpiruvato carboxiquinase e carboxilase, processo de biossíntese e metabólicos de pequenas moléculas, homeostase do amônio, metabolismo de carbono e vias metabólicas. Curiosamente, foram identificados genes da família DUF, que codificam proteínas de função desconhecida, sugerindo que o AH pode agir por caminhos ainda a serem descobertos em pesquisas futuras. Esses resultados mostram que a bioatividade do AH desempenha importante papel na regulação gênica, fornecendo informações valiosas para o desenvolvimento de plantas adaptadas às condições adversas.

Palavras-chave: Ácido Húmico. RNA-Seq. Transcriptoma. Arroz.

4.2 ABSTRACT

Humic acid (HA) is one of the humic substances fractions and has been the subject of study in agriculture, with a focus on determining the ideal dose to maximize plant growth and development. However, in view of agricultural challenges and global climate change, it is crucial to develop knowledge that allows improving plant tolerance to adverse conditions. In this context, the objective of this study was to understand the influence of HA on gene expression levels in rice through large-scale RNA sequencing (RNA-Seq) technology, to identify genes involved in promoting plant growth and/or involved in stress tolerance. For this, total RNA samples were obtained from the roots and shoots of Nipponbare rice plants, treated with 80 mg HA L⁻¹ for a period of 4 h. These total RNA samples were sequenced on the Illumina HiSeq 2000 equipment, with a depth of 30 million reads per sample. The results revealed 294 differentially expressed genes (DEG), 239 genes in the root and 55 genes in the shoot of rice plants. This significant difference between the different tissues suggests that, when applied via the root, HA has a greater effect on the roots. In addition, most genes showed downregulation ($\text{Log}_2 \text{FC} \geq -1$) in both tissues, indicating that after a short period of exposure to HA the transcriptional response is predominantly repression. With the functional enrichment analysis it was possible to better understand the functional profile of these DEG. We identified 91 DEG associated with molecular function, biological processes and cellular component in the root, as well as 5 DEG in the shoot, related to cellular component. These genes are involved in transmembrane transport activity, phosphoenolpyruvate carboxykinase and carboxylase activity, biosynthesis and metabolism of small molecules, ammonium homeostasis, carbon metabolism and metabolic pathways. Interestingly, genes from the DUF family were identified, which encode proteins of unknown function, suggesting that HA may act through pathways yet to be discovered in future research. These results show that HA bioactivity plays an important role in gene regulation, providing valuable information for the development of plants adapted to adverse conditions.

Key words: Humic Acid. RNA-Seq. Transcriptome. Rice.

4.3 INTRODUÇÃO

O mundo tem enfrentado desafio em alimentar a população crescente e proteger a produção agrícola das mudanças climáticas (FERREIRA, 2017). A demanda por alimentos deve aumentar até 2050, e estima-se que nas próximas décadas a produção de alimento, precisa ser aumentada cerca de 70% para atender a demanda de 9,5 bilhões de pessoas (CANELLAS et al., 2015; TANG et al., 2023). Dentre os alimentos, o arroz é um dos pilares da alimentação global que enfrenta esses desafios (NARDI et al., 2018; OLIVEIRA, 2020). Sua relevância não é apenas econômica, mas também social, por ser a principal fonte de energia, amido, proteínas, vitaminas e nutrientes necessários para a dieta básica de mais da metade da população mundial concentrada em países em desenvolvimento (SOUZA, 2018, TANG et al., 2023).

Novas abordagens vêm sendo utilizadas para intensificar a agricultura de maneira sustentável (CANELLAS et al., 2015). Neste contexto, temos a aplicação de bioestimulante no solo e/ou nas plantas (GEMIN, MÓGOR, MOGOR, 2019; OLIVEIRA, 2020) que contribuem para melhorar o rendimento da produção de alimentos, por meio das substâncias bioativas que desencadeiam diversos processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos nas plantas (NARDI et al., 2018; OLIVEIRA, 2020). O ácido húmico (AH) é uma das frações das substâncias húmicas reconhecida como bioestimulante por cientistas e organizações internacionais, que estimula expressão de genes envolvidos na absorção, metabolismo hormonais e redox, que vem sendo amplamente utilizada na agricultura para promoção do crescimento e adaptação das plantas as condições adversas do ambiente (TAVARES, 2014; NARDI et al., 2015; CONSELVAN et al., 2017; CANELLAS et al., 2015, 2020; OLIVEIRA, 2020; SILVA, 2018, 2022; ZHANG et al., 2023).

O AH influencia o desenvolvimento das plantas por meio da sua interação com a rizosfera (ação indireta) e com a membrana celular de superfície radicular (ação direta) (YANG et al., 2023). Por exemplo, em *Arabidopsis* quando submetidas a diferentes concentrações e frações granulométricas de AH, aumentou de 7% a 33% a raiz principal e apresentou efeito significativo no número e comprimento das raízes laterais, bem como, na densidade das raízes (CANELLAS et al., 2010). Para Asli e Neumann (2010) o AH ao interagir com a superfície radicular causa estresse coloidal que aumenta a resistência ao déficit hídrico. Hita et al. (2020) ao estudarem diferentes concentrações de AH aplicadas em plantas de pepino, observaram que a aplicação foliar de 40 mg AH/L⁻¹ resultou no melhor peso seco da parte aérea e das raízes, após 72 horas do início do tratamento.

A maior parte dos estudos de AH na produção agrícola estão voltados a determinar a melhor dose que maximize o desenvolvimento radicular das plantas (YANG et al., 2023). Contudo, para lidar com os novos desafios da produção agrícola é necessário gerar conhecimentos que permita obter plantas tolerantes as condições adversas (FERREIRA, 2017). Com o advento da análise transcriptômica é possível explicar os efeitos biológicos oriundos por alterações ambientais, por meio da quantificação dos níveis de expressão gênica que permitam identificar genes que ainda não tem função conhecida (NETO, 2009; FERREIRA, 2017; FAGUNDES, CAGLIARI, 2019). Neste contexto, o presente estudo teve o objetivo de investigar a influência do AH nos níveis de expressão gênica em arroz por meio da tecnologia de sequenciamento em larga escala de RNA (RNA-Seq), para identificar genes potencialmente envolvidos em mecanismo de sinalização para a promoção do crescimento radicular e/ou tolerância das plantas a estresses.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Obtenção do RNA

A partir dos dados obtidos no experimento anterior foi selecionado o tempo de 4h para o experimento de RNA-Seq. As mesmas amostras de RNA total que foram obtidas no experimento II (item 3.4.3.3) e armazenadas em freezer -80°C foram resgatadas e enviadas para sequenciamento. Todos os procedimentos, desde a quantificação com fluoróforo específico para RNA, análise de qualidade do RNA, preparo das bibliotecas e sequenciamento foram realizadas no Centro de Genômico Funcional (Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia) da ESALQ/USP, Piracicaba – SP. No Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UFRJ foram realizados os procedimentos de extração do RNA-total, quantificação em espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific), análise de qualidade por meio da razão de absorbância $A_{260/280}$ e integridade do RNA total por gel de agarose. Com exceção do Número de Integridade do RNA (RIN), as demais análises de qualidade do RNA foram obtidas como descrito no item 3.4.3.5 e no item 3.4.3.6.

4.4.2 Análise da integridade das amostras de RNA total

Foi realizada por meio do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer que forneceu informações sobre a integridade e pureza das amostras, por meio de imagens de eletroforese e eletroferograma que mostraram os fragmentos presentes em cada amostra, com seus respectivos tamanhos e quantificação relativa dos picos de cada fragmento, resultando no Número de Integridade do RNA (RIN) para cada amostra de RNA total. As amostras foram classificadas de acordo com três classes de qualidade: altamente degradado (RIN 1-3), qualidade intermediária (RIN 4-6) e alta qualidade (RIN 7-10). Todas as amostras usadas no presente experimento foram classificadas como de alta qualidade.

4.4.3 Preparação das bibliotecas e sequenciamento de RNA

Foram usadas amostras de mRNA obtidos de RNA total após enriquecimento com poliA usando o kit TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de RNA usadas no preparo das bibliotecas apresentaram RIN acima de 8.

O sequenciamento das bibliotecas foi realizado no equipamento NextSeq 2000, no esquema pair-end 2x100pb, média de cobertura de 15 milhões de clusters ou 30 milhões de leituras pareadas por amostra.

4.4.4 Análise dos dados do sequenciamento de RNA

a) Pré-processamento dos dados

- Avaliação da qualidade das “reads”

Após a geração dos arquivos do sequenciamento de cada amostra foi realizado a confirmação da qualidade dos “reads”, por meio da ferramenta fastp (CHEN et al., 2018). Quando aplicável, adaptadores e sequências de baixa qualidade (<Q15 na escala Phred) foram removidos e realizado uma nova confirmação da qualidade.

- Quantificação de expressão gênica

Para quantificar a abundância de transcritos ao nível de gene (frequentemente chamada de “expressão gênica”) de cada amostra foi utilizado o programa salmon (PATRO et al., 2017), que possui algoritmo baseado em um “quasi-mapping do reads” (alinhamento dos reads) contra um transcriptoma de referência. O transcriptoma de referência utilizado foi o assembly IRGSP 1.0 de *Oryza sativa* spp. *Japônica*, obtido do banco de dados PLAZA 5.0 (VAN BEL et al., 2022), o mesmo disponível no banco de dados Ensembl Plants 56.

A interpretação da quantificação da expressão gênica é baseada em porcentagem (%) dos “quasi-mapping do reads” que foram classificados de acordo com três classes: alto mapeamento (80-90%), médio mapeamento (50-80%) e ruim mapeamento (<50%).

- Análise exploratória dos dados de expressão gênica

Para explorar se as amostras agrupam como esperado, foram usados os métodos de correlação entre todos os possíveis pares de amostras e a redução de dimensionalidade com análise de componentes principais (PCA).

Para a visualização exploratória dos dados, a matriz de expressão foi filtrada para remover genes cuja soma da expressão em todas as amostras fosse inferior a 10 reads e foi aplicado transformação estabilizadora de variância usando o pacote R DESeq2 (LOVE, HUBER, ANDERS, 2014).

b) Análise de genes diferencialmente expresso

Para obter as análises de genes diferencialmente expresso foi usado o pacote R DESeq2 (LOVE, HUBER, ANDERS, 2014). Nesta etapa analisou-se os níveis de transcritos na raiz e na parte aérea, nos seguintes contrastes: controle vs tratamento. Para o ajuste estatístico os níveis de transcritos foram submetidos ao método “*original counts with offset*” por meio do pacote R tximport (SONESON, LOVE, ROBINSON, 2015).

Os genes foram considerados diferencialmente expressos com regulação positiva, quando apresentaram o p-value ajustado (correção por Benjamini-Hochberg) <0,05 e o Fold Change $\log_2$ > ou igual a 1 ($\log_2$ FC ≥ 1). Os genes foram considerados diferencialmente expressos com regulação negativa, quando apresentaram o p-value ajustado (correção por Benjamini-Hochberg) <0,05 e o Fold Change $\log_2$ < ou igual a -1 ($\log_2$ FC ≤ -1).

c) Análise de enriquecimento funcional

Para compreender a função dos genes regulados positivamente (Up) e negativamente (Down) foram submetidos análise de ontologia gênica (em inglês: *Gene Ontology*, *GO*) e do banco de dados KEGG (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto), por meio da plataforma g:Profiler (REIMAND et al., 2007).

Para observar possível interação entre as funções biológicas dos genes regulados positivamente e negativamente foram submetidos a análise do diagrama de Venn, por meio da plataforma Bioinformatics & Evolutionary Genomics.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Avaliação da integridade das amostras de RNA e pré-processamento das “reads”

A integridade do RNA é o critério mais importante na obtenção de resultados de boa qualidade no sequenciamento (SHENG et al., 2016) (Figura 6). O uso de RNA degradado ou de qualidade inferior, compromete significativamente a eficiência do sequenciamento, o que, por sua vez, inviabiliza análises bioinformáticas subsequentes (GONÇALVES, 2017). A avaliação da integridade de amostras de RNA pode ser analisada por meio da proporção de rRNA 28S:18S obtida automaticamente pelo Bioanalyzer (Agilent) que calcula o número de integridade do RNA (RIN) (Erro! Fonte de referência não encontrada.6).

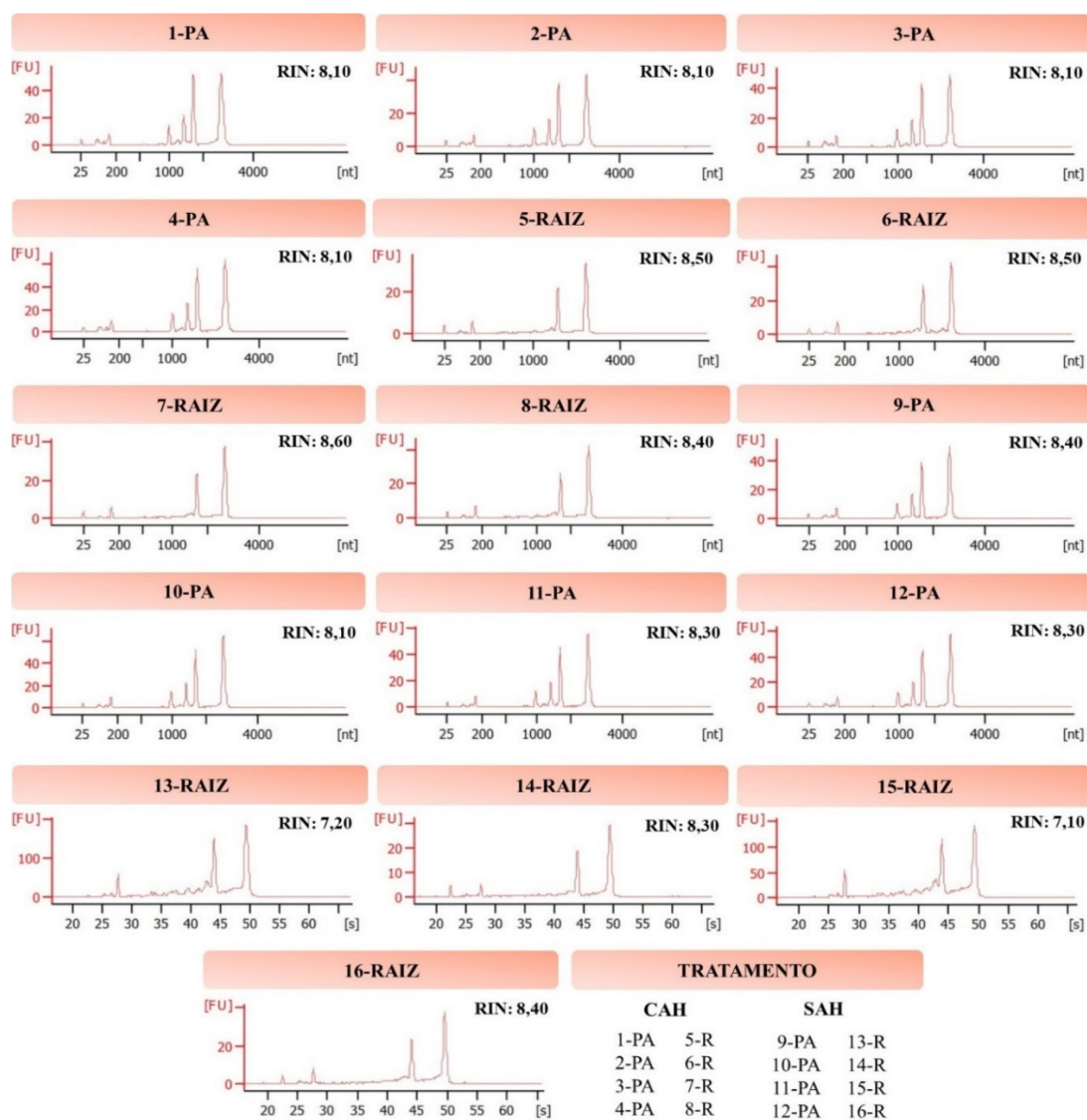


Figura 6. Eletroferograma de 16 amostra de RNA total de raiz e parte aérea (PA) de cultura de arroz, tratadas com (CAH) e sem (SAH) ácido húmico de vermicomposto por um período de 4h. Classificação de RIN: altamente degradado (RIN 1-3), integridade intermediária (RIN 4-6) e alta integridade (RIN 7-10).

Por meio das pontuações fornecida pelo RIN para integridade das amostras de RNA com base na sua degradação (GONÇALVES, 2017). Observou-se, neste estudo das 16 amostras de RNA analisadas, somente as amostras 13R (RIN: 7,20) e 15R (RIN: 7,10) apresentaram RIN abaixo de 8 (Figura 6). De acordo com Sheng et al. (2016) e Gonçalves (2017) RIN maior do que 7 é considerado bom e apropriado para realizar análises posteriores. Logo, as amostras de RNA de raiz e parte aérea de cultura de arroz analisadas neste estudo, apresentaram uma alta integridade, possibilitando sucesso no preparo das bibliotecas e no sequenciamento.

Durante o processo de sequenciamento das bibliotecas podem ser introduzidos alguns erros, podendo distorcer resultados das análises posteriores. Portanto, é essencial a realização da avaliação da qualidade das “reads” (DESHPANDE et al., 2016). Em razão disso, foram removidas as “reads” que apresentaram baixa qualidade por meio da ferramenta fastp, conferindo a uma perda de aproximadamente de 1% de “reads” para cada tratamento (CAH e SAH) (Tabela 8). Também, foi observado por Ferreira (2017) uma perda de aproximadamente de 2% de “reads” após o pré-processamento, não comprometendo os resultados posteriores, sendo o mesmo observado neste estudo.

Tabela 8. Estatísticas descritivas do controle de qualidade de sequências RNA-Seq de amostras de raiz e parte aérea (PA) de cultura de arroz tratadas com e sem ácido húmico. CAH: Com ácido húmico e SAH: sem ácido húmico.

