

**ESTRESSE DE ÁCIDO FRACO INDUZIDO POR ÁCIDOS HÚMICOS
EM PLÂNTULAS DE MILHO**

DAIANE CARVALHO BAÍA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2020**

ESTRESSE DE ÁCIDO FRACO INDUZIDO POR ÁCIDOS HÚMICOS
EM PLÂNTULAS DE MILHO

DAIANE CARVALHO BAÍA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

B152

Baía, Daiane Carvalho.

Estresse de ácido fraco induzido por ácidos húmicos em plântulas de milho / Daiane Carvalho Baía. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

67 f. : il.

Bibliografia: 41 - 53.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.
Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas.

1. Substâncias húmicas. 2. Estresses abióticos. 3. Bioatividade. 4. RT qPCR. 5. pH do citoplasma. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

**ESTRESSE DE ÁCIDO FRACO INDUZIDO POR ÁCIDOS HÚMICOS
EM PLÂNTULAS DE MILHO**

DAIANE CARVALHO BAÍA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal”.

Aprovada em 20 de março de 2020.

Comissão Examinadora:



Prof. Daniel Basílio Zandonadi (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) - UFRJ



Prof. Fábio Lopes Olivares (Ph.D., Ciência do Solo) - UENF



Pesquisadora Natália de Oliveira Aguiar Canellas (D.Sc., Produção Vegetal) -
UENF



Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D., Ciência do Solo) - UENF
(Orientador)

Ao meu paizinho João, e à minha mãezinha Magda,
Aos irmãos Jornan, Jeane, João, Washington e Tiago,
Aos sobrinhos Renato, Gustavo, Luciano, Bernardo, Laura e Miguel,
Aos cunhados Adalberto, Naiany, Ingrid e Ester.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pelo ensino de excelência;

Ao Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura – Nudiba;

A FAPERJ/ UENF pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Professor Luciano Pasqualoto Canellas, pela orientação, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo compartilhamento de suas experiências (gratidão e admiração imensuráveis);

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, ao coordenador Almy Junior Cordeiro de Carvalho e secretaria;

À minha mãe por todo esforço realizado para que seus filhos estudassem, por cada título adquirido agradeço;

A meu pai, irmãos e cunhados pelo apoio, confiança e incentivo;

Aos meus sobrinhos que doam e aceitam tão naturalmente o amor de uma tia ausente como se não houvesse distância;

Às amigas de longa data Aline Souza, Manuela Santos e Raíza Dutra por tudo e por tanto apoio;

Às amigas que a UENF me deu, que tornaram minha chegada e adaptação mais leve e prazerosa, em especial a Luana Pereira e Kíssila Soares;

Aos colegas de trabalho do NUDIBA e LBCT;

Aos pesquisadores Antônio Jesus Dorighetto Cogo, Cleiton de Paula Soares e Leticia Oliveira da Rocha pela colaboração e ensinamentos em etapas importantes desse trabalho;

Ao NUPEM-UFRJ, em especial ao professor Daniel Basílio Zandonadi pela acolhida em seu laboratório e prontidão em auxiliar;

A todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. HIPÓTESE E OBJETIVO	11
3.1. Objetivos específicos	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Extração e caracterização dos ácidos húmicos	13
4.2. Ensaio com plantas	14
4.2.1. Determinação da curva de dose-resposta	14
4.2.2. Avaliação da variação do pH intracelular	15
4.2.3. Expressão Diferencial de Genes	16
4.2.3.1. Desenho de Primers	16
4.2.3.2. Extração de RNA	18
4.2.3.3. Síntese de cDNA	19
4.2.3.4. PCR em tempo real (RT-qPCR)	19
5. RESULTADOS	21
5.1. Caracterização dos ácidos húmicos	21
5.2. Ensaio com plantas	23

5.2.1. Crescimento radicular	24
5.2.2. Variação do pH do meio de crescimento das plântulas	26
5.2.3. Avaliação da acidificação do citoplasma	28
5.2.4. Avaliação da expressão diferencial da SnRK2.2, malato desidrogenase e Fatores de transcrição WRKY	30
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
APÊNDICE	54

RESUMO

CARVALHO, Daiane Baía, Ma.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Março de 2020. ESTRESSE DE ÁCIDO FRACO INDUZIDO POR ÁCIDOS HÚMICOS EM PLÂNTULAS DE MILHO. Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas.

A agricultura industrial é caracterizada pelo consumo de insumos, tornando as lavouras mais suscetíveis aos estresses abióticos. O uso de bioestimulantes na agricultura vem se destacando como uma alternativa para a proteção das culturas. Os ácidos húmicos podem pré-condicionar as plantas melhorando sua resposta adaptativa quando submetidas a diferentes tipos de estresses abióticos, incluindo salinidade, seca e toxicidade de metais pesados, conforme resultados prévios. No entanto, os mecanismos pelos quais as substâncias húmicas promovem essa adaptação ainda não são claros. Este trabalho objetivou desenvolver as bases de uma teoria geral para a sensibilização de plantas por ácidos húmicos relacionada com a resposta do tipo estresse de ácido fraco. Plântulas de milho foram tratadas com diferentes concentrações de ácidos húmicos isolados de vermicomposto e comparadas com diferentes concentrações de ácido acético e salicílico. A avaliação na mudança do pH do citoplasma na ponta de raiz foi realizada com a sonda BCECF AM. A análise da expressão diferencial de proteínas quinase (SnRK2.2) e da malato desidrogenase (MDH) foi realizada por meio da RT qPCR. A transcrição dos fatores de transcrição WKRY foi realizada com a análise transcriptômica. A MDH e a SnRK2.2 tiveram a expressão diferencial aumentada em relação ao

controle em todos os tratamentos. O Aumento da expressão da MDH para o tratamento com os ácidos húmicos a 8mM C L⁻¹ e 16 mM C L⁻¹ foi de 1,72 e 2 vezes, com o ácido acético 0,4 mM e 4 mM foi de 2,23 e 4,29 vezes e ácido salicílico 0,4mM e 1,2 mM aumentou 2,27 e 3,25 vezes, respectivamente. A expressão diferencial dos genes da proteína quinase SnRK2.2 de acordo com diferentes concentrações de ácidos húmicos 8 mM C L⁻¹ e 16 mM C L⁻¹, acético 0,4 mM e 4 mM e salicílico 0,4 mM e 1,2 mM foi de 2,83 e 3,21, 3,75 e 5,08, 1,47 e 3,30 vezes, respectivamente. A acidificação do citoplasma das raízes das plântulas de milho tratadas com ácidos húmicos e o aumento na expressão diferencial dos genes estudados foram observados. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com os ácidos orgânicos indicando uma clara resposta contra o estresse do tipo ácido fraco na fase de aclimatação das plântulas.

Palavras-chave: Substâncias húmicas; estresses abióticos; bioatividade; RT qPCR, pH do citoplasma.

ABSTRACT

CARVALHO, Daiane Baía, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro. March, 2020. WEAK ACID STRESS INDUCED BY HUMIC ACIDS IN MAIZE SEEDLINGS. Advisor: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas.