Samples	Million reads (before)	Million reads (after)	% reads passed	% Q20 (before)	% Q20 (after)	% Q30 (before)	% Q30 (after)	% Duplication
Raiz - SAH	43,50	43,10	99,16	97,49	97,74	94,54	94,85	16,73
Raiz - SAH	44,60	44,30	99,21	97,5	97,74	94,54	94,84	17,45
Raiz - SAH	45,60	45,20	99,11	97,46	97,73	94,49	94,82	17,43
Raiz - SAH	52,50	51,90	98,82	97,34	97,71	94,38	94,81	23,97
Raiz - CAH	47,40	47,00	99,08	97,48	97,77	94,54	94,88	18,62
Raiz - CAH	46,50	46,20	99,25	97,52	97,74	94,56	94,84	17,72
Raiz - CAH	45,40	45,00	99,25	97,55	97,78	94,63	94,91	17,44
Raiz - CAH	45,50	45,10	99,23	97,48	97,72	94,51	94,8	18,24
PA - SAH	43,70	43,40	99,22	97,54	97,78	94,62	94,91	19,16
PA - SAH	44,40	44,10	99,28	97,55	97,77	94,63	94,90	20,44
PA - SAH	43,30	43,00	99,25	97,54	97,77	94,61	94,90	19,27
PA - SAH	42,80	42,50	99,21	97,54	97,78	94,63	94,93	20,11
PA - CAH	48,60	48,20	99,25	97,6	97,82	94,72	95,00	20,94
PA - CAH	49,00	48,60	99,13	97,49	97,76	94,54	94,87	20,97
PA - CAH	45,30	45,00	99,25	97,53	97,76	94,59	94,88	20,96
PA - CAH	40,80	40,50	99,26	97,60	97,83	94,74	95,03	20,33

Por meio da estatística descritivas mostrou que as “reads” após o pré-processamento, possuem alta qualidade de sequência, visto que todas as amostras apresentaram acima de 98% de “reads passed”, desta forma passando no teste de qualidade (Tabela 8). Como as bases nitrogenadas guanina (G) e citosina (C) estão envolvidas com a funcionalidade e estabilidade da molécula de DNA podem influenciar no sequenciamento, comprometendo os níveis de genes diferencialmente expressos (DEG) (RISSO et al., 2011; YOOSEFIAN, MOLA, 2015). Portanto, neste estudo determinou o conteúdo de G e C nas “reads”, observando que a porcentagem de Q20 e Q30 são muito altas, próximas de 98% e 95%, respectivamente (Tabela 8), conferindo menor suscetibilidade à degradação e maior estabilidade na amplificação e fidelidade no sequenciamento (RISSO et al., 2011). Os conjuntos de dados de RNA-Seq e microarray analisados por Swindell et al. (2014) identificaram números semelhantes de DEG. Entretanto, o equilíbrio do aumento e diminuição dos DEG foram influenciados pelo conteúdo de GC. Onde, genes fracamente expressos estavam associados ao baixo conteúdo de G e C.

Para algumas amostras, a “% Duplication” está acima de 20%, mas não compromete as análises subsequentes, por ser uma porcentagem esperada e aceitável, quando os valores entre as amostras encontram homogêneos (CONESA et al., 2016) (Tabela 9). As “reads” resultante do sequenciamento, apresentaram uma porcentagem média de mapeamento ao transcriptoma de referência de 88%, valor bem acima do mínimo exigido que é de 50% (CHEN et al., 2018) (Tabela 9). No entanto, as estimativas de abundância de transcritos obtidos apresentaram um viés que precisou ser corrigido com o método “original counts with offset”, pois transcritos mais longos terão maior expressão.

Tabela 9. Porcentagem de mapeamento das reads no transcriptoma de referência.

Amostra	% Quasi-Mapping
Raiz - SAH	87,12
Raiz - SAH	87,09
Raiz - SAH	86,90
Raiz - SAH	86,99
Raiz - CAH	87,30
Raiz - CAH	87,44
Raiz - CAH	87,51
Raiz - CAH	88,02
PA - SAH	88,95
PA - SAH	89,39
PA - SAH	89,20
PA - SAH	88,83
PA - CAH	86,79
PA - CAH	89,00
PA - CAH	89,02
PA - CAH	89,28
Média	88,00

Com a análise de componentes principais (PCA) obtive resultados exploratório dos dados do mapeamento. Os resultados mostram que os dados do mapeamento não agruparam conforme esperado que seria controle versus tratamento (Figura 7). Por meio da PCA e das correlações entre as amostras é possível visualizar que as amostras agruparam melhor por tipo de tecidos (raiz e parte aérea), e não pelo tratamento (CAH e SAH) (Figura 7).

Ainda, observa-se que as amostras de cada tecido agrupam de maneira relativamente uniforme, o que torna difícil distinguir as amostras tratadas das de controle (Figura 7). Além disso, a PC1 explica 99% da variação nos dados, destacando que a maior parte das diferenças está associada às variações entre os tecidos, enquanto apenas 1% reflete a ação do ácido húmico aplicado por um período de 4h em plantas de arroz da variedade Nipponbare (Figura 7). Esse resultado mostra que apesar de provocar alterações no perfil de transcritos em arroz, o HA não provoca alterações tão profundas quanto o observado em estudos onde plantas são submetidas a estresses como seca, salinidade, patógeno, entre outros (KIM, AN, 2013; CHAUDHARY et al., 2019; QUAN et al., 2019). Os níveis das alterações também são mais baixos comparado a outros estudos, indicando que o AH provoca alterações sutis no transcriptoma, contudo, suficiente para gerar os benefícios já relatados.

As variações observadas entre os diferentes tipos de tecidos podem estar associadas à interação direta do ácido húmico com as raízes, resultando em repostas imediatas, como a modulação da expressão gênica, possivelmente envolvidas em processos de sinalização

(TAVARES et al., 2016; OLAETXEA et al., 2018). Subsequentemente, as raízes transmitem sinais e compostos para a parte aérea da planta, afetando processos bioquímicos distintos daqueles desencadeados nas raízes. Essas respostas ocorrem de maneira indireta e sistêmica, frequentemente induzidas por sinais hormonais originados do efeito bioativo do ácido húmico nas raízes (VACCARO et al., 2015; OLAETXEA et al., 2018; GARCIA et al., 2018).

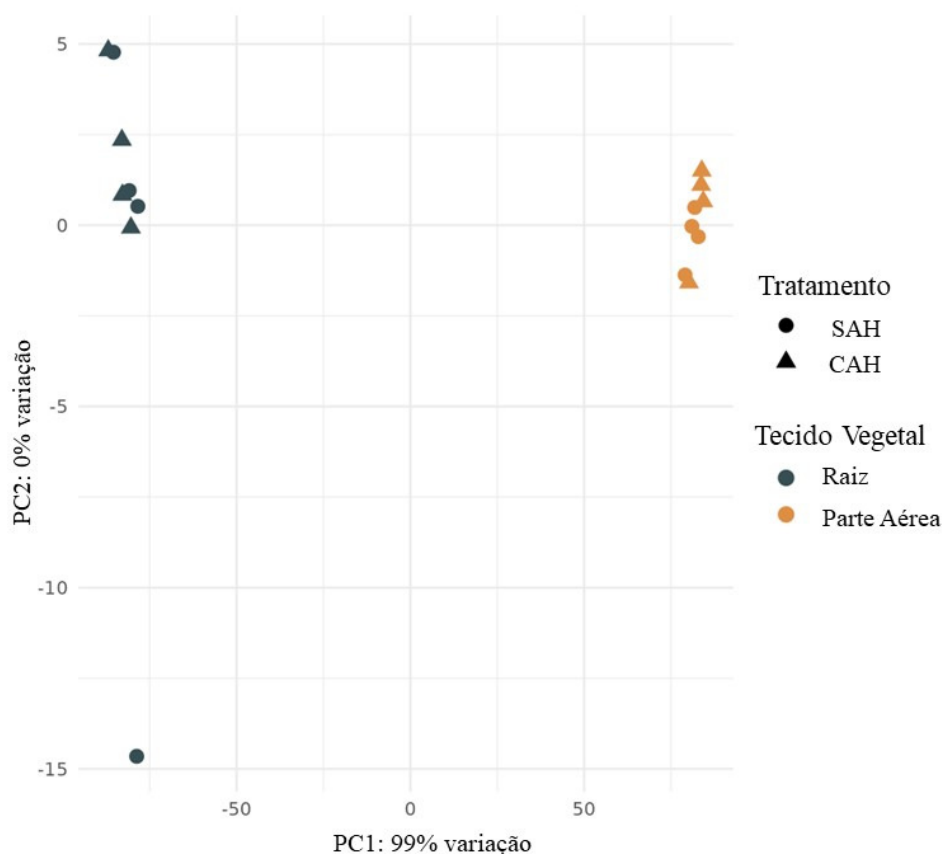


Figura 7. Análise exploratória dos dados do mapeamento ao transcriptoma de referência por meio da análise de componentes principais (PCA). Tratamento: SAH: sem ácido húmico e CAH: com ácido húmico.

A diferença na resposta entre os tipos de tecidos é compreensível, visto que as formas de aplicação do AH (via raiz ou/e foliar) são fatores críticos na modulação de diversas respostas fisiológicas nas plantas (HITA et al., 2020). Hita et al. (2020) relataram que a aplicação foliar de AH em um curto período não resultou no aumento expressivo de ácido abscísico nem na atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática nas raízes. A ausência desses efeitos essenciais da bioatividade do AH na parte aérea, sugere um potencial efeito tardio na modulação gênica, devido à falta de contato imediato do composto bioativo com o sistema radicular.

Estudos demonstram que as alterações conformacionais da estrutura do AH, promovidas pelos exsudatos radiculares, liberam fragmentos húmicos que interagem diretamente com as raízes. Esse processo é mediado por interações químicas, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, permitindo que a estrutura polar do ácido húmico entre em contato com a membrana epidérmica do sistema radicular. Essa interação resulta na absorção do AH, causando um tipo de “pseudoestresse” ou “euestresse”, o que contribui para um aumento mais significativo da expressão gênica nas raízes em comparação com a parte aérea (GARCÍA et al., 2018; VACCARO et al., 2015; CASTRO et al., 2021).

Outro fator da interação do AH-raiz responsável em influenciar a expressão gênica, são as espécies reativas de oxigênio (ERO) (CORDEIRO et al., 2011; GARCÍA et al., 2016, 2018; ELMONGY et al., 2020; SOUSA, 2023). Um estudo conduzido por Sousa (2023) sugere que o efeito estimulante do ácido húmico sobre a expressão gênica é dependente das ERO. Esse efeito foi evidenciado pela aplicação de inibidores de ERO em combinação com AH em raízes de plantas de arroz, resultando em alterações na regulação gênica e no aumento da expressão de genes responsáveis por codificar enzimas antioxidantes.

4.5.2 Análise de genes diferencialmente expresso

A identificação precisa de genes diferencialmente expressos (DEG) é essencial para a compreensão da função dos genes e a identificação de genes-chave em diferentes condições e em estágios específicos de desenvolvimento de plantas (SILVA et al., 2017; XING et al., 2018). Neste estudo observou-se influência significativa na quantidade total de DEG entre os diferentes tipos de tecidos após um período de exposição de 4h do sistema radicular ao AH. Este resultado está de acordo com os resultados exploratório do mapeamento das “reads”, obtidos na análise de componentes principais (PCA) (Figura 7). Foi obtido 294 DEG, sendo 239 genes na raiz e 55 genes na parte aérea da cultura de arroz (Figura 8D).

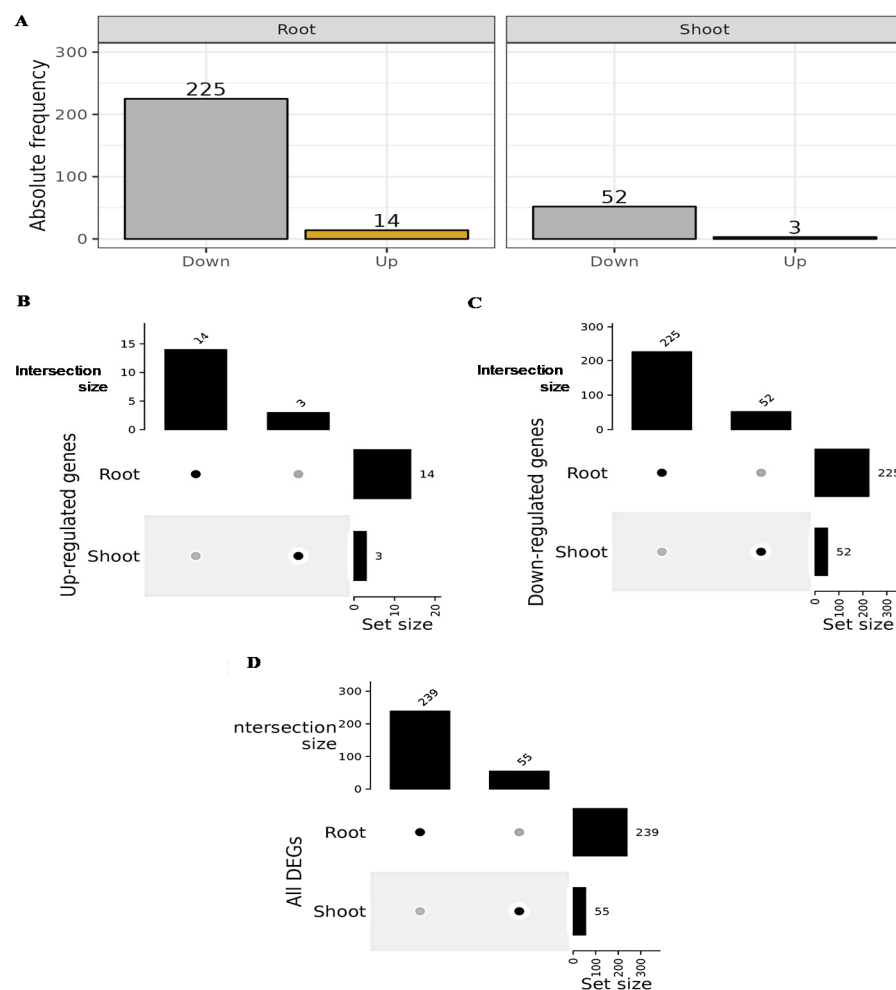


Figura 8. Frequência absoluta de genes diferencialmente expressos (DEG) (A) e sobreposição entre diferentes contrastes (B), (C) e (D). Contrastes: raiz (root) e parte aérea (shoot), Up-regulated genes: regulação positiva, Down-regulated genes: regulação negativa.

Os dados apresentados revelam que o AH exerce um efeito significativo sobre a regulação gênica nas plantas de arroz, com uma predominância marcante de repressão gênica em um período de 4h de exposição. Análise identificou 277 genes com regulação negativa (down-regulation) (Figura 8C) em comparação com apenas 17 genes com regulação positiva (up-regulation) (Figura 8B), sugerindo que a resposta das plantas ao AH tende a ser um ajuste down-regulation. Este padrão é consistente em ambos os tipos de tecido analisados, implicando que a presença de AH favorece a repressão gênica ao invés a indução, pelo menos após um curto período de exposição (4h).

Ferreira (2017) demonstrou que o estresse hídrico em plantas de arroz induz uma resposta de regulação gênica significativamente diferente deste estudo, com uma rápida indução de 272 genes e repressão de 104 genes em apenas 2h de exposição. A rápida indução de genes como *OsNAC10*, *OsWRKY11*, *OsMYB4*, *OsDREB1A*, *OsZIP71* e *OsqRT9* sugere uma maior adaptação ao estresse hídrico, conferindo em uma maior tolerância à planta. O estudo de Cha et al. (2021) sobre o efeito do AH em condições de estresse salino em *Arabidopsis* ao longo de 9h, também observou uma predominância de regulação negativa de genes, especialmente aqueles envolvidos na biossíntese de antocianinas, como o *Anthocianidina sintase*. As antocianinas desempenham um papel crucial na defesa das plantas contra estresses abióticos, que são pigmentos vegetais solúveis em água das subclasses de flavonóides dos fenilpropanóides.

A partir desses resultados sugerem que o estresse induzido pelo AH, em um período curto de exposição, tende a ser mais brando em comparação com o estresse hídrico. Além disso, esses resultados mostram que tanto os genes regulados positivamente quanto negativamente estão envolvidos na resposta das plantas a adaptação e proteção contra condições adversas. As Figuras 8B, 8C e 8D demonstram que as respostas transcricionais diferem significativamente entre as diferentes partes da planta (raiz e parte aérea) no arroz, evidenciando a ausência da sobreposição entre os conjuntos de genes expressos nessas regiões.

4.5.3 Análise de enriquecimento funcional

Através da análise de enriquecimento funcional, é possível agrupar genes que participam dos mesmos processos biológicos ou vias de desenvolvimento, permitindo compreender o perfil funcional desse conjunto de genes (PEREIRA, 2021). Com esse objetivo, buscou-se identificar as rotas metabólicas predominantemente afetadas pelo ácido húmico. Para isso, foi necessário explorar as funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos dos 294 DEG por meio da análise de ontologia (GO) e rotas metabólicas no banco de dados KEGG (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto). A análise revelou que 96 dos DEG estão significativamente enriquecidos em uma categoria biológica específica. Destes 96 DEG, 91 estão envolvidos em funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares na raiz, enquanto apenas 5 DEG estão associados aos componentes celulares da parte aérea da planta de arroz (Figura 9).

Na categoria de função molecular (MF) (Figura 9), observou-se a predominância de genes associados à atividade de transporte transmembrana, assim como a atividade de fosfoenolpiruvato carboxiquinase e carboxilase. Esses genes desempenham papéis cruciais na regulação e movimentação de moléculas através das membranas celulares, contribuindo no crescimento e desenvolvimento das plantas (GILL et al., 2021), além de estarem envolvidos em importantes reações de carboxilação (SÁNCHEZ, CEJUDA, 2003; XIA, CAO, 2013; CHIBA et al., 2015).

Para a categoria de processo biológico (BP) (Figura 9), os agrupamentos de genes mostraram uma forte associação com o transporte e os processos biossintéticos e metabólicos de pequenas moléculas. Além disso, observou-se genes com relação a homeostase do amônio,

indicando um papel central desses genes na regulação do nitrogênio intracelular (Zhou et al., 2015).

Na categoria de componentes celulares (CC) (Figura 9), os genes analisados estão principalmente localizados no plastídio e no apoplasto. O plastídio é uma organela essencial nas células vegetais, envolvido em processos como a fotossíntese e a síntese de ácido graxos (HOLZL, DORMANN, 2019), enquanto o apoplasto refere-se a matriz extracelular onde acontecem importantes interações e transportes de substâncias (DELAUNOIS et al., 2014; MISRA, 2016; GUIMARÃES et al., 2016).

Por fim, a análise da base de dados KEGG (Figura 9) revelou que os genes estão significativamente enriquecidos em vias relacionadas à fixação de carbono em organismos fotossintéticos, ao metabolismo de carbono e as vias metabólicas. Isso sugere que esses genes desempenham papéis centrais na assimilação de carbono e na manutenção das atividades metabólicas importantes ao crescimento e desenvolvimento celular (DUCAT, SILVER, 2012; BAR-EVEN, 2018).

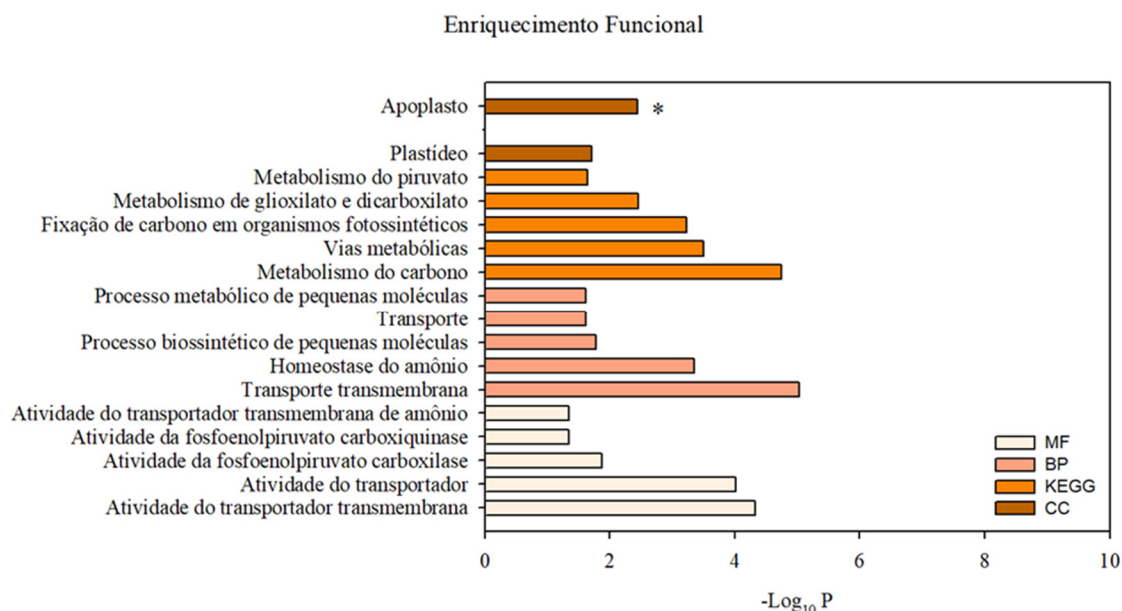


Figura 9. Análise de enriquecimento funcional para diferentes categorias biológicas, representadas por termos da ontologia gênica (GO) e do bando de dados KEGG (Rota Metabólica). No eixo vertical (y) lista as categorias funcionais, enquanto o eixo horizontal (x) mostra os valores de $-\text{Log}_{10} P$ (p-value ajustado), que indicam o nível de significância estatística do enriquecimento de cada categoria biológica.

A análise do diagrama de Venn (Figura 10) permitiu a observar a interação dos DEG entre as categorias biológicas em resposta à exposição de arroz ao ácido húmico durante um período de 4h e evidencia como a bioatividade do ácido húmico influencia a expressão gênica nas diversas categorias funcionais. As sobreposições mais significativas entres os conjuntos de genes ressaltam as interações entre função molecular (MF-raiz) e processos biológicos (BP-raiz), assim como entre processos biológicos (BP-raiz) e vias de sinalização (KEGG-raiz) no sistema radicular (Figura 10). Também, mostra interação de pequenos grupos de genes (BP-raiz versus CC-raiz; CC-raiz versus KEGG-raiz; KEGG-raiz versus MF-raiz e BP-raiz versus CC-raiz versus KEGG) com as categorias biológicas (Figura 10).

A identificação de genes exclusivos (BP-raiz: 8 genes, CC-Raiz: 7 genes, KEGG-raiz: 9 genes, CC-PA: 5 genes) em cada categoria funcional pode proporcionar *insights* valiosos sobre os mecanismos específicos que são ativados ou suprimidos em resposta ao ácido húmico

(Figura 10). De maneira semelhante, Ferreira (2017) ao investigar duas variedades de arroz (Catetão e Mira), por meio da análise de diagrama de Venn, identificou genes exclusivos para cada variedade em resposta ao estresse hídrico, oferecendo um valioso *insight* sobre a resposta adaptativa ao estresse hídrico em plantas. Galambos et al. (2020) também observaram importantes grupos de genes DEG envolvidos no metabolismo de aminoglicanos e quitina após a exposição à biotividade do ácido húmico em associação com bactérias endofíticas em plantas de tomate. Estes insights foram obtidos via análise de diagrama de Venn para mapear as interações genéticas específicas.

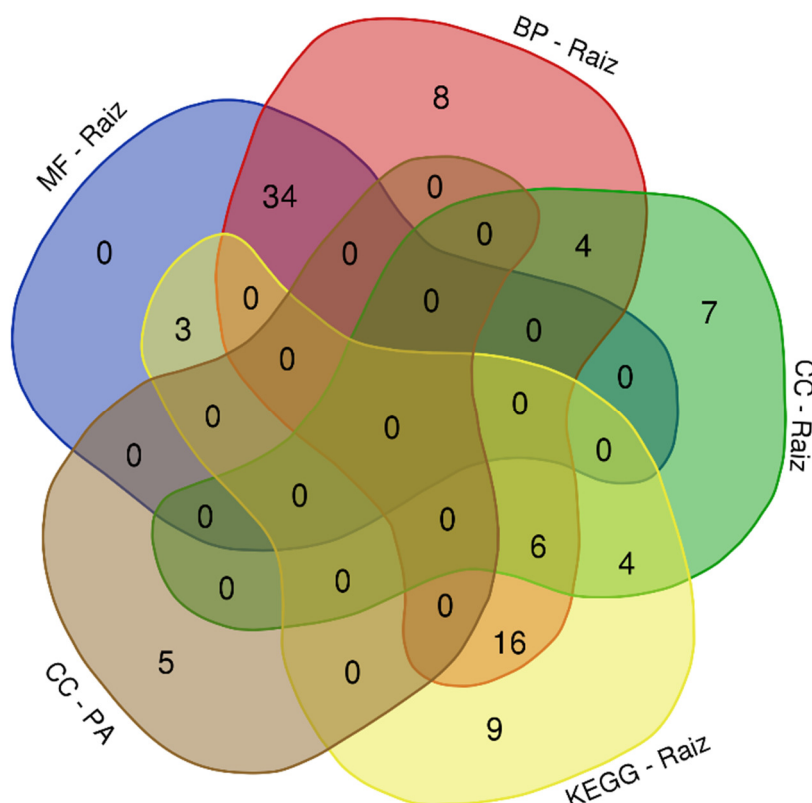


Figura 10. Análise de interação de genes diferencialmente expressos (DEG) enriquecidos em resposta ao ácido húmico em plantas de arroz via diagrama de Venn. Raiz: Função Molecular (MF-raiz): cor azul, Processos Biológicos (BP-raiz): cor vermelha, Componentes Celulares (CC-raiz): cor verde, rota metabólica (KEGG): cor amarela. Parte aérea (PA): Componentes Celulares (CC-PA): cor marrom.

4.5.4 Grupo de genes envolvidos na função molecular e no processo biológico

Os DEG (34 DEG) da interação entre a função molecular e processos biológicos das raízes apresentam regulação positiva e negativa (Figura 10, Figura 11). Os de regulação negativa estão relacionados com a atividade de transportador e transporte transmembrana (Figura 9).

Além disso, foi notado conjunto de genes envolvidos no transporte de íons (Figura 11) que são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, desempenhando papéis importantes não apenas na aquisição e transporte de íons, mas também na amplificação e regulação de processos celulares e fisiológicos, como sinalização, defesa contra-ataque de patógenos, manutenção da homeostase osmótica e adaptação ao estresse (TAN et al., 2021).

Os genes *Os08g0300300* (FC= -1,30) e *Os02g0558100* (FC= -1,97) (Figura 11) codificam transportadores de cloreto do tipo canais iônicos, que estão envolvidos em resposta a estresse, atuando na regulação da homeostase iônica e do turgor celular (HUM et al., 2018, NEDELYAEVA et al., 2020). Estudo mostra que superexpressão deste gene em plantas de arroz transformadas, aumenta o número de perfilhos e o rendimento de grão comparado com as plantas selvagens em condição de estresse hídrico (HUM et al., 2018).

Os genes *Os05g0472400* (FC= -2,22) e *Os06g0566300* (FC= -1,58) (Figura 11) codificam transportadores que atuam sinergicamente na captação de zinco e cádmio, por apresentarem propriedades químicas e físicas semelhantes, porém com efeitos fisiológicos contrastantes nas plantas (TAN et al., 2020). Tan et al. (2020) ao caracterizar dois tipos de transportadores de influxo de zinco em plantas de arroz, verificaram que o *knockout* individual ou em conjunto dos genes *OsZIP5* e *OsZIP9* reprimiu o influxo de zinco e cádmio pelas plantas. Entretanto, a superexpressão desses genes mostra a maior afinidade do gene *OsZIP9* ao cádmio em relação ao zinco, assim permitindo a compreensão sobre o acúmulo de zinco/cádmio no arroz.

O gene *Os02g0314300* (FC= -2,07) (Figura 11) é responsável em codificar proteínas da família transportadora de Cálcio e sódio, desempenhando papéis fundamentais na homeostase do cálcio nas células (SINGH et al., 2015). Estudo mostra que a submissão de plantas de arroz e *Arabidopsis* em diferentes estresses, permitiu a identificação de genes codificadores desta proteína em vários estágios de desenvolvimento, mostrando a sua importância nos processos fisiológicos destas plantas (SINGH et al., 2015).

Os genes *Os03g0150800* (FC= -2,24) e *Os10g0444700* (FC= -1,72) (Figura 11) estão envolvidos na codificação de transportadores de fosfato que regulam a captação, translocação e a remobilização nas plantas (WU et al., 2013). Ye et al. (2015) ao submeterem plantas de arroz transformadas ao estresse nutricional. Mostrou que as plantas com gene *OsPT4* superexpresso aumentaram significativamente o nível de fosfato em relação as plantas selvagens, assim contribuindo para um bom desenvolvimento das plantas em ambiente deficiente em fosfato.

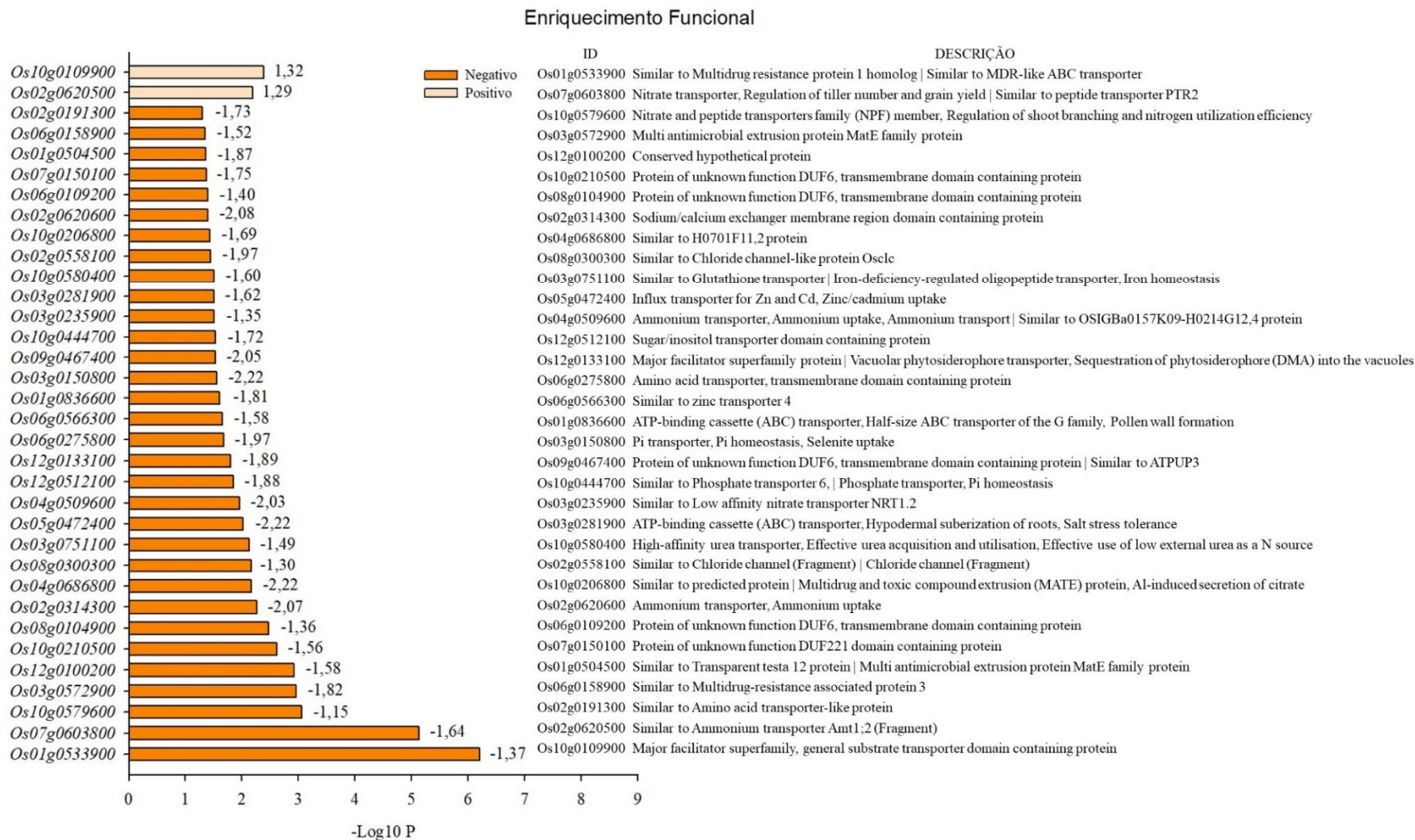


Figura 11. Enriquecimento funcional dos 34 genes diferencialmente expressos (DEG) da interação entre função molecular e processo biológico em resposta ao ácido húmico. Barra laranja: DEG negativamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$, Barra bege: DEG positivamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$. - $\text{Log}_{10} \text{P}$: Indica a significância estatística do enriquecimento. Coluna ID: Lista os genes e as respectivas descrições.

Ainda na interação da MF-raiz e BP-raiz foi observado um grupo de genes com regulação negativa associados a transportadores ABC (*Os01g0836600*, *Os03g0281900* e *Os06g0158900*) (Figura 11). São pertencentes a uma das maiores famílias de proteínas que podem subdividir em diferentes subfamílias, envolvidas em inúmeros processos celulares e transporte transmembrana de diversas moléculas no sistema radicular (CHAN et al., 2018; FU et al., 2019; WU et al., 2022). Dentre os DEG enriquecidos, o gene *Os01g0836600* (FC= -1,88) codifica transportador ABC da subfamília G que é associado ao desenvolvimento de anteras e polén, formação de cutículas em resposta a defesa ao estresse biótico e abiótico causado em plantas de arroz (WU et al., 2022).

Observou-se, também, genes que codificam proteínas de transporte da família MATE (*Os01g0504500*, *Os10g0206800* e *Os03g0572900*) (Figura 11), que são proteínas de extrusão de compostos tóxicos, dependente de um gradiente eletroquímico de cátions (íons H^+ e Na^+). Estas proteínas desempenham diversas funções fisiológicas relacionadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas, no entanto, sua compreensão em culturas de arroz ainda é bastante limitada (DU et al., 2021). De acordo com alguns estudos, o *Os10g0206800* (FC= -1,69) codifica uma proteína MATE em arroz, que induz o efluxo de citrato em resposta à toxicidade do alumínio, conferindo resistência ao alumínio, e está localizada principalmente nas células da epiderme das raízes (YOKOSHO et al., 2016; LI et al., 2017; MA et al., 2018).

Além disso, foram identificados sete genes da família DUF (*Os12g0100200*, *Os10g0210500*, *Os08g0104900*, *Os04g0686800*, *Os09g0467400*, *Os06g0109200*, *Os07g0150100*) que codificam proteínas de função desconhecidas, que estão associados as categorias MF-raiz e BP-raiz (Figura 11). A investigação desses genes pode levar a descobertas que proporcionem estratégias para melhorar a resistência ao estresse. Por exemplo, o estudo de Zhong et al. (2019) ao investigar genes da família DUF, resultou na descoberta do *OsDUF668*, que é essencial para a resistência à seca e para defesa das plantas de arroz. A elevada frequência de genes DUF diferencialmente expressos em resposta a exposição ao AH, evidencia que há muito o que se compreender sobre o mecanismo de ação dessas substâncias sobre as plantas.

Dos 34 DEG somente dois apresentaram regulação positiva (FC ≥ 1) (Figura 11), indicando uma relação da bioatividade do ácido húmico entre a função molecular e processo biológico nas raízes de arroz. O gene “*Major facilitator superfamily (MFS), general substrate transporter domain containing protein*” (*Os10g0109900*) (FC= 1,32) (Figura 11) faz parte da maior e mais diversificada superfamília de transportadores secundários, responsáveis em transportar diversos solutos por mecanismo uniporte, simporte e antiporte (NINÑO-GONZÁLEZ et al., 2019; WANG et al., 2020). Estudo de Yan et al. (2019) mostrou que o gene *OsCdl*, pertencente à MFS está envolvido na absorção de cádmio pelas raízes e contribui para acúmulo nos grãos de duas variedades de arroz. Já o gene *Amt1;2* – transportador de amônio (*Os02g0620500*) (FC= 1,29) (Figura 11) é responsável em codificar proteínas transportadoras de amônio de alta afinidade, permitindo que as plantas absorvam amônio em baixas concentrações, desempenhando um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento de plantas (KONISHI, MA, 2021).

4.5.5 Grupo de genes envolvidos no processo biológico e na rota metabólica

A partir do diagrama de Venn, foi possível identificar 16 DEG, os quais estão envolvidos tanto com processo biológico quanto em vias metabólicas - KEGG (Figura 12). Destes, 15 DEG apresentaram regulação negativa, enquanto 1 DEG apresentou regulação positiva (Figura 12). Esses genes estão associados à atividade do metabolismo de carbono, vias metabólicas, processos biossintéticos e metabólicos de pequenas moléculas em plantas de arroz. Selecionou-se 5 DEG com regulação negativa de FC $\geq -2,0$, para discussão detalhada (Figura 12).

O gene *Os10g0100700* (FC=-4,28) (Figura 12) codifica proteínas responsáveis pela biossíntese de vitamina B6 (piridoxina). A vitamina B6 é essencial para as principais reações metabólicas e funciona com um cofator essencial das reações enzimáticas de diversos processos celulares e apresentam propriedades antioxidantes (NAN et al., 2019; MANGEL et al., 2019, ZENG et al., 2022).