Industrial agriculture is characterized by the consumption of inputs making crops more susceptible to abiotic stresses. The use of biostimulants in agriculture has stood out as an alternative for crop protection. Humic acids can precondition plants by improving their adaptive response when subjected to different types of abiotic stresses, including salinity, drought and heavy metal toxicity, according to previous results. However, the mechanisms by which humic substances promote this adaptation are still unclear. This work aimed to develop the bases of a general theory for the sensitization of plants to humic acids related to the stress response of weak acid. Maize seedlings were treated with different concentrations of humic acids isolated from vermicompost and compared to different concentrations of acetic and salicylic acid. The evaluation of the pH change of the cytoplasm at the root tip was performed with the BCECF AM probe. The analysis of the differential expression of protein kinase (SnRK2.2) and malate dehydrogenase (MDH) was performed using RT qPCR. The transcription of WKRY transcription factors was performed with transcriptomic analysis. MDH and SnRK2.2 had an increased differential expression compared to control in all treatments. The increase in MDH expression for the treatment with humic acids at 8mM C L⁻¹ and 16mM C L⁻¹ the

increase was 1.72 and 2 times, with 0.4mM and 4mM acetic acid was 2.23 and 4.29 times and 0.4 mM and 1.2 mM salicylic acid increased 2.27 and 3.25 times, respectively. The differential expression of the SnRK2.2 protein kinase genes according to different concentrations of humic acid was 8 mM C L⁻¹ and 16 mM C L⁻¹, acetic 0.4 mM and 4 mM and salicylic 0.4 mM and 1, 2 mM was 2.83 and 3.21, 3.75 and 5.08, 1.47 and 3.30 times, respectively. The acidification of the cytoplasm of the roots of maize seedlings treated with humic acids and an increase in the differential expression of the studied genes were observed. The results were compared to those obtained with organic acids, indicating a clear response against weak acid stress in the seedling acclimatization phase.

Keywords: Keywords: Humic substances; abiotic stresses; bioactivity; RT qPCR, cytoplasm pH.

1.INTRODUÇÃO

A agricultura industrial é caracterizada pelo constante desenvolvimento tecnológico e altos rendimentos (Mazoyer e Roudart, 2006; Goodman et al., 2008) O padrão produtivista e seu pacote tecnológico conhecido genericamente como Revolução Verde embora tenha elevado a produtividade agrícola total tanto nos países desenvolvidos e como nos em desenvolvimento (Bin, 2004; Goodman et al., 2008) deu origem a vários problemas econômicos, sociais e ambientais: êxodo rural, intensificação da poluição levando à contaminação química e biológica dos mananciais hídricos, degradação ambiental e esgotamento dos recursos naturais, intoxicação de trabalhadores rurais e de consumidores urbanos (Mazoyer e Roudart, 2006; Albergoni e Pelaez, 2007; Felício, 2011). Vivan (1998) aborda as limitações desse modelo deixando evidente a necessidade do desenvolvimento e aplicação de alternativas que visem assegurar o rendimento da produção (qualitativa e quantitativamente), porém conservando os recursos naturais e propiciando melhor qualidade de vida aos agricultores. Nesse sentido, o uso de biofertilizantes e bioestimulantes na agricultura vem se destacando pelo seu potencial como promotor de crescimento e aumento da produtividade das culturas (Canellas et al., 2002; Nardi et al., 2002; Tanaka et al., 2003; Criollo et al., 2011; Nardi et al., 2016). Os bioestimulantes aplicados nos estádios de desenvolvimento inicial das plântulas podem estimular o crescimento e desenvolvimento radicular, proporcionando maiores possibilidades de recuperação quando estas forem

submetidas ou se encontrarem em condições de estresses abióticos e bióticos (Vasconcelos et al., 2009).

Os bioestimulantes são materiais que contêm uma ou mais substâncias e/ou microrganismos capazes de estimular a absorção e aumentar a eficiência de uso dos nutrientes, aumentar a tolerância das plantas ao estresse abiótico/ biótico e melhorar a qualidade das culturas quando aplicados em pequenas quantidades sem considerar o conteúdo de nutrientes na sua formulação (Vasconcelos et al., 2009; Calvo et al., 2014; Nardi et al., 2016). A legislação brasileira é omissa em relação aos bioestimulantes e a regulamentação desses produtos junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa) é realizada nas categorias de inoculantes, fertilizantes orgânicos ou organominerais ou, ainda, como condicionadores de solo (Brasil, 2007; Brasil, 2010).

Os principais materiais utilizados na fabricação de bioestimulantes são os hidrolisados de proteínas e outros compostos contendo N, extratos de algas marinhas, quitosana, ácidos húmicos e fúlvicos e bactérias promotoras de crescimento de plantas (Da Silva et al., 2017). Dentre estes, as substâncias húmicas (SH) são utilizadas com maior frequência na formulação de bioestimulantes (Canellas et al., 2019).

Vários trabalhos já demonstraram inequivocamente a presença e a ação similar à das auxinas por diferentes tipos de SH (Canellas et al., 2002; Trevisan et al., 2010a; Canellas et al., 2011). As SH exercem ação direta sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas bem como indiretas, ou seja, aquelas relacionadas com as melhorias da qualidade do solo (García et al., 2014b). Em síntese, os principais efeitos das SH sobre planta são:

- Aumento da absorção e transporte de íons (Nannipieri et al, 1983; Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007; Dobbss et al, 2010);
- Aumento da atividade respiratória e influência no ciclo de Krebs (Nannipieri et al, 1983; Nardi et al., 2007);
- Modificação no conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Tejada e Gonzalez, 2003);
- Aumento/diminuição da atividade de diferentes enzimas (Nannipieri et al, 1983; Aguiar et al., 2009);

- Ação direta tanto no metabolismo primário (açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos) (Trevisan et al., 2010a) como no metabolismo secundário (via do ácido chiquímico (Schiavon et al, 2010));
- Promoção de mudanças fenotípicas relevantes como aquelas relacionadas com modificações na arquitetura do sistema radicular incluindo indução de formação e emergência de raízes laterais (Trevisan et al., 2010a; Canellas et al, 2011; Baldotto et al., 2011), raízes adventícias (Baldotto et al., 2011) e de pelos radiculares (Canellas et al., 2002), encurtamento ou promoção do alongamento radicular (Malik e Azam, 1985);
- Aumento da solubilidade do complexo húmico-cátions metálicos facilitando a absorção de micronutrientes (Chen e Aviad, 1990; Pinton et al., 1999);
- Estimulação da atividade e síntese das enzimas H⁺-ATPases da membrana plasmática em um efeito semelhante ao produzido pelas auxinas (Façanha et al., 2002; Nardi et al., 1991; Canellas et al., 2011; Jindo et al., 2012);
- Aumento da produção de exsudados radiculares e liberação de células de fronteira (Canellas et al., 2019);
- Controle da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ativação da maquinaria enzimática responsável pela degradação das ERO (García et al. 2014a).

Tomados em conjunto esses efeitos justificam o uso crescente das SH como promotores do crescimento vegetal e o interesse científico sobre os bioestimulantes produzidos à base de SH (Nardi et al, 2017; Olivares et al., 2017; Olk et al., 2018; Olaetxea et al., 2018) No entanto, algumas questões permanecem ainda pouco esclarecidas. Uma delas é como um extrato alcalino pode desencadear tantos e diversos efeitos nas plantas incluindo a ativação de mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos. Outra questão intrigante é qual a propriedade química nas SH relacionadas com sua bioatividade.