Os genes “Similar to predicted protein (*Os03g0337900*)” (FC= -2,17) (Figura 12) e o “Similar to Adenine phosphoribosyltransferase form 2” (*Os04g0504000*) (FC= -2,01) (Figura 12) estão associados aos “processos metabólicos de pequenas moléculas” do processo biológico. Sendo que, o gene *Os03g0337900* possivelmente codifica proteína que ainda não é conhecida ou caracterizada, mas é semelhante a outras proteínas preditas em outras espécies ou genoma. De acordo com análise de KEGG, este gene possivelmente é envolvido com o metabolismo de piruvato. Por meio, do metabolismo de piruvato é obtido o acetil-CoA que participa do Ciclo de Krebs pela fosforilação oxidativa, maximizando a produção de ATP (LOBATO, 2010; BUDZINSKI, 2012). O gene *Os04g0504000* codifica enzima envolvida na biossíntese de nucleotídeos, sendo responsável por catalisar uma reação entre adenina e 5-fosforribosil-1-pirofosfato, produzindo o monofosfato de adenosina (AMP), precursor da síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e, como subproduto, pirofosfato (PADMATHILAKE, 2014). Liu et al. (2023), ao estudarem um conjunto de pesquisas, relatam que a biossíntese de nucleotídeos e de ATP alterada inibe fortemente a síntese de RNA em plantas, devido ao fato de que o ATP é a base para biossíntese de todos os outros nucleotídeos, afetando, o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Dos genes com regulação negativa, tanto o gene “Mitochondrial citrate synthase, Aluminum tolerance (*Os02g0194100*)” (FC= -2,13) (Figura 12) e o “Cytosolic glutamine synthetase, Ammonium assimilation (*Os03g0223400*)” (FC= -2,10) (Figura 12) fazem parte do metabolismo de glioxilato e dicarboxilato. Sendo que, o gene *Os02g0194100* codifica enzimas que confere tolerância ao alumínio, por meio da síntese de citrato, ao ser liberado ao solo aquela com alumínio, evitando a sua absorção pelas raízes (NUNES-NESI et al., 2014; HUANG et al., 2017; EL-MONEIM et al., 2022). Já o gene *Os03g0223400* está relacionado a enzima glutamina sintetase (GS), que incorpora o amônio à glutamato por meio de uma reação dependente de ATP, gerando como produto a glutamina (FUNAYAMA et al., 2013; GUAN et al., 2016; KONISHI et al., 2018). Estudo mostra que o *knock-out* do Gln1;2 que codifica para uma isoforma de GS citosólica em *Arabidopsis*, aumentou o teor de amônio, mostrando sua importância na assimilação de amônio e síntese de aminoácidos (GUAN et al., 2016).

Por fim, o gene “Similar to Oxo-phytodienoic acid reductase (*Os06g0215500*)” que apresentou regulação positiva (FC= 2,12) (Figura 12), é responsável por codificar uma enzima do metabolismo do ácido jasmônico, um fitohormônio essencial à defesa de plantas contra estresse biótico e abiótico, bem como para o desenvolvimento de raízes (DEUNER et al., 2015). Os estudos de Zhang et al. (2012) e Noriega et al. (2012) abordam o papel dos jasmonatos na resposta ao estresse em plantas, destacando sua influência na tolerância ao frio e no estresse oxidativo. Zhang et al. (2012) investigaram o efeito do metil jasmonato (MeJA) em tomate-cereja, observando que os frutos tratados com MeJA apresentaram menores índices de injúrias por frio. O estudo sugere que o MeJA melhora a tolerância ao frio ao influenciar o catabolismo da arginina. Noriega et al. (2012) examinaram o impacto do ácido jasmônico (AJ) no estresse oxidativo induzido pelo cádmio em plantas de soja. Os resultados mostraram que o AJ, dependendo da concentração, pode aumentar as respostas antioxidantes, por meio do aumento de glutatona e redução dos níveis de ácido tiobarbitúrico e de H_2O_2 e O_2^- . Além disso, também observou o aumento da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase. Ambos os estudos destacam o potencial dos jasmonatos na mitigação de estresses abióticos em plantas.

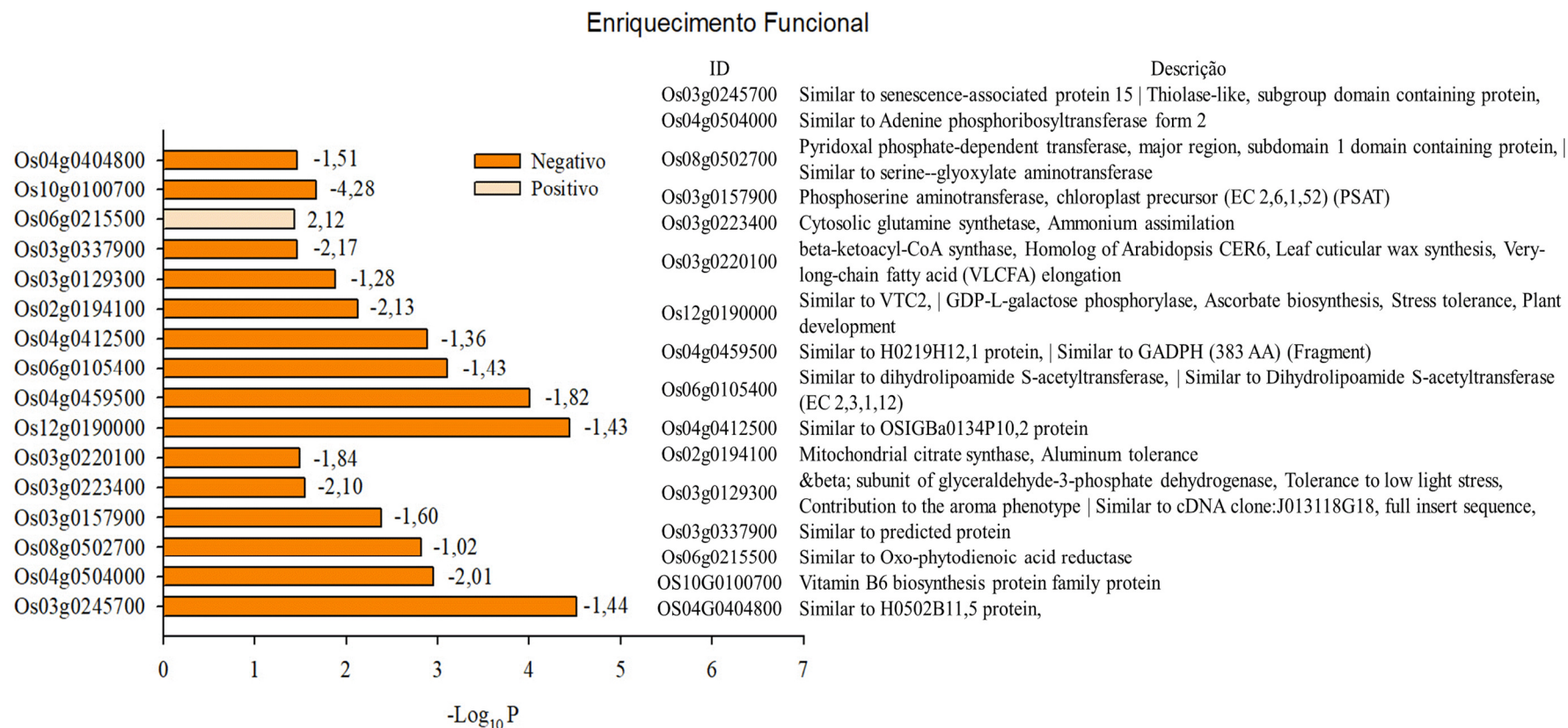


Figura 12. Enriquecimento funcional dos 16 genes diferencialmente expressos (DEG) da interação entre processo biológico e Rota Metabólica em resposta ao ácido húmico. Barra laranja: DEG enriquecidos negativamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$, Barra bege: DEG enriquecidos positivamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$. $-\text{Log}_{10} P$: Indica a significância estatística do enriquecimento. Coluna ID: Lista os genes e as respectivas descrições.

4.5.6 Pequeno grupo de genes envolvidos em duas ou mais categorias biológicas

Dos 91 DEG nas raízes de arroz, apenas uma pequena quantidade de genes com regulação negativa apresentou relação com o plastídio. O plastídio é uma organela que desempenha diversas funções importantes ao metabolismo dos vegetais pela sua capacidade biossintética (WIJK, BAGINSKY, 2011). Dentre os genes envolvidos com o plastídio, 4 DEG apresentaram relação comum com processos biológicos e componentes celulares, fazendo parte de processos biossintéticos e metabólicos de pequenas moléculas e transporte. Para discussão detalhada desse grupo de genes, foi selecionado os genes com maior regulação negativa (Tabela 10).

Tabela 10. Genes diferencialmente expressos (DEG) na raiz de arroz em resposta ao ácido húmico com relação comum entre processo biológico e componente celular em resposta ao ácido húmico. Log₂ FC $\geq$ -1: Regulação negativa. Log₂ FC $\geq$ 1: Regulação positiva. -Log₁₀ P: Indica a significância estatística do enriquecimento.

ID	Descrição	log ₂ FC	Log ₁₀ P
Os06g0596300	Similar to Acyl-ACP thioesterase (Fragment)	-1,27	7,59
Os01g0128300	Chloroplast-localized membrane protein homologous to Arabidopsis ABA4, Regulation of root growth and coleoptile elongation, Regulation of ethylen response	-2,18	3,44
Os04g0507800	UbiE/COQ5 methyltransferase family protein	-1,39	2,05
Os02g0539600	Putative metallo-β-lactamase-trihelix chimera, Chloroplast development	-1,96	2,19

Destacam-se os genes “*Chloroplast-localized membrane protein homologous to Arabidopsis ABA4, Regulation of root growth and coleoptile elongation, Regulation of ethylen response*” (Os01g0128300) (FC= -2,18) e o “*Putative metallo-β-lactamase-trihelix chimera, Chloroplast development*” (Os02g0539600) (FC= -1,96) (Tabela 10).

O gene Os01g0128300 em arroz codifica uma proteína de membrana localizada nos plastídios, desempenhando um papel importante na biossíntese do ácido abscísico (ABA), similar ao gene ABA4 em *Arabidopsis thaliana* (MA et al., 2014; YANG et al., 2015). Esta proteína é essencial para a produção de ABA, um hormônio vegetal fundamental na resposta ao estresse biótico e abiótico, regulação do alongamento de pelos radiculares e crescimento e desenvolvimento das plantas (MA et al., 2014; YANG et al., 2015; WANG et al., 2017; SEO, MARION-POLL, 2019; HUANG et al., 2021). E, o gene Os02g0539600 presente nas raízes de arroz é responsável em codificar uma proteína envolvida no desenvolvimento de plastídio do tipo cloroplasto no estágio inicial de plântulas de arroz e *Arabidopsis thaliana* (WAN et al., 2015; YANG et al., 2023).

A partir do diagrama de Venn foi possível identificar 10 DEG enriquecidos com regulação negativa, associados ao metabolismo de carbono (Os04g0650800, Os09g0535000 e Os12g0274700) e vias metabólicas (Os09g0361500, Os04g0659100, Os12g0617400, Os09g0442600, Os08g0104600, Os07g0148900 e Os07g0544800) no plastídio (Tabela 11). Onde 6 DEG apresentam relação comum com três categorias biológicas (processo biológico, componente celular e rota metabólica - KEGG) e 4 DEG com relação comum com duas categorias biológicas (componente celular e rota metabólica - KEGG). Foi selecionado os genes com maior regulação negativa para discussão detalhada.

Tabela 11. Genes diferencialmente expressos (DEG) nas raízes de arroz em resposta ao ácido húmico. 6 DEG enriquecidos apresentam relação comum entre processo biológico – componente celular – KEGG e 4 DEG componente celular – KEGG enriquecidos apresentam relação comum entre componente celular – KEGG. Log₂ FC ≥ -1: Regulação negativa. Log₂ FC ≥ 1: Regulação positiva. -Log₁₀ P: Indica a significância estatística do enriquecimento.

ID	Descrição	log ₂ FC	Log ₁₀ P
Processo Biológico - Componente Celular - KEGG			
Os04g0650800	Similar to Phosphoglycerate dehydrogenase Similar to H0212B02,14 protein	-1,67	2,39
Os09g0361500	Isochorismate synthase domain containing protein	-1,42	2,34
Os04g0659100	Similar to Isoform 2 of Glutamine synthetase, chloroplastic Glutamine synthetase shoot isozyme, chloroplast precursor (EC 6,3,1,2) (Glutamate ammonia ligase) (Clone lambda-GS31) Chloroplastic glutamine synthetase, Reassimilation of the ammonia generated by photorespiration, Salt tolerance	-1,60	2,11
Os12g0617400	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, Control of ABA biosynthesis, Regulation of salt and water stress tolerance and leaf senescence	-2,03	2,00
Os09g0535000	Similar to Triosephosphate isomerase, chloroplast precursor (EC 5,3,1,1) (TIM) (Triose-phosphate isomerase) Similar to Triosephosphate isomerase	-1,42	1,52
Os09g0442600	Similar to Plastid (P) ppGpp synthase	-1,23	2,00
Componente Celular - KEGG			
Os12g0274700	Similar to Petunia ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase small subunit mRNA (clone pSSU 51), partial cds, (Fragment)	-2,09	2,06
Os08g0104600	Ferredoxin1, Photosynthetic electron transport and carbon assimilation	-1,22	1,60
Os07g0148900	Photosystem I protein-like protein	-1,33	1,49
Os07g0544800	Similar to Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplast precursor (OEE3) (16 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II) (OEC 16 kDa subunit) (Ferredoxin-NADP reductase binding protein) (BP)	-1,36	1,40

O gene “*Similar to Phosphoglycerate dehydrogenase*” (*Os04g0650800*) (FC= -1,67) comum das três categorias biológicas, desempenha um papel específico no metabolismo dos aminoácidos, particularmente na biossíntese da serina no plastídio, um intermediário crucial que conecta o metabolismo do carbono e do nitrogênio. A enzima fosfoglicerato desidrogenase, codificada por esse gene, catalisa a conversão do 3-fosfoglicerato (3-PG) em 3-fosfopiruvato, iniciando a via de fosfoserina. Este integra a glicólise, onde é formado a glicina e depois o glicolato, contribuindo para um status redox durante um estresse (IGAMBERDIEV, KLECZKOWSKI, 2018). O gene “*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*” (*Os12g0617400*) (Log₂ FC= -2,03) codifica uma enzima limitante da taxa de biossíntese do ABA. A repressão deste gene reduziu o nível de ABA e diminuiu a tolerância a diversos estresses (salino, hídrico e escuro) (Huang et al., 2019). O gene “*Similar to Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplast precursor (OEE3)*” (*Os07g0544800*) está envolvido com a fotossíntese e geralmente é expresso em tecidos fotossintéticos (VILJOEN, 2013). No entanto, sua presença nas raízes de arroz pode estar oferecendo um novo *insight* de funções específicas nas raízes que precisa ser investigado.

Além dos genes relacionados ao plastídio foi identificado um pequeno grupo de genes (3 DEG) com regulação negativa que apresentam relação comum com a função molecular e rota metabólicas - KEGG (Tabela 12). Estes genes (*Os01g0208700*, *Os02g0244700* e *Os08g0366000*) (Tabela 12) são responsáveis em codificar a fosfoenolpiruvato carboxilase, de

uma família de enzimas com funções essenciais ao metabolismo de carbono e a assimilação do amônio. Um dos principais papéis desta enzima em tecidos não fotossintéticos é atuar como enzima anaplerótica, reabastecendo o ciclo de Krebs com esqueletos de carbonos, compensando os intermediários desviados para assimilação do amônio em plantas cultivadas em condição de estresse de amônio (SETIÉN et al., 2014; MARÍN-PEÑA et al., 2024).

Tabela 12. Genes diferencialmente expressos (DEG) na raiz de arroz em resposta ao ácido húmico com relação comum entre função molecular e KEGG em resposta ao ácido húmico. $\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$: Regulação negativa. $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$: Regulação positiva. $-\text{Log}_{10} \text{P}$: Indica a significância estatística do enriquecimento.

ID	Descrição	$\text{log}_2 \text{FC}$	$\text{Log}_{10} \text{P}$
Os01g0208700	Phosphoenolpyruvate carboxylase, Ammonium assimilation	-1,98	1,77
Os08g0366000	Phosphoenolpyruvate carboxylase Similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase Phosphoenolpyruvate carboxylase	-1,64	1,74
Os02g0244700	Phosphoenolpyruvate carboxylase, Nitrogen accumulation Similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase Similar to Phosphoenolpyruvate carboxylase 1 (EC 4,1,1,31) (PEPCase 1) (CP21)	-1,78	1,39

4.5.7 Grupo de genes exclusivos envolvidos em processo biológico, componente celular e rota metabólica

A análise de ontologia (GO) e o diagrama de Venn (Figura 10) possibilitaram a identificação de genes exclusivos associados a uma das três categorias biológicas: função molecular, processo biológico e componente celular. Além disso, o KEGG também permite a identificação de genes exclusivos envolvidos em vias metabólicas específicas (PENG et al., 2017; PEREIRA, 2021). Observou-se neste estudo 8 DEG envolvidos no processo biológico (Figura 13C) e 7 DEG no componente celular (Figura 13B). Além disso, identificou-se um grupo de genes (9 DEG) associados a rota metabólica - KEGG nas raízes de arroz (Figura 13A). Foi selecionado os genes com maior e menor regulação negativa para discussão detalhada.

Dos 8 DEG com regulação negativa em processo biológico, 5 DEG estão envolvidos no transporte (*Os06g0633100*, *Os06g0154200*, *Os01g0952000*, *Os02g0448400* e *Os06g0175500*) e 3 DEG em processo metabólicos de pequenas moléculas (*Os03g0183600*, *Os06g0133800* e *Os11g0591200*) (Figura 13). O gene *Os06g0154200* ($\text{FC} = -2,11$) codifica uma proteína essencial ao complexo SKP-Cullin-F box (SCF), com papel específico em transportar sinais de fitohormônios, como por exemplo jasmonato e estrigolactonas (WILLIAMS et al., 2019) e o gene *Os06g0133800* ($\text{FC} = -1,16$) tem função semelhante a enzima transcetolase, que é importante para o ciclo das pentoses fosfato, assim desempenhando um papel crucial no metabolismo celular (SUZUKI, MAKINO, 2016).

Todo os 7 DEG agrupados em componente celular apresentaram regulação negativa (Figura 13B). Destacando-se o gene “Similar to Heat shock protein binding protein” (*Os11g0216100*) e o “Similar to DCL protein” (*Os08g0308700*), que exibem maior ($\text{FC} = -2,25$) e menor ($\text{FC} = -1,38$) regulação negativa, respectivamente, quando plantas de arroz são tratadas com ácido húmico por um período de 4 horas. O gene *Os11g0216100* refere-se uma sequência genética semelhante ao gene codificador da proteína de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSPs). Essa proteína é produzida pela célula em resposta a diversas condições de estresse, principalmente o estresse térmico, sendo encontrada no citoplasma e em diversas organelas, o que permite o equilíbrio da homeostase celular (KIM, AN, 2013; CHAUDHARY et al., 2019). O gene *Os08g0308700* também se refere uma sequência genética semelhante ao gene responsável em codificar a proteína da família DLC (Dicer-like), que processa RNA de cadeia

dupla em pequenos fragmentos de RNA de cadeia dupla, os quais são incorporados em complexos de silenciamento de RNA para regular o nível de transcritos e/ou a tradução (KOMIYA, 2016).