O objetivo desse trabalho é o de desenvolver uma teoria geral para a ação fisiológica das SH relacionada com a aclimação das plantas visando aumento da tolerância a estresses abióticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As SH, em solução, foram definidas como uma associação de moléculas orgânicas heterogêneas e de massa molecular pequena mantidas em agregado supramolecular por forças fracas de natureza predominantemente hidrofóbicas (do tipo van der Waals, π - π , e ligações CH- π), ligações hidrogênio e pontes catiônicas intermoleculares (Piccolo et al., 2018). Com a acidificação progressiva do meio, as ligações de hidrogênio intermoleculares formadas aumentam a massa molecular aparente das SH até a sua floculação (Trevisan et al., 2010b). A conformação molecular das substâncias húmicas é dependente do pH e da força iônica da solução (Kononova, 1966), sendo assim a separação analítica pode ser feita por meio da ionização com extratores alcalinos. Em pH elevado ocorre a dispersão do macropolímero para a solução, ao contrário, a acidificação colapsa a estrutura que promove a precipitação dos ácidos húmicos (Nardi et al., 1988; Baldotto e Baldotto, 2014; Canellas e Olivares, 2014). Esse conceito permitiu compreender o papel fisiológico das SH na medida em que componentes dessa supramolécula podem em pH ácido acessar os receptores celulares e intermediar diferentes tipos de respostas das plantas. As SH aumentam a eficiência do uso de nutrientes auxiliando a absorção e assimilação tanto de macro como de micronutrientes e promovem o crescimento vegetal pela indução do metabolismo primário e secundário (Piccolo et al., 1992).

Os domínios hidrofóbicos das SH podem manter e preservar moléculas orgânicas bioativas originárias das plantas ou da síntese dos microrganismos (Baldotto e Baldotto, 2014). Foi demonstrado previamente que os domínios hidrofóbicos podem incorporar moléculas orgânicas pelo mecanismo de partição (Spaccini et al., 2002) sendo um dos principais mecanismos de preservação da matéria orgânica chamado genericamente de sequestro de carbono (Spaccini et al., 2004). As moléculas orgânicas preservadas no interior do arranjo supramolecular podem, por sua vez, ser liberadas com a mineralização da matéria orgânica pelas enzimas microbianas ou pela ação de ácidos orgânicos exsudados por plantas e microrganismos que desmontam o aparato supramolecular em solução (Piccolo, 2002). Não é surpreendente, portanto, observar trabalhos reportando diferentes tipos de ação hormonal das SH incluindo atividade auxínica (Nardi et al., 1994; Muscolo e Nardi, 1997; Muscolo et al., 1998), giberélica (Pizzeghello et al., 2001; Pizzeghello et al., 2002), citocinina (Mora et al., 2010; Pizzeghello et al., 2013), alquilamidas (Zandonadi et al., 2019) e de óxido nítrico (Zandonadi et al., 2010; Mora et al., 2012). Conjuntamente é o que se nomina como ação hormonal das SH (Nardi et al., 2018).

Canellas et al. (2011) estudaram a relação entre estrutura e atividade de ácidos húmicos (AH) utilizando métodos espectroscópicos para caracterização química e a indução no número de raízes laterais como marcador fenotípico da bioatividade e o efeito sobre as H⁺-ATPases de membrana plasmática como marcador bioquímico. Métodos quimiométricos foram aplicados e foi possível correlacionar positivamente a hidrofobicidade dos AH com sua atividade de promoção do crescimento radicular. O modelo foi submetido a testes adicionais e a relação entre estrutura-atividade das SH pode ser ajustada em um modelo matemático acurado (Aguiar et al., 2013a). Em termos gerais os AH mais bioativos foram aqueles com forte presença de grupamentos hidrofóbicos como os aromáticos (130-150 ppm) e metoxílicos (56 ppm) porém, participaram com o coeficiente isolado mais importante os grupamentos carboxílicos (174 ppm) indicando a hidrofobicidade (relação entre grupamentos hidrofóbicos/ grupamentos hidrofílicos) como a propriedade química mais relacionada com a bioatividade. Os mesmos resultados qualitativos foram reproduzidos mais tarde por García et al. (2014a).

O avanço das técnicas de análise tem permitido avaliar além da natureza química e composição molecular das SH a sua conformação tanto em solução como no estado sólido. A microscopia de força atômica permite a observação em escala manométrica de amostras pouco manipuladas durante a preparação resultando em uma aproximação maior do estado natural. A aplicação dessa técnica aos estudos dos AH permitiu observar o espiralamento da associação supramolecular entorno de um eixo que permaneceu parcialmente vazio formando um cone com o interior praticamente hidrofóbico e o exterior hidrofílico em contato com o meio (Colombo et al., 2015). Essa conformação foi predita pelo modelo conceitual de Piccolo (2002) no qual os domínios hidrofóbicos são contíguos aos domínios hidrofílicos que permanecem voltados para a face exposta ao meio externo (Piccolo et al., 2018). A predominância de ácidos carboxílicos na acidez total das SH é bem conhecida, mas o papel dos grupamentos carboxílicos na indução de fenômenos fisiológicos é pouco relatado.

Um dos conservantes de alimentos e bebidas mais antigos e mais usados atualmente são os ácidos orgânicos de cadeia curta. Os ácidos orgânicos inibem o crescimento de fungos e bactérias nem um efeito conhecido genericamente como estresse de ácido fraco. O estresse de ácido fraco pode ser definido como o efeito inibitório imposto aos microrganismos pelo ácido fraco devido ao mecanismo de desacoplamento (Guo e Olsson, 2016). Em valores de pH baixo, os ácidos orgânicos ficam predominantemente na forma não dissociada tornando-se hidrofóbicos e propensos a atravessar as membranas por difusão passiva simples. Uma vez dentro da célula, os ácidos fracos se dissociam devido ao pH próximo da neutralidade do citoplasma e liberar prótons, que com a acidificação da célula pode promover a dissipação da força próton-motora e afetar conseqüentemente a fosforilação e a síntese de ATP. Os ácidos orgânicos de cadeia curta são, portanto, amplamente utilizados como conservantes de alimentos em função de ação antimicrobiana conhecida como estresse por ácidos fracos (Theron e Lues, 2010).

A acumulação intracelular de ânions exerce um efeito inibitório particular na glicólise de leveduras levando a severa depleção de energia (Kren et al., 2003). Ácidos fracos mais lipofílicos podem causar danos nas membranas e, na presença de O₂, elevar a produção endógena de radicais livres (espécies reativas de oxigênio - ERO). Os ácidos orgânicos, cuja toxicidade está diretamente relacionada às

concentrações utilizadas podem provocar vazamento na membrana celular e perda da homeostase iônica (Armstrong e Armstrong, 2001).

Embora o estresse por ácido fraco tenha sido estudado em leveduras, as plantas também apresentam respostas contra ácidos fracos. Em pH baixo, tal como o encontrado na rizosfera, os ácidos fracos existem na forma não dissociada (RCOOH) modo pelo qual entram na célula por difusão passiva. O pH intracelular mais elevado dissocia os ácidos fracos gerando prótons (H^+) e ânions (RCOO⁻) que se acumulam nas células e devem ser transportados para manutenção da homeostase celular. Isto torna compreensível que o aumento de duas vezes e meio do transporte de H^+ em plântulas de arroz tratadas com AH tenha sido acompanhado pelo aumento de vinte vezes no transporte de ânions observados pela microssonda eletrônica vibrátil (Ramos et al., 2015).

Os ácidos orgânicos podem causar danos severos em determinadas concentrações, inibindo totalmente o crescimento das raízes. Tal inibição foi observada em plantas de arroz nas concentrações entre 8,4 e 15,8 mM de ácido acético, 4,2 e 9,1 mM de ácido propiônico e 3,7 e 7,7 mM para o ácido butírico (Kopp et al, 2007). Em *Arabidopsis*, foi observada a peroxidação lipídica, dano oxidativo às proteínas e formação de isômeros de clorofila e caroteno causados pela aplicação em excesso de ácido salicílico (AS). Essas alterações foram parcialmente devidas à inativação das enzimas catalase e ascorbato peroxidase, resultando na fitotoxicidade observada (Rao et al., 1997, Horváth et al., 2007). O excesso de AS também pode aumentar o nível de H_2O_2 , aumentando a atividade da Cu/Zn superóxido dismutase (Singh e Usha, 2003). O acúmulo de ERO parece ser crucial para a indução da morte celular programada (Grandis et al., 2010; dos Santos Soares e Machado, 2007). Em concentrações relativamente baixas (0,05–0,5 mM) o AS atua como um causador de estresse moderado, afetando o estado oxidativo da planta de modo semelhante ao dos processos de adaptação ao estresse. Um rápido aumento transitório da ERO é seguido por uma capacidade antioxidante aprimorada, que protege a planta dos graves danos causados por fatores de estresse abiótico subsequentes. Concentrações mais altas de AS causam um nível de estresse oxidativo que a planta é incapaz de superar e que pode resultar na morte da planta (Horváth et al., 2007).

O uso de ácido acético para estimular o crescimento vegetal já foi testado. O tratamento de diferentes plantas como *Arabidopsis*, milho, canola, arroz e trigo com ácido acético aumentou a tolerância à seca pela ativação da via de sinalização do ácido jasmônico (AJ) (Kim et al., 2017).

Recentemente, Canellas e colaboradores (2020) realizaram um estudo no qual demonstraram que o uso de AH durante o período de aclimação de plântulas de milho acionou uma resposta típica contra estresses abióticos observada também em nível de transcrição de genes resposta específicos para diferentes tipos de estresse. As plantas pré-condicionadas por AH foram submetidas posteriormente ao estresse osmótico (estresse salino e osmótico induzido por polietilenoglicol), à toxicidade de metais pesados e por altas concentrações do próprio AH. Foi observada tolerância significativamente maior aos efeitos dos diferentes tipos de estresse nas plantas pré-condicionadas do que nas plantas não pré-condicionadas por AH. Ao considerar o AH como um polieletrólito de ácido fraco e, conseqüentemente, capaz de dissociar prótons de grupos carboxílicos no citoplasma, torna-o um forte candidato a agente estressor que, por sua vez, pode desencadear vias de sinalização e a expressão de genes de resposta ao estresse. As plantas pré-condicionadas quimicamente pelos AH poderão então, apresentar respostas mais rápidas e tolerar melhor as mudanças ambientais. Os efeitos dos ácidos húmicos sobre as bombas de prótons estão diretamente relacionados à definição concepção de que os ácidos húmicos em arranjo supramoleculares podem se fragmentar e alterar o metabolismo celular. O processo de ativação de H^+ -ATPases da membrana plasmática leva à acidificação do apoplasto. Um grande número de fatores pode causar alterações no pH citoplasmático, os ácidos húmicos podem através do aumento da atividade da membrana plasmática H^+ -ATPase (P – H^+ -ATPase) e vacuolar H^+ -ATPase (V- H^+ -ATPase), modular o ambiente elétrico celular, e atuando como tampão celular (Zandonadi et al, 2007). Por estarem envolvidos como mediadores na transdução de sinais nas plantas, os prótons são um fator importante nas cascatas de sinalização de genes de defesa a situações adversas (Felle, 2001). O H^+ livre no citoplasma funciona como um componente de sinalização capaz de interagir com outros mensageiros (Mathieu et al., 1996).

O acúmulo de ácido abscísico (ABA) na planta submetida a estresse pode atingir um nível 10 a 30 vezes maior que o normal (Leung et al., 2012; Beardsell e Cohen, 1975). Muitos genes induzidos por estresses abióticos são controlados pela via dependente de ABA (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2005). Quatro classes principais de sequências reguladoras conferem ao ABA a capacidade de indução da expressão gênica: as proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK), mitógeno ativado por proteína quinase (MAPKs), proteína quinase relacionada a sacarose (SnRK2) e a proteína fosfatase (PPS: PP1A, PP2A) (Taiz et al., 2013). Algumas proteínas quinases relacionadas ao SNF1 tipo 2 (SnRK2) são ativadas por ABA e atuam na mediação da regulação da abertura estomática. Em *Arabidopsis*, nove de dez SnRK2 são ativados por hiperosmolaridade e cinco SnRK2 são ativados por ABA (Boudsocq et al., 2004). Em arroz dez proteínas quinases SnRK2 foram identificadas e todos os membros da família são ativados pelo estresse hiperosmótico e têm sua ativação promovida pelo ABA (NAKASHIMA et al., 2009). SnRK2s ativados por ABA também fosforilam a NADPH oxidase da membrana plasmática que posteriormente produz EROS (de Zelicourt et al., 2016).

Alguns trabalhos relatam que o AS e o ácido acetilsalicílico fornecem múltipla tolerância ao estresse nas plantas e que podem regular a expressão de genes envolvidos na tolerância ao estresse e na regulação do metabolismo das plantas (Kang et al., 2014; Senaratna, 2000).

Além dos genes mencionados, há fatores de transcrição (FT) importantes para respostas vegetais ao estresse. Os FT são proteínas que codificam que se ligam ao promotor e ao “enhancer” dos genes e ajudam no processo de iniciação da transcrição gênica (Xiao et al., 2004). A regulação transcricional desempenha um papel crucial em muitos processos celulares de resposta das plantas a situações de estresse (Xu et al., 2015). Os FT da família WRKY estão ligados à defesa, senescência e resposta da planta a vários estresses ambientais. O fator de transcrição WRK70 foi ativado por AS e reprimido por ácido jasmônico (AJ) em plantas de *Arabidopsis* (Shim et al., 2013). Estudos de expressão de WRKY46, WRKY70 e WRKY53 em *Arabidopsis* sugeriram que estes genes estão parcialmente envolvidos na via de sinalização de AS (Hu et al., 2012). Em *Arabidopsis* submetidas ao estresse osmótico, WRKY70 e WRKY54 cooperaram como reguladores negativos do fechamento estomático (Li et al., 2013).

O objetivo desse trabalho foi comparar o efeito de AH com AA e AS no pH intracelular de raízes de plântulas de milho. As mudanças na arquitetura do sistema radicular de plântulas de milho e no nível de transcrição de alguns genes alvo também foram avaliadas.