Dos 9 DEG agrupados em vias metabólicas identificado pelo KEGG (Figura 13A), os genes *Os04g0101400*, *Os03g0212800*, *Os08g0545200*, *Os05g0457800*, *Os10g0530400*, *Os04g0118100*, *Os05g0280500* e *Os04g0474800* apresentaram regulação negativa, enquanto o gene *Os06g0695300* apresentou regulação positiva na presença do ácido húmico. Foram selecionados os genes com maior e menor regulação negativa para discussão detalhada.

O gene *Os04g0474800* (FC= -2,19) codifica uma enzima semelhante a β -glucosidase nas raízes de arroz. Esta enzima é responsável por catalisar a hidrólise de glicosídeos β -glucosídicos em glicose, o que pode ser importante para a degradação de reservas de carboidratos, fornecendo glicose para processos metabólicos (CAIRNS, ESEN, 2010; HORIKOSHI et al., 2022). O gene *Os08g0545200* (FC= 1,00) (Figura 14A) está relacionado a uma família de enzimas conhecida como desidrogenases alcoólicas (ADH) de ligação ao zinco. De acordo com Shen et al. (2021), plantas de trigo submetida a ambiente alagado, apresenta elevada expressão desses genes, indicando um importante envolvimento da ADH em condições de hipoxia. O gene de regulação positiva (*Os06g0695300*) (Log_2 FC= 1,00) (Figura 14A) está associado a uma enzima da família das peroxidases, que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo crucial na defesa contra estresse oxidativos nas plantas (ANJUM et al., 2016).

Em relação a parte aérea do arroz (Figura 14), foram identificados 5 DEG: *Os02g0757100*, *Os02g0696500*, *Os05g0458500*, *Os08g0189900* e *Os12g0198700*, todos associados aos componentes celulares no apoplasto. Destes, 4 DEG apresentam regulação negativa, variando de FC= -1,07 a FC= -21,1, enquanto 1 DEG apresenta regulação positiva importante (FC= 2,24). O apoplasto é um espaço intercelular localizado entre as membranas celulares, as paredes celulares e o xilema, sendo responsável por diversas funções vitais as plantas, incluindo o transporte de nutrientes e água, bem como a síntese de componentes da parede celular e outras moléculas. Além disso, é o local onde acontece a síntese de moléculas envolvidas na defesa contra estresses biótico e abióticos, uma vez que é nesse espaço que as alterações adversas são percebidas (FARVADIN et al., 2020).

Além do gene positivamente regulado pela bioatividade do ácido húmico, selecionou-se os genes com maior e menor regulação negativa para discussão detalhada. O gene “Similar to Laccase (EC 1,10,3,2)” (*Os05g0458500*) (FC= -21,1) (Figura 14) refere-se a um gene que codifica enzima semelhante às Lacases. As Lacases são amplamente distribuídas no genoma das plantas, estão associadas a resposta a estresses e a biossíntese de lignina (LIU et al., 2017). Um estudo realizado em *Arabidopsis thaliana* e arroz verificou que a superexpressão do gene *OsLAC10* codificante da Lacase, em condição de estresse com CuSO_4 resultou no aumento do acúmulo de lignina e na tolerância a níveis tóxicos de cobre em comparação as plantas controle, fornecendo *insights* sobre a biossíntese de lignina e redução da absorção de cobre (LIU et al., 2017).

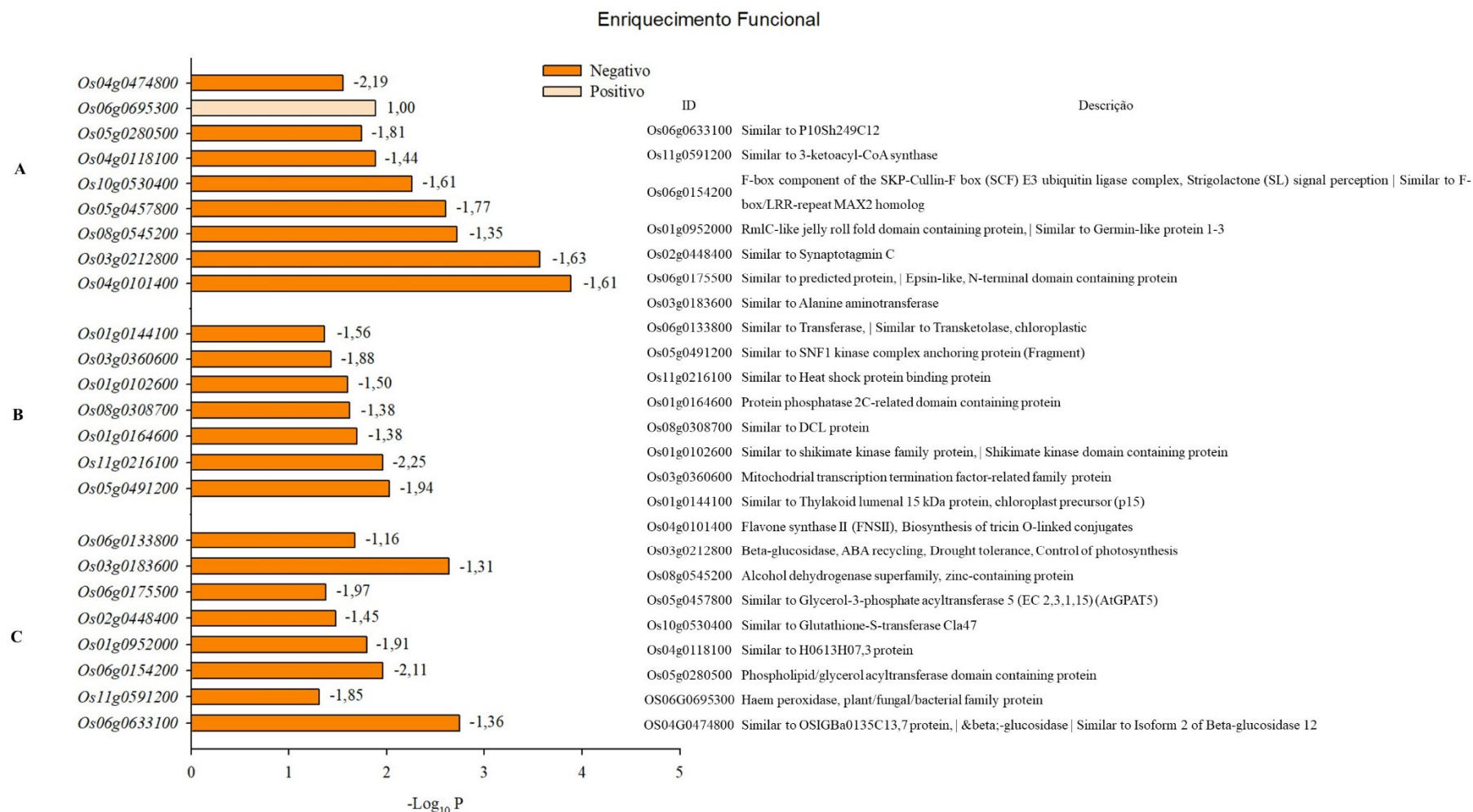


Figura 13. Enriquecimento funcional de genes diferencialmente expressos (DEG) envolvidos em rota metabólica - KEGG (A), componente celular (B) e processo biológico (C) em resposta ao ácido húmico. Barra laranja: DEG enriquecidos negativamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$, Barra bege: DEG enriquecidos positivamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$. $-\text{Log}_{10} \text{P}$: Indica a significância estatística do enriquecimento. Coluna ID: Lista os genes e as respectivas descrições.

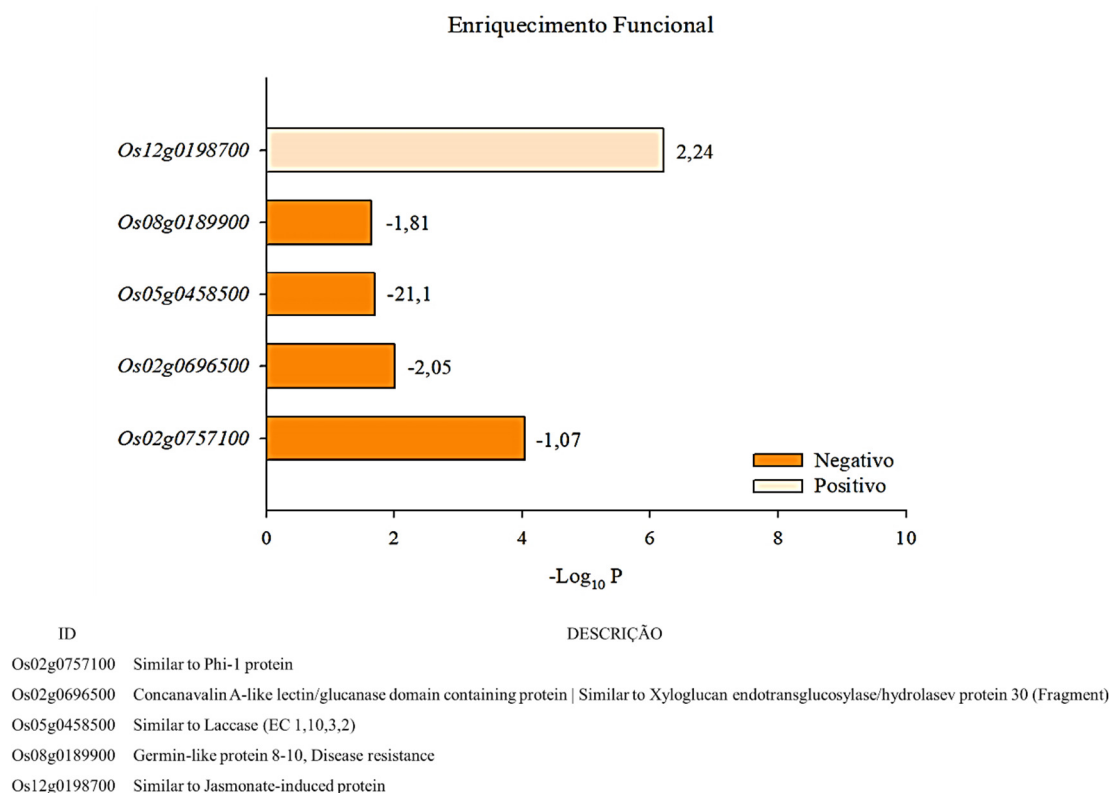


Figura 14. Enriquecimento funcional de genes diferencialmente expressos (DEG) envolvidos no componente celular da parte aérea de arroz em resposta ao ácido húmico. Barra laranja: DEG regulados negativamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$, Barra bege: DEG regulados positivamente com $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$. $-\text{Log}_{10} \text{P}$: Indica a significância estatística do enriquecimento. Coluna ID: Lista os genes e as respectivas descrições.

O gene (*Os02g0757100*) de regulação negativa de $\text{FC} = -1,07$ (Figura 14) presente na parte aérea do arroz apresenta uma sequência semelhante à do gene codificante da proteína PHI-1 (Phosphate Induced-1), que está associado a homeostase do fósforo (Pi) e à estabilidade do pH em condição de estresse abiótico (QUAN et al., 2019). Visando compreender os genes PHI-1 em diferentes condições de estresse (seca, sal, calor e frio) e fitohormônio em parte aérea e raiz de arroz, Quan et al. (2019) realizaram uma análise de microarranjo que mostrou que todos os genes responderam ao estresse, sendo regulados positivamente e negativamente na presença do benzil aminopurina e AIA, respectivamente.

Por fim, o gene *Os12g0198700* ($\text{FC} = 2,24$) (Figura 14) de regulação positiva, codifica uma proteína semelhante às proteínas induzidas pelo fitohormônio jasmonato. Essas proteínas, por serem induzidas pelo jasmonato, podem atuar na modulação das respostas a estresses bióticos e abióticos, conforme observado na literatura. Além disso, alguns estudos relatam que essa proteína aumenta a tolerância das plantas a insetos (ZHANG et al., 2012; NORIEGA et al., 2012; FAROOQ et al., 2018). Portanto, é importante realizar estudos adicionais para aprofundar o conhecimento sobre a função deste gene na parte aérea do arroz da variedade Nipponbare.

4.6 CONCLUSÃO

A análise de componentes principais (PCA) revelou que a maior parte da variação nos dados é atribuída às diferenças entre os tecidos (raiz e parte aérea) e menor ao tratamento com ácido húmico no período de exposição de 4h.

Os resultados demonstraram uma predominância de regulação negativa de genes em resposta ao ácido húmico. Portanto, o ácido húmico tende a reprimir a expressão gênica nas plantas de arroz da variedade Nipponbare dentro de um período de exposição de 4h. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que também observaram uma regulação predominantemente negativa de genes em resposta ao ácido húmico em outras espécies vegetais sob diferentes estresses.

Com análise de enriquecimento funcional, identificou-se 91 genes diferencialmente expressos associados à atividade de transporte transmembrana, atividade de fosfoenolpiruvato carboxiquinase e carboxilase, processo de biossíntese e metabólicos de pequenas moléculas, homeostase do amônio, metabolismo de carbono e vias metabólicas.

Os resultados obtidos por meio do diagrama de Venn evidenciam interações complexas entre diferentes categorias biológicas, com ênfase em respostas a diversos tipos de estresse. Esses resultados reforçam a relevância dos genes da família DUF, especialmente nas categorias de função molecular e processos biológicos em raízes, sugerindo seu possível papel na adaptação ao estresse ambiental, apesar de suas funções específicas ainda serem desconhecidas. A partir disso, estudos futuros devem focar na elucidação das funções dessas proteínas e nos mecanismos moleculares envolvidos, utilizando técnicas de edição genética, como o CRISPR-Cas9. Isso poderá fornecer informações essenciais sobre a regulação desses genes, abrindo novas possibilidades para o melhoramento genético voltado à resistência ao estresse em plantas.

5 CONCLUSÃO GERAL

O tratamento com ácido húmico resultou em alterações significativas nos parâmetros morfológicos do sistema radicular e no aumento da biomassa das plantas de arroz cultivadas em sistema hidropônico, destacando-se como um estímulo positivo para o desenvolvimento de arroz da variedade Nipponbare. A exposição do sistema radicular de arroz da variedade Nipponbare ao ácido húmico resultou em uma rápida e tardia indução de genes, possivelmente envolvidos em mecanismos de sinalização, resposta a estresse e metabolismo de carbono e nitrogênio.

A análise de enriquecimento funcional revelou que o ácido húmico resultou em regulação negativa de genes nas plantas de arroz da variedade Nipponbare, especialmente no sistema radicular. Essa resposta indica um efeito supressor do ácido húmico sobre a expressão gênica. Além disso, observou-se que a variação do efeito da bioatividade do ácido húmico estava mais associada às diferenças entre os tecidos. A análise funcional dos genes diferencialmente expressos, sugere que o ácido húmico desempenha um papel complexo na regulação transcricional de plantas de arroz, cujos DEG estão majoritariamente envolvidos com resposta a diferentes tipos de estresse.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, N. O.; MEDICI, L. O.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; TORRES-NETTO, 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, n. 2, p. 203-213, 2016.
- AGUIAR, N. O.; MEDICI, L. O.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; TORRES-NETTO, A.; SILVA, S. F.; CANELLAS, L. P. Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. **Ann Appl Biol**. v.168, p.203- 213, 2015.
- AGUIAR, N. O.; OLIVARES, F. L.; NOVOTNY, E. H.; CANELLAS, L. P. Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. **PeerJ**, v. 6, p. e5445, 2018.
- AHN, H.; KANG, Y.W.; LIM, H.M.; HWANG, I.; PAI, H. Physiological Functions of the COPI Complex in Higher Plants. **Mol Cells**. Oct 31; 38(10): 866–875, 2015.
- ALSAMADANY, H. Physiological, biochemical and molecular evaluation of mungbean genotypes for agronomical yield under drought and salinity stresses in the presence of humic acid. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 9, p. 103385, 2022.
- ALVES, L. R.; OLIVEIRA, C.; GOLDENBERG, S. Eukaryotic translation elongation factor-1 alpha is associated with a specific subset of mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. **BMC microbiology**, v. 15, p. 1-9, 2015.
- AMPONG, K.; THILAKARANTHNA, M. S.; GORIM, L. Y. Understanding the role of humic acids on crop performance and soil health. **Frontiers in Agronomy**, v. 4, p. 848621, 2022.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166-169, 2014.
- ANJUM, N. A.; SHARMA, P.; GILL, S. S.; HASANUZZAMAN, M.; KHAN, E. A.; KACHHAP, K.; MOHAMED, A. A.; THANGAVEL, P.; DEVI, G. D.; VASUDHEVAN, P.; SOFO, A.; KHAN, N. A.; MISRA, A. N.; LUKATKIN, A. S.; SINGH, H. P.; PEREIRA, E.; TUTEJA, N. Catalase and ascorbate peroxidase representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental science and pollution research*, v. 23, p. 19002-19029, 2016.
- ARAÚJO, K. V. Qualidade da matéria orgânica e atividade biológica das substâncias húmicas de solos de áreas do bioma Cerrado com diferentes níveis de preservação. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina-MG, 2019.
- ARAÚJO, O. J. L.; PINTO, M.S.; SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; SANTOS, A. M.; SOUZA, S. R. Expression of the genes OsNRT1. 1, OsNRT2. 1, OsNRT2. 2, and kinetics of nitrate uptake in genetically contrasting rice varieties. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 02, p. 306, 2015.

ARSLAN, E.; AGAR, G.; AYDIN, M. Humic acid as a biostimulant in improving drought tolerance in wheat: The expression patterns of drought-related genes. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 39, n. 3, p. 508-519, 2021.

ASLI, S.; NEUMANN, P.M. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant Soil*. v.336, p.313-322, 2010. doi: 10.1007/s11104-010- 0483-2.

AUNG, M. S.; MASUDA, H.; KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Physiological and transcriptomic analysis of responses to different levels of iron excess stress in various rice tissues. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 64, n. 3, p. 370-385, 2018.

AZEVEDO, I. G.; OLIVARES, F. L.; RAMOS, A. C.; BERTOLAZI, A. A.; CANELLAS, L. P. Humic acids and *Herbaspirillum seropedicae* change the extracellular H⁺ flux and gene expression in maize roots seedlings. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v.6, n.1, p. 1-10, 2019.

BARBOSA, D. D. Desenvolvimento vegetativo e parâmetros fisiológicos em genótipos de amendoim sob déficit hídrico e inoculados com rizóbios. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 2016.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A; WILLADINOI, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, p. 453-460, 2014.