3. HIPÓTESE E OBJETIVO

A hipótese da pesquisa é a de que os AH podem desencadear uma resposta típica nas plantas caracterizada como estresse por ácido fraco tal como o observado com o uso de ácido acético ou ácido salicílico. A indução de uma possível resposta contra os estresses induzida por AH justificaria a ação dos bioestimulantes produzidos à base de SH na melhoria da tolerância aos estresses bióticos e abióticos.

3.1. Objetivos específicos

1. Caracterizar a presença de grupamentos carboxílicos nos ácidos húmicos utilizando a espectroscopia de ressonância magnética no estado sólido e a titulação potenciométrica;
2. Avaliar mudanças da arquitetura do sistema radicular de plântulas de milho tratadas com AH e compará-las com o tratamento com ácido acético e salicílico;
3. Avaliar mudanças no pH intracelular do sistema radicular por meio da sonda fluorescente BCECF - 2',7'-Bis-(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína;
4. Avaliar mudanças no nível de transcrição dos genes SnRK2.2 de proteínas quinases relacionadas a Snf1 e, WRKY70;

5. Investigar a expressão diferencial do gene da isoenzima Malato Desidrogenase (MDH) sob diferentes condições.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Extração e caracterização dos ácidos húmicos

Os AH foram extraídos de vermicomposto produzido com esterco de curral com uso de base forte diluída (NaOH) na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ razão (1:10 v:v) em atmosfera de N_2 sob agitação durante 4 horas. Após esse período o extrato alcalino foi separado por centrifugação a 3.500 g por 30 min . A extração foi repetida até obtenção de um extrato incolor. Os ácidos húmicos foram isolados com o abaixamento do pH da solução até $1,0$ com $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$. Os AH foram separados dos ácidos fúlvicos por centrifugação e redissolvidos adicionando-se um volume de $\text{KOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob N_2 . Adicionou-se KCl sólido até concentração de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ para remoção de argilas realizada com centrifugação (3500 g por 30 min). A solução foi novamente acidificada até $\text{pH} \sim 1,0$ com $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ e mantida em $8 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas . Os ácidos húmicos foram separados por centrifugação (3.500 g 20 min) e dialisados com membrana com poro de exclusão de 1000 Da até a condutividade elétrica constante. Por fim, os ácidos húmicos foram secos por liofilização. A caracterização dos AH foi realizada pela espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear com Polarização Cruzada e Rotação no Ângulo Mágico (^{13}C CP-MAS NMR). O espectro no estado sólido foi obtido no equipamento Bruker-400 equipado com sonda para amostras sólidas nas seguintes condições experimentais: sequência de pulsos utilizada: CP/MAS; frequência de observação:

75,4 MHz para o ^{13}C ; largura espectral de 50 kHz; tempo de aquisição 50 ms; pulso de 5 ms (90°); intervalo entre pulsos: de 4 s; tempo de contato de 1 ms; núcleo desacoplado na aquisição: ^1H ; modo desacoplador: “gated”; e número de transientes: 10.000. As áreas dos sinais de NMR foram integradas utilizando-se o software do espectrômetro Bruker (Topspin) e hexametilbenzeno (HMB) ($\delta_{\text{metilas}} = 17,3$ ppm) como referência secundária. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e os espectros integrados nas seguintes regiões: C alquílico (0–50 ppm), C mono ou dioxigenado ou C de peptídeos (50–110 ppm), C aromáticos e olefinas (110–150 ppm), C aromático substituído por heteroátomo (150–165 ppm) e C em grupamentos carboxílicos, cetonas, amidas ou éteres (165–200 ppm). A composição elementar foi determinada em um analisador elementar Perkin-Elmer modelo 1200 em duplicata. A determinação da acidez total foi realizada por titulação potenciométrica. Para tanto, foram preparadas soluções aquosas experimentais com água ultrapura e tituladas com NaOH isento de CO_2 à temperatura ambiente em atmosfera inerte de N_2 . Amostras de 50 mg L^{-1} de ácidos húmicos foram tituladas com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até pH 11 com alíquotas de 100 microlitros adicionadas após a estabilização do pH. A força iônica foi mantida constante com NaCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados foram tratados com o programa Origin® para obtenção das curvas de derivação e com o programa CurTiPot - IQ-USP.

4.2. Ensaio com plantas

4.2.1. Determinação da curva de dose-resposta

Foi utilizado o milho Dekalb VT Pro 3TM Híbrido 117. As sementes foram desinfestadas superficialmente pela imersão em hipoclorito de sódio 2 % (v/v) por cinco minutos sob agitação orbital. Após 10 lavagens com água ultrapura, as sementes foram colocadas para germinar em papel germitest no escuro a 28°C. Decorridos 4 dias após a germinação (DAG), as plântulas foram selecionadas e transferidas para crescimento em potes de 0,5 L em meio mínimo contendo solução de CaCl_2 com 2 mM L^{-1} por um período de 6 dias. Nesse experimento, o meio mínimo foi utilizado a fim de evitar qualquer influência dos nutrientes. As plantas foram expostas a um fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com fluxo fotossintético

de $480 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 70% e temperaturas de 28°C / 24°C (luz/escuro). Os tratamentos consistiram na aplicação de crescentes doses dos seguintes ácidos orgânicos fracos: ácidos húmicos (AH) nas concentrações 0, 2, 4, 8 e 16 mM C L^{-1} ; ácido acético (AA) nas concentrações 0, 0,004, 0,04, 0,4 e 4 mM L^{-1} e ácido salicílico (AS) nas concentrações 0, 0,2, 0,4, 0,8 e $1,2 \text{ mM L}^{-1}$ solubilizados em solução de CaCl_2 2 mM L^{-1} . O pH das soluções foi ajustado em 5,8. O pH de cada pote foi medido diariamente com eletrodo de vidro e calomelano. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições com 3 plântulas em cada pote. Após seis dias de crescimento nas soluções de ácidos húmicos (AH), ácido acético (AA) e ácido salicílico (AS), as plântulas foram coletadas para avaliação do crescimento. Para determinação da melhor concentração utilizou-se uma balança analítica de precisão para determinação da massa fresca das raízes. Para controle utilizou-se somente solução de CaCl_2 2 mM L^{-1} . A melhor concentração foi determinada pela derivação da equação de regressão da curva de resposta obtida pelo tratamento dos dados no *software* Origin®.

Após o ensaio de doses, foi conduzido um novo experimento utilizando-se a dose ótima e a dose de inibição de cada ácido orgânico. Para o ácido acético utilizaram-se as doses $0,4 \text{ mM L}^{-1}$ e 4 mM L^{-1} . Para o ácido salicílico utilizaram-se as doses $0,4 \text{ mM L}^{-1}$ e $1,2 \text{ mM L}^{-1}$ e para os ácidos húmicos utilizaram-se as doses 8 mM C L^{-1} e 16 mM C L^{-1} solubilizadas em solução de CaCl_2 2 mM L^{-1} . O pH das soluções foi ajustado em 5,8. Este ensaio foi utilizado para avaliação da variação do pH intracelular e expressão diferencial de genes.