BAR-EVEN, A. Daring metabolic designs for enhanced plant carbon fixation. **Plant Science**, v. 273, p. 71-83, 2018.

BEGUELINE, M. C. L. M. Fertilizantes com bioestimulantes no crescimento de grama esmeralda sob duas condições de déficit hídrico. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2021.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

BENTO, L. R. Similaridade estrutural de substâncias húmicas de carvão hidrotérmico obtido de vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com as das terras pretas de índio da Amazônia. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto-SP, 2019.

BHATLA, S. C. Plant growth regulators: an overview. In: BHATLA, S. C.; LAL, M. A. *Plant physiology, development and metabolism*, Springer, p. 559-568, 2018.

BHOWMICK, M. K.; SRIVASTAVA, A.K.; SINGH, S.; DHARA, M. C.; AICH, S. S.; PATRA, S. R. ISMAIL, A. M. Realizando o potencial de áreas costeiras propensas a inundações para a produção de arroz em Bengala Ocidental: perspectivas e desafios. Em: Rakshit, A., Singh, H., Singh, A., Singh, U., Fraceto, L. (eds) *Novas fronteiras no gerenciamento de estresse para agricultura durável*. **Springer**, Cingapura. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-15-1322-0_28

BORCIONI, E.; MÓGOR, A.; PINTO, F. Aplicação de ácido fúlvico em mudas influenciando o crescimento radicular e produtividade de alface americana. **Revista Ciência Agronômica**, p. 509-515, 2016.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, v. 11, n. 1, 2020.

BUDZINSKI, I. G. F. Avaliação do metabolismo primário da região cambial e casca de *Eucalytus grandis*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, 2012.

CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -glucosidase. **Cellular and molecular life science**, v. 67, p. 3389–3405, 2010.

CAMPOS, A. R. M. Influência das substâncias húmicas e diferentes disponibilidades de água no solo em soja. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina-MG, 2020.

CANELLAS, L. P.; CANELLAS, N. O.; IRINEU, L. E. S. S.; OLIVARES, F. L.; PICCOLO, A. Plant chemical priming by humic acids. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 7, p. 1-17, 2020.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, p. 1-11, 2014.
CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; JONES, D. L.; NEBBIOSOC, A.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia horticulturae**, v. 196, p. 15-27, 2015.

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

CANELLAS, N. A.; OLIVARES, F. L.; SILVA, R. M.; CANELLAS, L. P. Changes in metabolic profile of rice leaves induced by humic acids. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3261, 2022.
CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T. TAVRES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CARNEY, J. O arroz africano na história do Novo Mundo. Fronteiras: **Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 6, n. 2, p. 182-197, 2017.

CARON, V. C.; GRAÇAS, J. P.; CASTRO, P. R. C. Condicionadores do solo: ácidos húmicos e fúlvicos. **Piracicaba: ESALQ/USP**, 2015.

CASTRO, T. A. V. T. Características químicas, físicas e biológicas dos ácidos húmicos e seus efeitos em plantas. In: Voigt, C. L. Atividades de ensino e de pesquisa em química 2, v.2, 2019.

CASTRO, T. A. V. T.; BERBARA, R. L. L.; TAVARES, O. C. H.; MELLO, DÉBORA, F. G.; PEREIRA, E. G.; SOUZA, C. C. B.; ESPINOSA, L. M.; GARCÍA, A. C. Humic acids induce

a eustress state via photosynthesis and nitrogen metabolism leading to a root growth improvement in rice plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 162, p. 171-184, 2021.

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

Cha, J. Y.; Kang, S. H.; Ji, M. G.; Shin, G. I.; Jeong, S. Y.; Ahn, G.; Kim, M. G.; Jeon, J. R.; Kim, W. Y. Transcriptome changes reveal the molecular mechanisms of humic acid-induced salt stress tolerance in Arabidopsis. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 782, 2021.

CHAUDHARY, R.; BARANWAL, V. K.; KUMAR, R.; SIRCAR, D.; CHAUHAN, H. Genome-wide identification and expression analysis of Hsp70, Hsp90, and Hsp100 heat shock protein genes in barley under stress conditions and reproductive development. **Functional & integrative genomics**, v. 19, p. 1007-1022, 2019.

CHEN, SHIFU, ZHOU, Y.; CHEN, Y.; GU, J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor". **Bioinformatics**, 34 (17): i884–90, 2018.

CHIBA, Y.; KAMIKAWA, R.; NAKADA-TSUKUI, K.; SAITO-NAKANO, Y.; NOZAKI, T. Discovery of PPI-type phosphoenolpyruvate carboxykinase genes in eukaryotes and bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 39, p. 23960-23970, 2015.

CHO, J.; RYOO, N.; KO, S.; LEE, S. K.; LEE, J.; JUNG, K. H.; LEE, Y. H.; BHOO, S. H.; WINDERICKX, J.; AN, G.; HAHN, T. R.; JEON, J. S. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, v. 224, p. 598-611, 2006.

CHOUDHURY, F. K.; RIVERO, R. M.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856-867, 2017. CONAB: COMPANHIA DE SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS, Décimo Segundo Levantamento, Safra 2023/24, p. 1-116, v.11, 2024.

CONESA, A.; MADRIGAL, P.; TARAZONA, S.; GOMEZ-CABRERO, D.; CERVERA, A.; MCPHERSON, A.; SZCZEŚNIAK, M. W.; GAFFNEY, D. J.; ELO, L. L.; ZHANG, X.; MORTAZAVI, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome biology**, v. 17, p. 1-19, 2016.

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

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.

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

CRUSCIOL, C. A. C.; NASCENTE, A. S.; MAUAD, M.; LIMA, A. C. S. Desenvolvimento radicular e aéreo, nutrição e eficiência de absorção de macronutrientes e zinco por cultivares de arroz de terras altas afetadas pela adubação fosfatada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p. 2061-2076, 2013.

DELAUNOIS, B.; JEANDET, P.; CLÉMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S.; CORDELIER, S. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 249, 2014.

DESHPANDE, D.; CHHUGANI, K.; CHANG, Y.; KARLSBERG, A.; LOEFFLER, C.; ZHANG, J.; MUSZYŃSKA, A.; MUNTEANU, V.; YANG, H.; ROTMAN, J.; TAO, L.; BALLIU, B.; TSENG, E.; ESKIN, E.; ZHAO, F.; MOHAMMADI, P.; ŁABAJ, P. P.; MANGUL, S. RNA-seq data science: From raw data to effective interpretation. **Frontiers in Genetics**, v. 14, p. 997383, 2023.

DEUNER, C.; BORGES, C. T.; ALMEIDA, A. S.; MENEGHELLO, G. E.; TUNES, L. V. Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 275-281, 2015.

DIDONATO, N.; CHEN, H.; WAGGONER, D.; HATCHER, P.G., Potential origin and formation for molecular components of humic acids in soils. **Geochimica et Cosmochimica acta**, v. 178, p. 210-222, 2016.

DOBBSS, 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.

DOBBSS, L. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, M.; FAÇANHA, A. R. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.58, p.3681-3688, 2010. DOI: 10.1021/jf904385c.doi:10.1021/jf904385c.

DONG, S.; WANG, W.; JIANG, Y.; MA, Z.; YAN, C.; LIU, L.; CUI, G. Antioxidant and proteomic analysis of soybean response to drought during soybean flowering. **Ekoloji**, v. 28, n. 107, p. 2041-2052, 2019.

DU, Z.; SU, Q.; WU, Z.; HUANG, Z.; BAO, J.; LI, J.; TU, H.; ZENG, C.; FU, J.; HE, H. Genome-wide characterization of MATE gene family and expression profiles in response to abiotic stresses in rice (*Oryza sativa*). **BMC Ecology and Evolution**, v. 21, p. 1-14, 2021.

DUCAT, D. C.; SILVER, P. A. Improving carbon fixation pathways. **Current opinion in chemical biology**, v. 16, n. 3-4, p. 337-344, 2012.

EL-MONEIM, D. A.; CONTRERAS, R.; SILVA-NAVAS, J.; GALLEGOS, F. J.; FIGUEIRAS, A. M.; BENITO, C. Repression of mitochondrial citrate synthase genes by aluminum stress in roots of *Secale cereale* and *Brachypodium distachyon*. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 832981, 2022.

ELMONGY, M. S.; WANG, X.; ZHOU, H.; XIA, Y. Humic acid and auxins induced metabolic changes and differential gene expression during adventitious root development in Azalea microshoots. **HortScience**, v. 55, n. 6, p. 926-935, 2020.

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

FAGERIA, N. K. Adubação e nutrição mineral da cultura de arroz. Goiânia: **Embrapa – CNPAF**, Rio de Janeiro: Campus, p.341, 1984.

FAGUNDES, D. G. S.; CAGLIARI, A. Sequenciamento de RNA em larga escala como ferramenta para identificação e caracterização de genes em culturas de importância agrônômica. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 3, p. 271-279, 2019.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, p. 673-689, 2015.

FARNESE, F.S.; SILVA P.E. M; GUSMAN, G. S; OLIVEIRA, J.A. When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. **Front. Plant Sci.** v.7, p. 471, 2016.

FAROOQ, M. A.; ZHANG, K.; ISLAM, F.; WANG, J.; ATHAR, H. U. R.; NAWAZ, A.; ZAFAR, Z. U.; XU, J.; ZHOU, W. Physiological and itraq-based quantitative proteomics analysis of methyl jasmonate-induced tolerance in Brassica napus Under Arsenic Stress. **Proteomics**, v. 18, n. 10, p. 1700290, 2018.

FARVARDIN, A.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A. I.; LLORENS, E.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; SCALSCHI, L.; VICEDO, B. The apoplast: a key player in plant survival. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 604, 2020.

FERNANDES, M. C. N. **Enzima redutase do nitrato em linhagens de arroz de terras altas submetidas ao estresse hídrico**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 88f., 2016.

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

FERREIRA, L. M.; Oliveira, C. M.; ARRUDA, L. N.; BRAGA, R. P.; TAVARES, O. C. H.; SOUZA, S. R.; FERNADES, M. S.; SANTOS, L. A. Characteristics of the root system in two Brazilian upland rice varieties which exhibit contrasting behavior towards drought tolerance. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 2, p. 421-434, 2020.

FERREIRA, S. J.; SONNEWALD, U. The mode of sucrose degradation in potato tubers determines the fate of assimilate utilization. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 23, 2012.

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. In: MOREIRA, L.M. Ciências genômicas: fundamentos e aplicações. Ribeirão Preto, SP: **Sociedade Brasileira de Genética**, 2015. v. 1, p. 27–64.

FU, S.; LU, Y.; ZHANG, X.; YANG, G.; CHAO, D.; WANG, Z.; SHI, M.; CHEN, J.; CHAO, D. Y.; LI, R.; FENG, J. M.; XIA, J. The ABC transporter ABCG36 is required for cadmium tolerance in rice. **Journal of experimental botany**, v. 70, n. 20, p. 5909-5918, 2019.

FUNAYAMA, K.; KOJIMA, S.; TABUCHI-KOBAYASHI, M.; SAWA, Y.; NAKAYAMA, Y.; HAYAKAWA, T.; YAMAYA, T. Cytosolic glutamine synthetase1; 2 is responsible for the primary assimilation of ammonium in rice roots. **Plant and cell physiology**, v. 54, n. 6, p. 934-943, 2013.

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.

GARBER, M.; GRABHERR, M. G.; GUTTMAN, M.; TRAPNELL, C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nature methods**, v. 8, n. 6, p. 469-477, 2011.

GARCÍA, A. C. **Frações Sólidas Humificadas de Vermicomposto: seus Efeitos em Plantas e Capacidade para a Retenção de Metais Pesados**. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013.

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.

GARCÍA, A. C.; CASTRO, T. A. V. T.; BERBARA, R. L. L.; TAVARES, O. C. H.; ELIAS, S. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; PEREIRA, M. G.; ZONTA E. Revisão Sobre a Relação Estrutura-Função das Substâncias Húmicas e a sua Regulação do Metabolismo Oxidativo em Plantas. **Rev. Virtual Quim.** V.11 (3), 754-770, 2019.

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, cap. 7, p. 227-277, 2018.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; SPERANDIOA, 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.; SOUZA, L. G. A.; TAVARES, O. H.; ERNANE, E. Z.; GOMES, T. M.; GARCÍA-MINA, J. 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, 2016b.

GARCÍA, A. C.; SOUZA, L. G. A.; PEREIRA, M. G.; CASTRO, R. N.; GARCÍA-MINA, J. M.; ZONTA, E.; JUNIOR, F.; LISBOA, G.; BERBARA, RICARDO L. L. Structure-property-

function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016a.

GARCÍA, A. C.; TAVARES, O. C. H.; BALMORI, D. M.; DOS SANTOS ALMEIDA, V.; CANELLAS, L. P.; GARCÍA-MINA, J. M.; BERBARA, R. L. L. Structure-function relationship of vermicompost humic fractions for use in agriculture. **Journal of Soils and Sediments**, p.1-11, 2016c. doi: 10.1007/s11368-016-1521-3.

GEMIN, L. G.; MÓGOR, Á. F.; AMATUSSI, J. D. O.; MÓGOR, G. Microalgae associated to humic acid as a novel biostimulant improving onion growth and yield. **Scientia Horticulturae**, v. 256, p. 108560, 2019.

GILL, R. A.; AHMAR, S.; ALI, B.; SALEEM, M. H.; KHAN, M. U.; ZHOU, W.; LIU, S. The role of membrane transporters in plant growth and development, and abiotic stress tolerance. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12792, 2021.

GONÇALVES, L. O. **Análise de dados de sequenciamento de RNA voltados à comparação de expressão gênica visando a um melhor entendimento dos mecanismos de resistência aos antimoniais**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Fundação Oswaldo Cruz, 2017.

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

GUAN, M.; DE BANG, T. C.; PEDERSEN, C.; SCHJOERRING, J. K. Cytosolic glutamine synthetase Gln1; 2 is the main isozyme contributing to GS1 activity and can be up-regulated to relieve ammonium toxicity. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1921-1933, 2016.

GUIMARÃES, C.; FAGERIA, N.; FILHO, M. Como a planta de arroz se desenvolve. [S.l.], p. 12. 2002.

GUIMARÃES, G. L.; PINHEIRO, C.; CHAVES, I.; BARROS, D. R.; RICARDO, C. P. Protein dynamics in the plant extracellular space. **Proteomes**, 4, 22. 2016.

HAN, Y.; GAO, S.; MUEGGE, K.; ZHANG, W.; ZHOU, B. Advanced applications of RNA sequencing and challenges. **Bioinformatics and biology insights**, v. 9, p. BBI. S28991, 2015.

HAYES, M. H.B.; SWIFT, R. S. An appreciation of the contribution of Frank Stevenson to the advancement of studies of soil organic matter and humic substances. **Journal of Soils and Sediments**, v. 18, p. 1212-1231, 2018.

HITA, D.; FUENTES, M.; FERNANDEZ, V.; ZAMARREÑO, A. M.; OLAETXEA, M. MINA, G. M. Discriminating the short-term action of root and foliar application of humic acids on plant growth: emerging role of jasmonic acid. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 510477, 2020.

HITZEMANN, R.; BOTTOMLY, D.; DARAKJIAN, P.; WALTER, N.; IANCU, O.; SEARLES, R.; WILMOT, B.; MCWEENEY, S. Genes, behavior and next-generation RNA sequencing. **Genes, Brain and Behavior**, 12: 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1111/gbb.12007>

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

HÖLZL, G.; DÖRMANN, P. Chloroplast lipids and their biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, n. 1, p. 51-81, 2019.

HORIKOSHI, S.; SABURI, W.; YU, J.; MATSUURA, H.; CAIRNS, J. R. K.; YAO, M.; MORI, H. Substrate specificity of glycoside hydrolase family 1 β -glucosidase AtBGlu42 from *Arabidopsis thaliana* and its molecular mechanism. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 86, n. 2, p. 231-245, 2022.

HUANG, S. C.; CHU, S.J.; GUO, Y. M.; JI, Y. J.; HU, D. Q.; CHENG, J.; LU, G. H.; YANG, R. W.; TANG, C. Y.; QI, J. L.; YANG, Y. H. Novel mechanisms for organic acid-mediated aluminium tolerance in roots and leaves of two contrasting soybean genotypes. **AoB Plants**, v. 9, n. 6, p. plx064, 2017.

HUANG, Y.; JIAO, Y.; XIE, N.; GUO, Y.; ZHANG, F.; XIANG, Z.; WANG, R.; WANG, F.; GAO, Q.; TIAN, L.; LI, D.; CHEN, L.; LIANG, M. OsNCED5, a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene, regulates salt and water stress tolerance and leaf senescence in rice. **Plant science**, v. 287, p. 110188, 2019.

HUANG, Y.; ZHOU, J.; LI, Y.; QUAN, R.; WANG, J.; HUANG, R.; QIN, H. Salt stress promotes abscisic acid accumulation to affect cell proliferation and expansion of primary roots in rice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10892, 2021.

HUM, T. Y.; LEE, S.; KIM, J. K.; JANG, G.; CHOI, Y. D. CHLORIDE CHANNEL 1 promotes drought tolerance in rice, leading to increased grain yield. **Plant Biotechnology Reports**, v. 12, p. 283-293, 2018.

HUSSAIN, S.; HUANG, J.; HUANG, J.; AHMAD, S.; NANDA, S.; ANWAR, S.; SHAKOOR, A.; ZHU, C.; ZHU, L.; CAO, X.; JIN, Q. ZHANG, J. Rice production under climate change: adaptations and mitigating strategies. **Environment, climate, plant and vegetation growth**, p. 659-686, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-49732-3_26

IGAMBERDIEV, A. U.; KLECZKOWSKI, L. A. The glycerate and phosphorylated pathways of serine synthesis in plants: the branches of plant glycolysis linking carbon and nitrogen metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 318, 2018.

ILHA, G. S. Introduction to Humic Substances: Compilation of data and Fundamental Concepts. **INCBAC institute**, p. 5, 2022.

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

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

JINDO, K.; PASQUALOTO, L. C.; ALBACETE, A.; SANTOS, L. F.; ROCHA, R. L. F.; BAIA, D. C.; CANELLAS, N. O. A.; GORON, T. L.; OLIVARES, F. L. Interaction between humic substances and plant hormones for phosphorous acquisition. **Agronomy**, v. 10, n. 5, p. 640, 2020.

JINDO, K.; SOARES, S. T.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, I. G.; AGUIAR, N. O.; MAZZEIA, P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. Phosphorus speciation and high-affinity transporters are influenced by humic substances. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 179, n. 2, p. 206-214, 2016.

JOHNSON, S. R.; LANGE, B. M. Open-access metabolomics databases for natural product research: present capabilities and future potential. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 22, 2015.

JORGE, T. F.; MATA, A. T.; ANTÓNIO, C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 374, n. 2079, p. 20150370, 2016.