4.2.2. Avaliação da variação do pH intracelular

Após 6 dias de crescimento nos tratamentos nas doses de inibição e estímulo de cada ácido orgânico, as raízes foram cortadas manualmente com lâmina em segmentos de 3,0 a 4,0 cm de comprimento, dispostas sobre uma placa de Petri e imersas em solução tampão fosfato (*PBS-Phosphate-buffer saline*) pH 7,1 em microtubo de polipropileno do tipo Eppendorf de 0,5 mL. A solução PBS foi descartada adicionado $30 \mu\text{M}$ da sonda BCECF, AM 2',7'-Bis-(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína. Depois de 30 minutos de incubação em temperatura ambiente,

as raízes foram lavadas novamente com solução PBS e fixadas por 24 horas com solução formaldeído 4%. Posteriormente, as amostras foram visualizadas e as imagens capturadas pelo microscópio ótico Axioplan - Zeiss, acoplado ao sistema de aquisição de imagem digital equipado com câmera ZVS-47EC. Utilizou-se o programa Zeiss® para a observação da variação do pH intracelular das plântulas.

4.2.3. Expressão Diferencial de Genes

4.2.3.1. Desenho de Primers

Após revisão em bases de dados científicos para estabelecimento das possíveis sequências de oligonucleotídeos passíveis de expressão, desenharam-se os oligonucleotídeos a serem testados com auxílio de três programas para desenho dos iniciadores: Primer3Plus, NCBI Blast e OligoExplorer. Os primers foram desenhados selecionando-se os seguintes parâmetros: tamanho dos primers (18 a 22 pares de bases); tamanho do amplicon (80 a 150 pares de bases); temperatura de melting (58 a 60° C); conteúdo G/C (45 a 55%); número de runs e repetições (máximo 4 pares de bases); bases na região 3' (G, C, GC ou CG, máximo 3 G ou C); formação de grampos, autodímeros e cross-dímero. Os dados gerados em cada software foram cruzados com os demais para definição dos *primers* com características ideais. Os pares de *primers* selecionados foram submetidos à verificação de possíveis dímeros e dobramentos utilizando-se o programa Primer Premier. As informações relativas aos primers utilizados encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizados para o organismo *Zea mays*.

FATOR	NOMENCLATURA	FORWARD	Nº DE BASES	REVERSE	Nº DE BASES	TAMANHO AMPLICON
SnRK2.2	Proteína serina / treonina-quinase relacionada à sacarose não fermentativa (SNF)	GCACTCTCAACCAAAATCAA	20	CATACACTACGAACAACCAC	20	134
MDH	Malato Desidrogenase	AGTCGTTGCGACAACTGATG	20	TTCCTTTCCATTCCCTCCTT	20	96
ZmTUB α	Alfa-tubulina	CCGCACCATCCAGTTCGT	18	CTGGTAGTTGATTCCGGCACT TG	22	61
ZmTUB β	Beta-tubulina	CTACCTCACGGCATCTGCTA TTG	23	GTCACACACACTCGACTTCA CG	22	139

Realizou-se estudo de PCR em tempo real para validação dos oligonucleotídeos desenhados.

4.2.3.2. Extração de RNA

A extração do RNA foi realizada na sala de Biologia Molecular do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – LBCT da Universidade Estadual do Norte Fluminense. O RNA das raízes das plântulas de milho foi isolado com RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) seguindo os seguintes procedimentos: 10 µl de β-mercaptoetanol (β-ME) ou 20 µl de ditioneitol 2 M (DTT) foram adicionados a 1 mL de tampão RLT ou tampão RLC para preparo de trabalho. O material coletado foi colocado imediatamente em nitrogênio líquido. Um volume de 100 mg de material vegetal foi moído em nitrogênio líquido utilizando-se almofariz e pilão. O pó de tecido foi colocado em um tubo de microcentrífuga de 2 mL sem RNase e resfriado com nitrogênio líquido. Adicionaram-se 450 µl de tampão RLT ou tampão RLC até um máximo de 100 mg de pó de tecido. Vortexou-se vigorosamente. Transferiu-se o lisado para uma coluna de rotação QIAshredder (lilás) colocada em um tubo de coleta de 2 mL. Centrifugou-se por 2 min em velocidade total. O sobrenadante do fluxo foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 0,5 volumes de etanol (96–100%) ao lisado limpo e misturados imediatamente por pipetagem. A amostra com aproximadamente 650 µL foi transferida para uma coluna RNeasy Mini spin (rosa) em um tubo de coleta de 2 mL. Centrifugou-se por 15 s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm). O fluxo foi descartado. 700 µl de tampão RW1 foram adicionados à coluna de rotação RNeasy, centrifugados por 15 s a $\geq 8000 \times g$ descartando-se o fluxo. 500 µl de tampão RPE foram adicionados à coluna de rotação RNeasy, centrifugados por 15 s a $\geq 8000 \times g$ e o fluxo descartado. 500 µl de tampão RPE foram novamente adicionados à coluna de rotação RNeasy e centrifugados por 2 min a $\geq 8000 \times g$. A coluna de rotação RNeasy foi colocada em um novo tubo de coleta de 1,5 mL. Foram adicionados 30–50 µl de água sem RNase diretamente à membrana da coluna de rotação e centrifugados por 1 min a $\geq 8000 \times g$ para eluir o RNA.

A análise quantitativa (ng/µL), pureza e integridade do RNA isolados foi avaliada em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria e a pureza determinada pela relação

A260nm/A280nm (Sambrook e Russel, 2001), utilizando 1 µl de amostra para leitura no espectrofotômetro Nanodrop Microvolume Quantification of Nucleic Acids. Após a quantificação as amostras foram tratadas com 3 µL da enzima DNase incubando 10 minutos a 65°C para posterior síntese de cDNA e estabilização da amostra. Foram extraídas 3 repetições das amostras de RNA das raízes de plântulas de cada tratamento.

4.2.3.3. Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para a reação foram utilizados um volume aproximado de 5000 ng de RNA total (x µL), 250 ng/ µL de *Random Primer* (1 µL), 10mM de dNTP (1 µL) e água ultrapura (H₂O para PCR y µL). O volume total da reação foi de 13 µL. Incubou-se a 65°C por cinco minutos no equipamento AB Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler, em seguida colocou-se em gelo por um minuto. Após esse período fez-se uma breve centrifugação e adicionaram-se os seguintes reagentes: 4 µL de tampão de reação (5x First – Strand Buffer – 250 mM Tris HCL); 1 µL de DTT 100mM; 1 µL de RNase Out™ Recombinant RNase Inhibitor (40U/ µL) e 1 µL de Superscript™ III RT (200U/ µL). O conteúdo foi misturado por pipetagens e incubado por 10 minutos à temperatura de 25°C, 60 minutos a 50° C e a inativou-se a reação por aquecimento a 70° C por 15 minutos no equipamento Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler.

A integridade do material isolado foi avaliada por PCR Convencional e gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo.

4.2.3.4. PCR em tempo real (RT-qPCR)

A RT-qPCR foi realizada no termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) usando o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A reação de PCR foi composta de: 7,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix, diferentes concentrações para cada par de iniciadores e 1,0 µl de cDNA molde nas seguintes diluições de (1:4, 1:8 e 1:16) em um volume final de reação de 15 µl. Os ciclos foram realizados com as seguintes condições: 2 minutos a 95°C, seguido

de 40 ciclos de 20 segundos a 95°C e 30 segundos a 58°C. Para cada amostra de cDNA foram realizadas três reações da RT-qPCR obtendo assim três réplicas técnicas para validação dos resultados da expressão relativa dos genes. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo *software* qBase e os gráficos plotados com auxílio do GraphPad Prism.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização dos ácidos húmicos

As principais funções químicas relacionadas à composição molecular dos AH foram estudadas com o uso da espectroscopia de ^{13}C -CPMAS NMR. O espectro dos ácidos húmicos pode ser observado na Figura 1. O Quadro 2 apresenta o resultado da integração dos principais deslocamentos químicos. O espectro da amostra de ácidos húmicos mostrou a presença de um ombro alargado com centro ao redor de 30 ppm que corresponde a grupamentos alifáticos do tipo CH_2 . Em 55,8 ppm foi observado um sinal forte e estreito indicando a presença de grupos metoxílicos (OCH_3) provenientes de estruturas de ligninas. Em 73 ppm foi observado um ombro de absorção típico de C-O alquílico e estruturas peptídicas. O carbono anomérico em 104,7 ppm esteve presente em baixas concentrações. O carbono do tipo sp^2 em estruturas aromáticas não substituídas teve deslocamento químico em 131,6 ppm enquanto os substituídos em 152,3 ppm. Finalmente, os grupamentos carboxílicos foram observados em 173,7 ppm. Os grupamentos carboxílicos corresponderam a cerca de 9% da área do espectro.

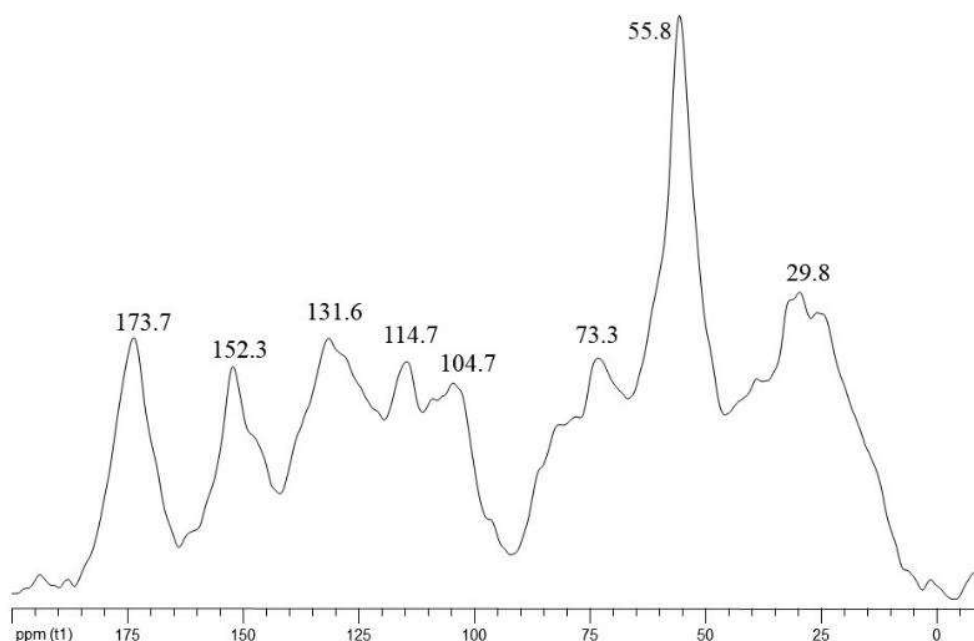


Figura 1. Espectro de ^{13}C -CPMAS NMR de ácidos húmicos isolados de vermicomposto de esterco bovino.

Quadro 2. Distribuição relativa (%) dos grupamentos funcionais nas diferentes regiões (ppm) do espectro de ^{13}C -CPMAS NMR da amostra de ácidos húmicos isolados de vermicomposto.

	Caboxílicos 190-160	O-Arílico 160-145	Aromático não substituído 145-110	O- Alquílico 110-60	CH ₃ O/CN 60-45	alquílico 45-0
HA	8.8	7.5	19.5	24.6	16.7	22.9

A caracterização da acidez carboxílica foi determinada pela titulação potenciométrica (Figura 2), marcada pelo aumento significativo do pH quando o ponto de equivalência foi atingido. O Quadro 3 apresenta as concentrações e os pKas dos sítios ionizáveis determinados para as quatro classes de grupos ionizáveis nas amostras de ácidos húmicos isolados de vermicomposto. Na faixa

de pH utilizada no experimento com plântulas de milho 5,8-6,0 a maior parte dos grupamentos carboxílicos encontra-se inicialmente dissociada (pKa 3,3, 3,6 e 4,8). Na estrutura das substâncias húmicas, dentre os grupamentos com características ácidas, as carboxilas são as que apresentam pKa mais baixos (Canellas et al., 2005).

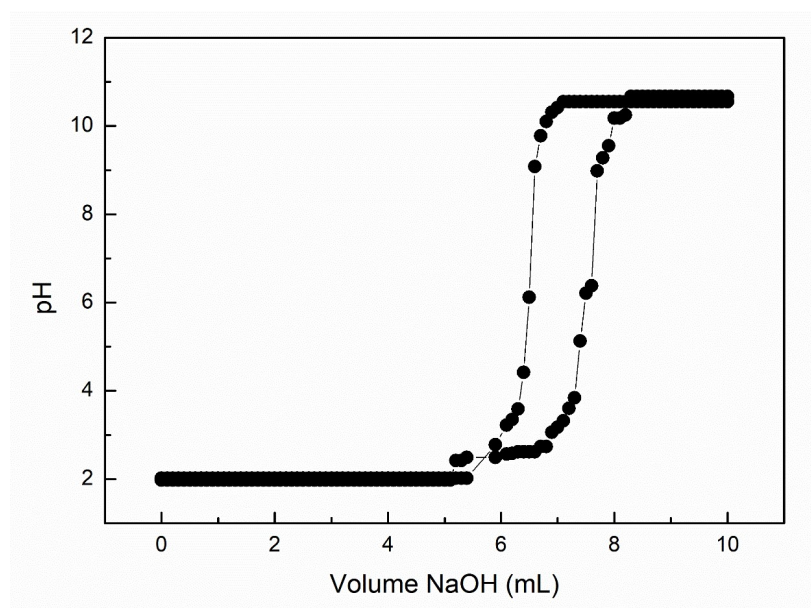


Figura 2. Curvas de titulação potenciométrica (NaOH 0,1 mol L⁻¹) de ácidos húmicos isolados de vermicomposto. Correlação linear entre os valores experimentais e os valores ajustados pelo modelo: R = 0,9873.

Quadro 3. Concentração e pKa das quatro classes de sítios ionizáveis nas amostras de ácido húmico, determinados em meio NaOH 0,1 mol L⁻¹.