JÚNIOR, G. N. A.; GOMES, F. T.; SILVA, M. J.; JARDIM, A. M. F. R.; SIMÕES, V. J. L. P.; IZIDRO, J. L. P. S.; LEITE, M. L. M. V.; TEIXEIRA, V. I.; SILVA, T. G. F. Estresse hídrico em plantas forrageiras: Uma revisão. **Pubvet**, v. 13, p. 148, 2018.

KIM, S. R.; AN, G. Rice chloroplast-localized heat shock protein 70, OsHsp70CP1, is essential for chloroplast development under high-temperature conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 9, p. 854-863, 2013.

KOMIYA, R. Biogenesis of diverse plant phasiRNAs involves an miRNA-trigger and Dicer-processing. **Journal of plant research**, v. 130, p. 17-23, 2017.

KONISHI, N., SAITO, M., IMAGAWA, F., KANNO, K., YAMAYA, T., & KOJIMA, S. Cytosolic glutamine synthetase isozymes play redundant roles in ammonium assimilation under low-ammonium conditions in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 3, p. 601-613, 2018a.

KONISHI, N.; MA, J. F. Three polarly localized ammonium transporter 1 members are cooperatively responsible for ammonium uptake in rice under low ammonium condition. **New Phytologist**, v. 232, n. 4, p. 1778-1792, 2021b.

KOZULEVA, M.A; IVANOV, B.N; VETOSHKINA, D.V., Borisova-Mubarakshina, M. M. Minimizing an Electron Flow to Molecular Oxygen in Photosynthetic Electron Transfer Chain: An Evolutionary View. **Front. Plant Sci.** v.11, n. 211, 2020.

KRAVCHENKO, A.; CITERNE, S.; JÉHANNO, I.; BERSIMBAEV, R. I.; VEIT, B.; MEYER, C.; LEPRINCE, A. S. Mutations in the *Arabidopsis* Lst8 and Raptor genes encoding partners of the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 4, p. 992-997, 2015.

- LABRADA, F. P.; MENDOZA, A. B.; MALDONADO, A. J.; GAONA, S. S.; MORALES, S. G. Effects of citric acid and humic-like substances on yield, enzyme activities, and expression of genes involved in iron uptake in tomato plants. **Horticulturae**, v. 9, n. 6, p. 630, 2023.
- 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.
- LI, N.; MENG, H.; XING, H.; LIANG, L.; ZHAO, X.; LUO, K. Genome-wide analysis of MATE transporters and molecular characterization of aluminum resistance in *Populus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 20, p. 5669-5683, 2017.
- LIU, Q.; LUO, L.; WANG, X.; SHEN, Z.; ZHENG, L. Comprehensive analysis of rice laccase gene (*OsLAC*) family and ectopic expression of *OsLAC10* enhances tolerance to copper stress in *Arabidopsis*. **International Journal of Molecular sciences**, v. 18, n. 2, p. 209, 2017.
- LIU, Y.; WU, P.; LI, B.; WANG, W.; ZHU, B. Phosphoribosyltransferases and their roles in plant development and abiotic stress response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11828, 2023.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOBATO, A. K. C. **Análise de fluxos metabólicos para otimização da síntese do antibiótico cosmomicina por *Streptomyces olindensis* ICB20**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio do Norte, 2010.
- LOTFI, R.; PESSARAKLI, M.; GHARAVI-KOUCHEBAGH, P.; KHOSHVAGHTI, H. Physiological responses of *Brassica napus* to fulvic acid under water stress: Chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activity. **The Crop Journal**, v. 3, n. 5, p. 434-439, 2015.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2". *Genome biology* 15 (12): 1–21, 2014.
- LYNCH, J. P. Harnessing root architecture to address global challenges. **The Plant Journal**, v. 109, n. 2, p. 415-431, 2022.
- LYU, H.; LI, Y.; WANG, Y.; WANG, P.; SHANGI, Y.; YANG, X.; WANG, F.; YU, A. Drive soil nitrogen transformation and improve crop nitrogen absorption and utilization-a review of green manure applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1305600, 2024.
- MA, B.; YIN, C. C.; HE, S. J.; LU, X.; ZHANG, W. K.; LU, T. G.; CHEN, S. Y.; ZHANG, J. S. Ethylene-induced inhibition of root growth requires abscisic acid function in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 10, p. e1004701, 2014.
- MA, Q.; YI, R.; LI, L.; LIANG, Z.; ZENG, T.; ZHANG, Y.; HUANG, H.; ZHANG, X.; YIN, X.; CAI, Z.; UM, Y.; CHENG, Y.; ZENG, Q.; LI, X.; NIAN, H. GsMATE encoding a multidrug and toxic compound extrusion transporter enhances aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v. 18, p. 1-10, 2018.

MAEGAWA, K.; TAKII, R.; USHIMARU, T.; KOZAKI, A. Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 290, p. 2019-2030, 2015.

MALAKAR, P.; CHATTOPADHYAY, D. Adaptation of plants to salt stress: the role of the ion transporters. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 668-683, 2021.

MANGEL, N.; FUDGE, J. B.; LI, K. T.; WU, T. Y.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R.; SZUREK, B.; FITZPATRICK, T. B.; GRUISSEM, W.; VANDERSCHUREN, H. Enhancement of vitamin B6 levels in rice expressing Arabidopsis vitamin B6 biosynthesis de novo genes. **The Plant Journal**, v. 99, n. 6, p. 1047-1065, 2019.

MARÍN-PEÑA, A. J.; VEGA-MAS, I.; BUSTURIA, I.; DE LA OSA, C.; GONZÁLEZ-MORO, M. B.; MONREAL, J. A.; MARINO, D. Root phosphoenolpyruvate carboxylase activity is essential for Sorghum bicolor tolerance to ammonium nutrition. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 206, p. 108312, 2024.

MARTINS, J. D. L. **Nutrição mineral e produtividade da cultura da batata em função da aplicação de substância húmica e adubação fosfatada**. 2017. Tese (Agronomia - Agricultura) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

MELO, J. R. **Perfil metabólico e aspectos ultraestruturais de plantas de *Qualea grandiflora* Mert. (vochysiaceae) crescidas na presença e ausência de alumínio**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, 2016.

MINDARI, W.; SASONGKO, P. E.; KUSUMA, Z.; SYEKHFANI, S.; AINI, N. Efficiency of various sources and doses of humic acid on physical and chemical properties of saline soil and growth and yield of Rice. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing, 2018.

MISRA, B. B. The black-box of plant apoplast lipidomes. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 323, 2016.

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.

MORGANTE, C. V.; ARRAES, F. B. M.; MOREIRA-PINTO, C. E.; MELO, B. P.; GROSSI-DE-AS, M. F. Modulação da expressão gênica em plantas via tecnologia CRISPR/dCas9. In: MOLINARI, H. B. C.; VIEIRA, L. R.; SILVA, N. V.; PRADO, G. S.; FILHO, JOSÉ H. L. **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: Biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília: editores técnicos, p.207, 2020.

MOTA, C. S.; CANO, M. A. O. Respostas fisiológicas de plantas jovens de macaúba a condições de seca cíclica. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 87, p. 225-234, 2016.

NAN, N.; WANG, J.; SHI, Y.; QIAN, Y.; JIANG, L.; HUANG, S.; LIU, Y.; WU, Y.; LIU, B.; XU, Z. Y. Rice plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase 1 negatively regulates salt

stress response by reducing the vitamin B6 content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 1, p. 172-184, 2020.

NAOI, K.; HASHIMOTO, T. A semidominant mutation in an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase-like gene compromises cortical microtubule organization. **The Plant Cell**, v. 16, n. 7, p. 1841-1853, 2004.

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

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; SCHIAVON, M.; ERTANI, A. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 1, p. 18-23, 2016.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 7-19, 2010.

NEDELYAEVA, O. I.; SHUVALOV, A. V.; BALNOKIN, Yu V. Chloride channels and transporters of the CLC family in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 67, p. 767-784, 2020.

NETO, J. B. A. **Identificação e caracterização do gene OsPMBP1 (*Prenylated Metal Binding protein 1*) de arroz (*Oryza sativa*)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande Sul, 2009.

NIKOLETTA, G.; STEPHANE, C.; MARCO, M.; CARMELA, S.; GERARDO, P.; FELIX, W.; ANGELA, S.; ILARIA, P.; MICHELE, P. Humic acid enhances the growth of tomato promoted by endophytic bacterial strains through the activation of hormone-, growth-, and transcription-related processes. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 582267, 2020.

NIÑO-GONZÁLEZ, M.; NOVO-UZAL, E.; RICHARDSON, D. N.; BARROS, P. M.; DUQUE, P. More transporters, more substrates: the Arabidopsis major facilitator superfamily revisited. **Molecular plant**, v. 12, n. 9, p. 1182-1202, 2019.

NORIEGA, G.; CRUZ, D. S.; BATLLE, A.; TOMARO, M.; BALESTRASSE, K. Heme oxygenase is involved in the protection exerted by jasmonic acid against cadmium stress in soybean roots. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, p. 79-89, 2012.

NOZOYE, T.; VON WIRÉN, N.; SATO, Y.; HIGASHIYAMA, T.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K. Characterization of the nicotianamine exporter ENA1 in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 451590, 2019.

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**, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48509-2>. 2019.

NUNES-NESI, A.; BRITO, D. S.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; FERNIE, A. R.; ARAÚJO, W. L. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 6, p. 399-407, 2014.

OLAETXEA, M.; HITTA, 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, 2017.

OLAETXEA, M.; HITAA, D. GARCIA, A. C.; FUENTESA, M.; BAIGORRIC, R.; MORA, V.; GARNICAA, M.; URRUTIAA, O.; ERROA, J. ZAMARREÑO, A. M.; BERBARAB, R. L. GARCIA-MINAA, 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.; SPICHAL, L.; GARCÍA-MINA, J. Root ABA and H⁺-ATPase are key players in the root and shoot growth-promoting action of humic acids. **Plant Direct**, v. 3, n. 10, p. e00175, 2019.

OLIVEIRA NETO, A. A. D. **A cultura do arroz**. 1. ed. Brasília-DF: [s.n.], v. 1, 2015.

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.

OLIVEIRA, N. T. **Mecanismos de ação de um bioestimulante à base de substâncias húmicas sobre o desenvolvimento do milho**. Tese (Doutorado em Bioengenharia) – Universidade Federal de São João Del-Rei, 2020.

OONO, Y.; KAWAHARA, Y.; YAZAWA, T.; KANAMORI, H.; KURAMTA, M.; YAMAGATA, H.; HOSOKAWA, S.; MINAMI, H.; ISHIKAWA, S.; WU, J.; ANTONIO, B.; HANDA, H.; ITOH, T.; MATSUMOTO, T. Diversity in the complexity of phosphate starvation transcriptomes among rice cultivars based on RNA-Seq profiles. **Plant molecular biology**, v. 83, p. 523-537, 2013.

OTHIBENG, K.; NEPHALI, L.; RAMABULANA, A. T.; STEENKAMP, P.; PETRAS, D.; KAMG, K. B.; OPPERMAN, H.; HUYSER, J.; TUGIZIMANA, F. A metabolic choreography of maize plants treated with a humic substance-based biostimulant under normal and starved conditions. **Metabolites**, v. 11, n. 6, p. 403, 2021.

OZFIDAN-KONAKCI, C.; YILDIZTUGAYB, E.; BAHTIYARA, M.; KUCUKODUK, M. The humic acid-induced changes in the water status, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense systems of wheat leaves with cadmium stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 155, p. 66-75, 2018.

PADMATHILAKE, K. R. E. **Investigating the localization and functional significance of adenine phosphoribosyltransferase1 in Arabidopsis chloroplasts**. Thesis (Doctor of Science in Biology) - University of Waterloo, 2014.

PANDEY, P.; SRIVASTAVA, R. K.; RAJPOOT, R.; RANI, A.; PANDEY, A. K.; DUBEY, R. S. Water deficit and aluminum interactive effects on generation of reactive oxygen species and responses of antioxidative enzymes in the seedlings of two rice cultivars differing in stress tolerance. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 1516-1528, 2015.

PARTHASARATHI, T., VANITHA, K., LAKSHAMANAKUMAR, P., & KALAIYARASI, D. Arroz aeróbico - mitigando o estresse hídrico para as futuras mudanças climáticas. **International journal of Agronomy and Plant Production**. Vol., 3 (7), 241-254, 2012.

PATRO, ROB, DUGGAL, G.; LOVE, M. I.; IRIZARRY, R. A.; KINGSFORD, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression”. **Nature Methods** 14 (4): 417–19, 2017.

PENG, J.; WANG, H.; LU, J.; HUI, W.; WANG, Y.; SHANG, X. Identifying term relations cross different gene ontology categories. **BMC bioinformatics**, v. 18, p. 67-74, 2017.

PEREIRA, D. D.; SILVA, I. M.; MARTINS, W. S.; MURAISHI, C. T.; SANTOS, G. R.; DOURADO, D. P.; OLIVEIRA, A. G.; CARVALHO, L. C.; MENDES, W. D.; SOBRINHO, C. A. M. Efeito do silício na redução da severidade da brusone na cultura do arroz: uma revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. e13111637730-e13111637730, 2022.

PEREIRA, E. G.; FERREIRA, L. M.; FERNANDES, E. D. C.; LIMA, B. R. D.; SANTOS, L. A.; FERNANDES, M. S. Root morphology and ammonium uptake kinetics in two traditional rice varieties submitted to different doses of ammonium nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 18, p. 2715-2728, 2021.

PIERRET, A.; MAEGHT, J. L.; CLEMENT, C.; MONTOROI, J. P.; HARTMANN, C.; GONKHAMDEE. Understanding deep roots and their functions in ecosystems: an advocacy for more unconventional research. **Annals of botany**, v. 118, n. 4, p. 621-635, 2016.

PINHEIRO, J. P. MONTEIRO, A. S. C.; JANOTA, N.; GROENENBERGA, B. J.; HENRIQUE, ANDRÉ R. Especiação termodinâmica de metais traço com substâncias húmicas: O modelo Nica-Donnan. **Química Nova**, v. 40, p. 1191-1203, 2017.

PINOS, N. R. Q. **Influência das substâncias húmicas de três origens diferentes nos parâmetros morfológicos e bioquímicos da cultura de milho e na colonização micorrízica**. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2018.

PINTO, T. O. **Potencialidades do vermicomposto, de seu resíduo Sólido (da extração de substâncias húmicas), do Biochar e de humina para o uso na remediação de solo Contaminado com cádmio**. 2016. 61f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) -Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

PINTO, T. T. **Cultura do arroz de sequeiro no Extremo Oeste de Santa Catarina: diversidade, conhecimentos associados e riscos de erosão genética de variedades locais conservadas pela agricultura familiar.** Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

QIAN, Q.; GUO, L.; SMITH, S. M.; LI, J. Breeding high-yield superior quality hybrid super rice by rational design. **National Science Review**, v. 3, n. 3, p. 283-294, 2016.

QUAN, C.; BAI, Z.; ZHENG, S.; ZHOU, J.; YU, Q.; XU, Z.; GAO, X.; LI, L.; ZHU, J.; JIA, X.; CHEN, R. Genome-wide analysis and environmental response profiling of phosphate-induced-1 family genes in rice (*Oryza sativa*). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 627-638, 2019.

R CORE TEAM: **A language and environment for statistical computing.** 2013.

RAMOS, A. C.; DOBBSS, L. B.; SANTOS, L. A.; FERNANDES, M. S.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; CANELLAS, L. P. 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**, 2015.

RATHOR, P.; UPADHYAY, P.; ULLAH, A.; GORIM, L. Y.; THILAKARATHNA, M. S. Humic acid improves wheat growth by modulating auxin and cytokinin biosynthesis pathways. **AoB Plants**, v. 16, n. 2, p. pla018, 2024.

RATMINI, N. P. S.; IRSAN, F. Mitigação da mudança climática por meio do uso de variedades superiores para aumentar a produção de arroz em terras pantanosas de maré. Em: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 012019, 2021.

REIMAND, J.; KULL, M.; PETERSON, H.; HANSEN, J.; VILO, J. g:Profiler — um conjunto de ferramentas baseado na web para criação de perfis funcionais de listas de genes de experimentos em larga escala. **Nucleic Acids Research 35 Web Server issue**, doi.org/10.1093/nar/gkm226, 2007.

RISSO, D.; SCHWARTZ, K.; SHERLOCK, G.; DUDOIT, S. GC-content normalization for RNA-Seq data. **BMC bioinformatics**, v. 12, p. 1-17, 2011.

ROCHA, L. D. **Efeitos dos ácidos húmicos extraídos de lodo de Esgoto em *Zea mays* L. Sob restrição hídrica e Estresse salino.** Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2018.

ROOMI, S.; MAIS, 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. 408091, 2018.

RUWER, P. H. Efeito de substâncias húmicas na produtividade da soja. **Dissertação** (Mestrado em Desenvolvimento Rural) - Universidade de Cruz Alta – UNICRUZ, Cruz Alta-RS, 2019.

RYU, H.; CHO, Y. Plant hormones in salt stress tolerance. **Journal of Plant Biology**, v. 58, p. 147-155, 2015.

SAHA, R.; SAIEED, M. A. U.; CHOWDHURY, M. A. K. Growth and yield of rice (*Oryza sativa*) as influenced by humic acid and poultry manure. **Universal Journal of Plant Science**, v. 1, n. 3, p. 78-84, 2013.

SÁNCHEZ, R.; CEJUDO, F. J. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phospho enol pyruvate carboxylase from Arabidopsis and rice. **Plant physiology**, v. 132, n. 2, p. 949-957, 2003.

SÁNCHEZ-SIMARRO, J.; BERNAT-SILVESTRE, C.; GIMENO-FERRER, F.; SELVI-MARTÍNEZ, P.; MONTERO-PAU, J.; ANIENTO, F.; MARCOTE, M. J. Loss of Arabidopsis β -COP function affects Golgi structure, plant growth and tolerance to salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 523184, 2020.

SANTOS, F. F. **Validação de genes candidatos de arroz de terras altas (*Oryza Sativa* L.) para tolerância à seca**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Goiás, 2017.

SANTOS, O. I.; TAVARES, M. Eficiência técnica, alocativa e de custos na produção de arroz no Brasil. **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, n. outubro, 2018.

SARAIVA, K. D. C. **Caracterização, análise filogenética e perfil de expressão da família multigênica do fator de alongação 1 alfa (EF1a) de soja [*Glycine max* (L.) MERR]: detecção de genes normalizadores para qPCR**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2013.

SATO, L. K. I.; REIS, J. G. M. A evolução das importações de arroz no Brasil e seus efeitos sobre o Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 15, n. 2, p. 295-308, 2022.

SEO, M.; MARION-POLL, A. Absciscic acid metabolism and transport. In: Advances in botanical research. **Academic Press**, p. 1-49, 2019.

SETIÉN, I.; VEGA-MAS, I.; CELESTINO, N.; CALLEJA-CERVANTES, M. E.; GONZÁLEZ-MURUA, C.; ESTAVILLO, J. M.; GONZÁLEZ-MORO, M. B. Root phosphoenolpyruvate carboxylase and NAD-malic enzymes activity increase the ammonium-assimilating capacity in tomato. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 5, p. 49-63, 2014.

SHAH, Z. H.; REHMAN, H. M.; AKHTAR, T.; ALSAMADANY, H.; HAMOOH, B. T.; MUJTABA, T.; DAUR, I.; ZAHRANI, Y. A.; ALZAHRANI, H. A. S.; ALI, S.; YANG, S. H.; CHUNG, G. Humic substances: Determining potential molecular regulatory processes in plants. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 263, 2018.

SHEN, J.; GUO, M. J.; WANG, Y.; YUAN, X.; WEN, Y.; SONG, X.; DONG, S.; GUO, P. Humic acid improves the physiological and photosynthetic characteristics of millet seedlings under drought stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 15, n. 8, p. 1774212, 2020.

SHENG, Q.; VICKERS, K.; ZHAO, S.; WANG, J.; SAMUELS, D. C.; KOUES, O.; SHYR, Y.; GUO, Y. Multi-perspective quality control of Illumina RNA sequencing data analysis. **Briefings in functional genomics**, v. 16, n. 4, p. 194-204, 2017.

SHRESTHA, J.; KANDEL, M.; SUBEDI, S.; SHAH, K. K. Role of nutrients in rice (*Oryza sativa* L.): A review. **Agrica**, v. 9, n. 1, p. 53-62, 2020.

SILVA, A. O.; BASSOI, L. H.; SILVA, D. J. Nitrate and potassium movement in a sandy loam soil cultivated with fertigated grapevine (*Vitis vinifera* L.) in the Brazilian semiarid. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 5, p. 1-14, 2017.

SILVA, G. T. **Emissões de gases de efeito estufa de cultivares de arroz sob irrigação por inundação contínua e intermitente**. Dissertação (Mestrado em Manejo e Conservação do Solo e da Água) – Universidade Federal de Pelotas, 2020.

SILVA, H. A. **Caracterização sazonal das substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazona, Manaus-AM, 2015.

SILVA, H. F. O. **Influência da substância húmica em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) inoculadas por fungos micorrízicos arbusculares sob estresse salino**. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2020.

SILVA, J. C.; DOMINGUES, D.; LOPES, F. M. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. **PloS one**, v. 12, n. 12, p. e0190152, 2017.

SILVA, J. J. B. **Análise da variação diurna de carboidratos e metabólitos de cana-de-energia e cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, 2021.

SILVA, M. S. R. A. **Efeito da aplicação de ácido húmico sobre o crescimento de soja e sobre o microbioma edofítico em condições de restrição hídrica**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual de São Paulo, 2022.

SILVEIRA, R. D.; ABREU, F. R. M.; MAMIDI, S.; MCCLEAN, P. E.; VIAMELLO, R. P.; LANNA, A. C.; CERNEIRO, N. P.; BRONDANI, C. Expression of drought tolerance genes in tropical upland rice cultivars (*Oryza sativa*). **Genetics and Molecular Research** 14 (3): 8181-8200 2015.

SINGH, A. K.; KUMAR, R.; TRIPATHI, A. K.; GUPTA, B. K.; PAREEK, A.; SINGLA-PAREEK, S. L. Genome-wide investigation and expression analysis of Sodium/Calcium exchanger gene family in rice and Arabidopsis. **Rice**, v. 8, p. 1-16, 2015.

SINGH, A.; KUMAR, P.; GAUTAM, V.; RENGASAMY, B.; ADHIKARI, B.; UDAYAKUMAR, M.; SARKAR, A. K. Root transcriptome of two contrasting indica rice cultivars uncovers regulators of root development and physiological responses. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 39266, 2016.

SOARES, A. A. **Cultura do Arroz**. In: Textos Acadêmicos. 2. ed. Lavras. UFLA. p.130. 2005.

SOARES, J. D. R.; REZENDE, R. A. L. S.; REZENDE, R. M.; BOTREL, E. P.; Carvalho, A. M. Compostagem de resíduos agrícolas: uma fonte de substâncias húmicas. **Scientia Agraria Paranaensis**, p. 41-421, 2017.

SONESON, C.; LOVE, M. I.; ROBINSON, M. D. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences, *F1000Research* 4, 2015.

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, 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**. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2018.

SOUZA, A. F. F. **Vias de sinalização envolvidas no estímulo do crescimento radicular em plantas de arroz ativadas por ácidos húmicos**. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2023.

SOUZA, B. R. **Crescimento inicial de *Calophyllum brasiliense* CAMBESS (Guanadi) tratado com substância húmicas e bactérias potencialmente promotoras do crescimento vegetal**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de Brasília, 2019.

SOUZA, C. C. B.; BREDA, F. A. F.; LIMA, E. S. A.; GARCÍA, A. C.; SOBRINHO, N. M. B. A. **Substâncias Húmicas no Processo de Compostagem**. Seropédica: Ed. EDUR-UFRRJ, 2022.

SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; TAVARES, O. C. H.; FERNANDES, M. S.; SILVA, H. F. O.; LIMA, M. F.; SOUZA, S. R. Reduced Plasma Membrane H⁺-ATPase Isoform OsA7 Expression and Proton Pump Activity Decrease Growth Without Affecting Nitrogen Accumulation in Rice. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, 2021.

SUZUKI, Y.; KONDO, E.; MAKINO, A. Effects of co-overexpression of the genes of Rubisco and transketolase on photosynthesis in rice. **Photosynthesis Research**, v. 131, p. 281-289, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. [Tradução: Armando Molina Divan Junior+]; revisão técnica: Paulo Luiz de Oliveira. - 5. ed. - Dados eletrônicos. - Porto Alegre: Artmed, 2013.

TAN, L.; QU, M.; ZHU, Y.; PENG, C.; WANG, J.; GAO, D.; CHEN, C. ZINC TRANSPORTER5 and ZINC TRANSPORTER9 function synergistically in zinc/cadmium uptake. **Plant Physiology**, v. 183, n. 3, p. 1235-1249, 2020.

TANG, Y.; CHEN, K.; GUO, Y.; LIU, Z.; YANG, H. Investigating the mechanism of auxin-mediated fulvic acid-regulated root growth in *Oryza sativa* through physiological and transcriptomic analyses. **Research Square**, p.1-25, 2023.

TAVARES, O. C. H. **Efeito dos ácidos húmicos as H^+ -ATPase transportadores de $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$ e sobre o crescimento em arroz.** Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014.

TAVARES, O. C. H.; SANTOS, L. A.; FILHO, D. F.; FERREIRA, L. M.; GARCÍA, A. C.; CASTRO, T. A. V. T.; ZONTA, E.; PEREIRA, M. G.; FERNANDES, M. S. Response surface modeling of humic acid stimulation of the rice (*Oryza sativa* L.) root system, **Archives of Agronomy and Soil Science**, 2020.

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.

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, 2016.

TAVARES, O. C. H.; SANTOS, L. A.; FILHO, D. F.; FERREIRA, L. M.; GARCÍA, A. C.; CASTRO, T. A. V. T.; ZONTA, E.; PEREIRA, M. G.; FERNANDES, M. S. Response surface modeling of humic acid stimulation of the rice (*Oryza sativa* L.) root system, **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 67, n. 8, p. 1046-1059, 2021.

TOWN, R. M.; VAN LEEUWEN, H. P. Metal ion–humic acid nanoparticle interactions: role of both complexation and condensation mechanisms. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 27, p. 18024-18032, 2016.

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.

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, n. 4, p. 604-614, 2010.

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.

VAN BEL, M.; FRANCESCA, S.; ERIC, M. W.; LUKASZ, K.; ALEXANDER, B.; FREDERIK, C.; KLAAS, V. PLAZA 5.0: extending the scope and power of comparative and functional genomics in plants. **Nucleic acids research** 50 (D1): D1468– 74, 2022.

VIKRAM, N.; SAGAR, A.; GANGWAR, C.; HUSAIN, R.; KEWAT, R. N. Properties of humic acid substances and their effect in soil quality and plant health. In: MAKAN, A. **Humus and Humic Substances - Recent Advances**. Abdelmalek Essaâdi University, Morocco. 2022.

VILJOEN, R. **Proteomic analysis and physiological response of wheat treated with a triglyceride purified from *Lupinus albus* L. seed**. 2013. Tese (Philosophiae Doctor) - University of the Free State, 2013.

WEBER, JERZY; JAMROZ, E; KOCOWICZ, A.; DEBICKA, M.; BEKIER, J.; ĆWIELĄG-PIASECKA, I.; UKALSKA-JARUGA, A.; MIELNIK, L.; BEJGER, R.; JERZYKIEWICZ, M. Método de isolamento otimizado da fração de humina de material mineral do solo. **Environmental Geochemistry and Health**, p. 1-10, 2022.

WAN, C.; LI, C.; MA, X.; WANG, Y.; SUN, C.; HUANG, R.; ZHONG, P.; GAO, Z.; CHEN, D.; XU, Z.; ZHU, J.; GAO, X.; WANG, P.; DENG, X. GRY79 encoding a putative metallo- β -lactamase-trihelix chimera is involved in chloroplast development at early seedling stage of rice. **Plant cell reports**, v. 34, p. 1353-1363, 2015.

WANDERLEY, A. D. P. **Extração e caracterização de substâncias húmicas aquáticas do complexo estuarino lagunar mundaú – manguaba e interação com íons Hg (II)**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, 2018.

WANG, S. C.; DAVEJAN, P.; HENDARGO, K. J.; JAVADI-RAZAZ, I.; CHOU, A.; YEE, D. C.; GHAZI, F.; JING, K.; LAM, K.; CONN, A. M.; MADRIGAL, A.; MEDRANO-SOTO, A.; SAIER JR, M. H. Expansion of the Major Facilitator Superfamily (MFS) to include novel transporters as well as transmembrane-acting enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1862, n. 9, p. 183277, 2020.

WANG, T.; LI, C.; WU, Z.; JIA, Y.; WANG, H.; SUN, S.; MAO, C.; WANG, X. Absciscic acid regulates auxin homeostasis in rice root tips to promote root hair elongation. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1121, 2017.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WASSMANN, R.; JAGADISH, S. V. K.; HEUER, S.; ISMAIL, A.; REDONA, E.; SERRAJ, R.; SINGH, R. K.; HOWELL, G.; PATHAK, H. SUMFLETH, K. Mudanças climáticas afetando a produção de arroz: a base fisiológica e agronômica para possíveis estratégias de adaptação. **Advances in agronomy**, v. 101, p. 59-122, 2009.

WIJK, K. J. V; BAGINSKY, S. Plastid proteomics in higher plants: current state and future goals. **Plant physiology**, v. 155, n. 4, p. 1578-1588, 2011.

WILLIAMS, C.; FERNÁNDEZ-CALVO, P.; COLINAS, M.; PAUWELS, L.; GOOSSENS, A. asmonate and auxin perception: how plants keep F-boxes in check. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 13, p. 3401-3414, 2019.

WU, P.; SHOU, H.; XU, G.; LIAN, X. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. **Current opinion in plant biology**, v. 16, n. 2, p. 205-212, 2013.

WU, S.; FANG, C.; LI, Z.; WANG, Y.; PAN, S.; WU, Y.; AN, X.; LONG, Y.; WAN, X. ATP-Binding Cassette G Transporters and their multiple roles especially for male fertility in Arabidopsis, Rice and Maize. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9304, 2022.

WU, T. D.; NACU, S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. **Bioinformatics**, v. 26, n. 7, p. 873-881, 2010.

XIA, L.; CAO, W. Physiological and metabolic enzymes activity changes in transgenic rice plants with increased phosphoenolpyruvate carboxylase activity during the flowering stage. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 1503-1512, 2013.

XING, L.; GUO, M.; LIU, X.; WANG, C. Identification and prioritization of differentially expressed genes for time-series gene expression data. **Frontiers of Computer Science**, v. 12, p. 813-823, 2018.

YAN, H.; XU, W.; XIE, J.; GAO, Y.; WU, L.; SUN, L.; FENG, L.; CHEN, X.; ZHANG, T.; DAI, C.; LI, T.; LIN, X.; ZHANG, Z.; WANG, X.; LI, F.; ZHU, X.; LI, J.; LI, Z.; CHEN, C.; MA, M.; ZHANG, H.; HE, Z. Variation of a major facilitator superfamily gene contributes to differential cadmium accumulation between rice subspecies. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 2562, 2019.

YANG, C.; LU, X.; MA, B.; CHEN, S. Y.; ZHANG, J. S. Ethylene signaling in rice and Arabidopsis: conserved and diverged aspects. **Molecular plant**, v. 8, n. 4, p. 495-505, 2015.

YANG, F.; YUAN, Y.; LIU, Q.; ZHANG, X.; GAI, S.; JIN, Y.; CHENG, K. Artificial humic acid promotes growth of maize seedling under alkali conditions. **Environmental Pollution**, v. 327, p. 121588, 2023.

YANG, J.; TANG, Z.; YANG, W.; HUANG, Q.; WANG, Y.; HUANG, M.; WEI, H.; LIU, G.; LIAN, B.; CHEN, Y.; ZHANG, J. Genome-wide characterization and identification of Trihelix transcription factors and expression profiling in response to abiotic stresses in Chinese Willow (*Salix matsudana* Koidz). **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1125519, 2023.

YE, Y.; YUAN, J.; CHANG, X.; YANG, M.; ZHANG, L.; LU, K.; LIAN, X. The phosphate transporter gene *OsPht1; 4* is involved in phosphate homeostasis in rice. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126186, 2015.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; FUJII-KASHINO, M.; MA, J. F Functional analysis of a MATE gene *OsFRDL2* revealed its involvement in Al-induced secretion of citrate, but a lower contribution to Al tolerance in rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 5, p. 976-985, 2016.

YOOSEFIAN, M.; MOLA, A. Solvent effects on binding energy, stability order and hydrogen bonding of guanine–cytosine base pair. **Journal of Molecular Liquids**, v. 209, p. 526-530, 2015.

ZANDONADI, D. B.; SANTOS, M. P.; DOBBS, L. B.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P.; BINZEL, M. L.; 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.

ZENG, D.; CUI, J.; YIN, Y.; XIONG, Y.; YU, W.; ZHAO, H.; GUAN, S.; CHENG, D.; SUN, Y.; LU, W. The memory of rice response to spaceflight stress: From the perspective of metabolomics and proteomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3390, 2022.

ZENKER, S. G. **Caracterização de genes Whirly em acessos selvagens do gênero Oryza e resposta a salinidade e baixas temperaturas em arroz cultivado**. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento) – Universidade Federal de Pelotas, 2021.

ZHANG, W.; LI, J.; LI, H.; ZHANG, D.; ZHU, B.; YUAN, H.; GAO, T. Transcriptomic analysis of humic acid in relieving the inhibitory effect of high nitrogen on soybean nodulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1196939, 2023.

ZHANG, X.; SHENG, J.; LI, F.; MENG, D.; SHEN, L. Methyl jasmonate alters arginine catabolism and improves postharvest chilling tolerance in cherry tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 64, n. 1, p. 160-167, 2012.

ZHENYI, C.; MINGNA, J.; WEI, Y.; HUI, C.; SHIJUN, Q.; SHAN, F.; JIXING, X.; YUCHEN, L.; ZHUFENG, C.; JIANXIN, W.; XIAOYAN, T. The ATP-binding cassette (ABC) transporter OsABCG3 is essential for pollen development in rice. **Rice**, v. 11, p. 1-15, 2018.

ZHONG, H.; ZHANG, H.; GUO, R.; WANG, Q.; HUANG, X.; LIAO, J.; LI, Y.; HUANG, Y.; WANG, Z. Characterization and functional divergence of a novel DUF668 gene family in rice based on comprehensive expression patterns. **Genes**, v. 10, n. 12, p. 980, 2019.

ZHOU, Y.; BAI, L.; SONG, C. P. Ammonium homeostasis and signaling in plant cells. **Science Bulletin**, v. 60, n. 8, p. 741-747, 2015.

7. APÊNDICE

Tabela 13. Relação de genes estudados e seus respectivos detalhes.

Gene	ID	Codifica	Função
Canal de cálcio putativo de dois poros	OsTPC1	Proteína	Transporte de cálcio
Proteína quinase 7 dependente de cálcio	OsCPK7	Proteína	Transdução de sinal celular via ativação de cálcio
Transportador de nitrato	OsNRT2.1	Proteína	Transporte de nitrato (alta afinidade)
Transportador de nitrato	OsNRT1.1	Proteína	Transporte de nitrato (baixa afinidade)
Proteína responsiva a auxina	AIA11	Proteína	Codifica transportadores de auxina
Subunidade de coatômero delta-1	COPD1	Proteína	Responsável pelo transporte de proteínas do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi
Fator de alongação 1 alfa	EF1a	Proteína	Auxilia na ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo durante a fase de alongamento da cadeia polipeptídica da proteína
Proteína 9 semelhante a TOM1	TOM1	Proteína	Transporte de quelante natural de Fe (o ácido 2-desoximugínico (DMA))
Transporte de proteína Sec1b	SEC1B	Proteína	Regulação do tráfego de vesículas e desempenha um papel na citocinese e na morfogênese dos pelos radiculares
Serina / treonina - proteína quinase semelhante a TOR	TOR	Proteína	Regulação do crescimento celular desde o embrião até a produção da semente
Proteína fosfatase PHS1	PHS1	Proteína	Atua no crescimento da planta via a organização do citoesqueleto e via modulação e estabilidade dos microtúbulos
Membrana plasmática ATPase	OsA7	Enzima	Manutenção de equilíbrio iônico, regulação de pH celular, controle de osmolaridade e geração de potenciais elétricos
Hexoquinase-5	HXK5	Enzima	Fonte energia e componentes estruturais para o crescimento e desenvolvimento de plantas
Superóxido dismutase [Cu-Zn] semelhante a 1	CuZnSOD1	Enzima	Resposta antiestresse / homeostase redox de espécies reativas de oxigênio
Glutamina sintetase isozima citosólica 1-2	GS3	Enzima	Resposta antiestresse / homeostase redox de espécies reativas de oxigênio
Peroxidase 2	PRX11	Enzima	Resposta antiestresse / homeostase redox de espécies reativas de oxigênio
Glutathione peroxidase	GPX	Enzima	Resposta antiestresse / homeostase redox de espécies reativas de oxigênio
2-Cis peroxirredoxina BAS1	BAS1	Enzima	Resposta antiestresse / homeostase redox de espécies reativas de oxigênio