Concentração (mol L ⁻¹)	pKa	
5,30 x 10 ⁻⁴	pKa1	3,3
3,19 x 10 ⁻⁴	pKa2	3,6
4,57 x 10 ⁻⁴	pKa3	4,8
6,14 x 10 ⁻⁴	pKa4	7,5

5.2. Ensaio com plantas

5.2.1. Crescimento radicular

As curvas de dose-resposta em relação à massa radicular das plântulas de milho tratadas com os diferentes ácidos são apresentadas na Figura 3. A aplicação exógena de baixas concentrações tanto de ácido acético como do salicílico promoveu aumento na biomassa fresca das raízes da ordem de 10 e 7%, respectivamente em relação ao controle (Figura 3 B e C).

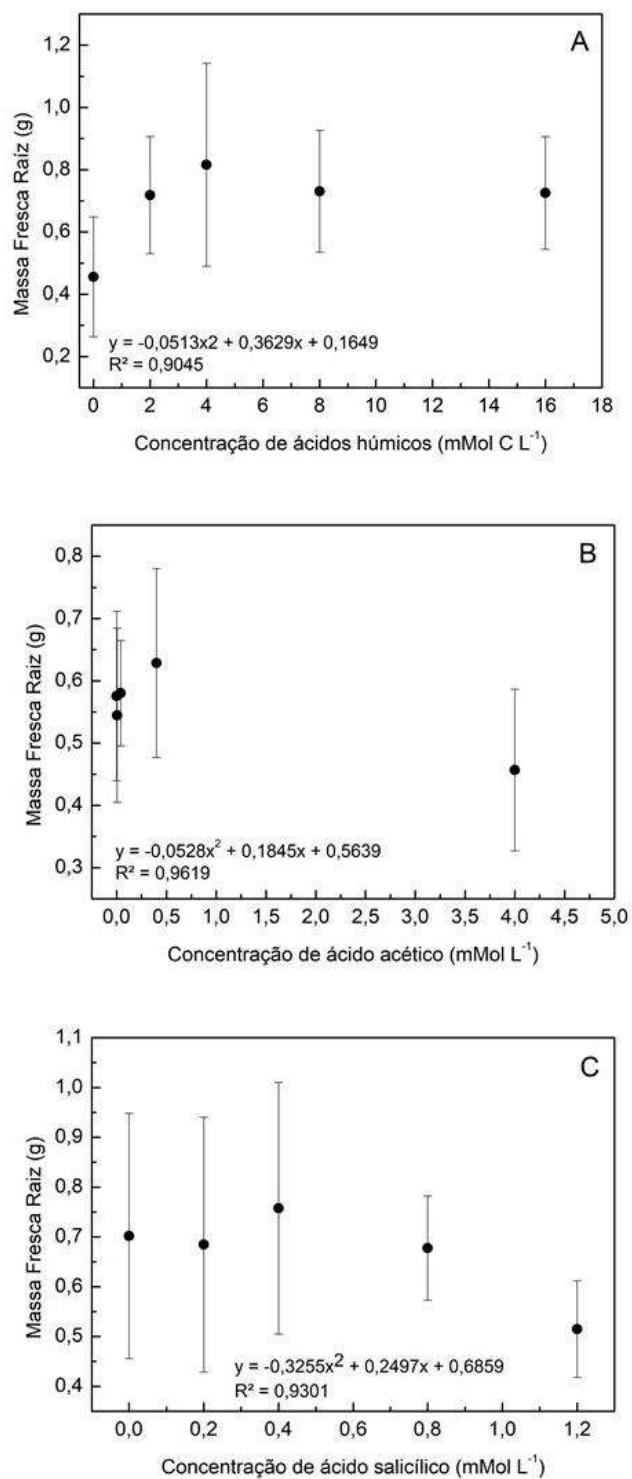


Figura 3. Curva de resposta da massa fresca de raízes de plântulas de milho em função da concentração de A: ácidos húmicos; B: ácido acético e C: ácido salicílico.

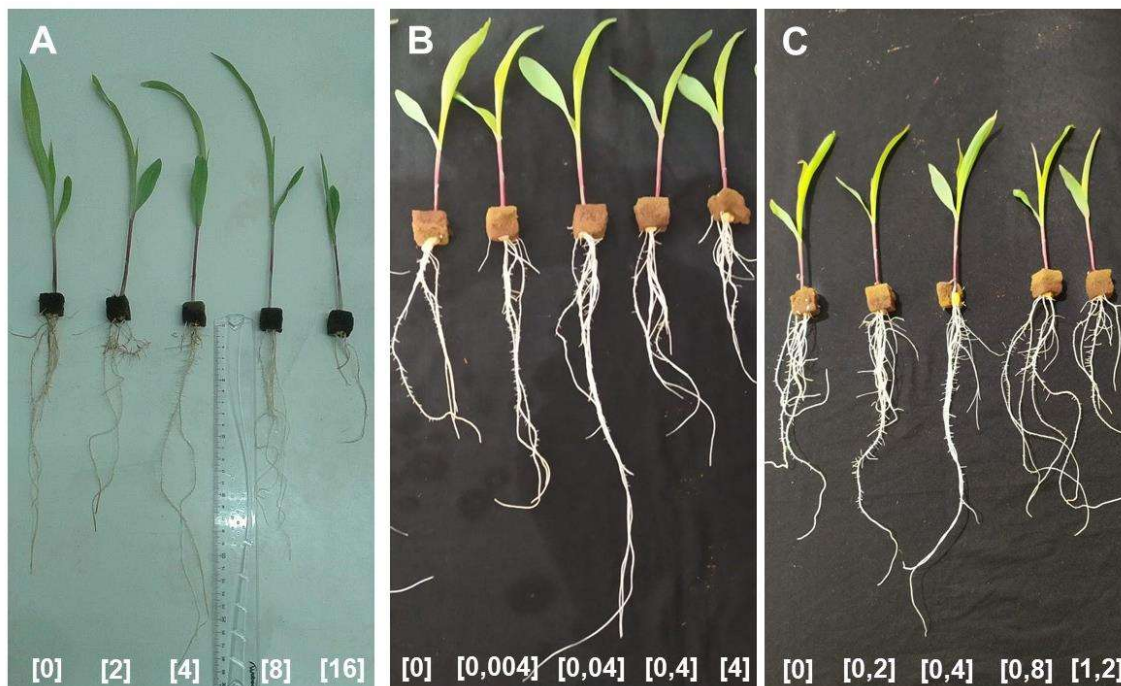


Figura 4. Aspecto visual das raízes de plântulas de milho em função de diferentes concentrações (mM C L^{-1}) de A: ácidos húmicos (mM L^{-1}); B: ácido acético e C: ácido salicílico (mM L^{-1})

A massa fresca das raízes de plântulas de milho em função das diferentes concentrações de todos os ácidos orgânicos apresentou um modelo polinomial de segunda ordem (quadrático) com R^2 elevado. Em baixas concentrações os ácidos orgânicos de cadeia curta e aromáticos promoveram aumento da biomassa, porém em concentrações mais elevadas foi observada a diminuição do crescimento radicular (Figura 3 B e C; Figura 4). No tratamento com os ácidos húmicos a concentração mais elevada também apresentou massa radicular maior em relação ao controle.

5.2.2. Variação do pH do meio de crescimento das plântulas

A imposição dos tratamentos (diferentes concentrações de ácidos orgânicos) foi realizada com pH do meio de crescimento ajustado para 5,8. O pH do meio foi monitorando diariamente e sua variação pode ser observada na Figura 5.

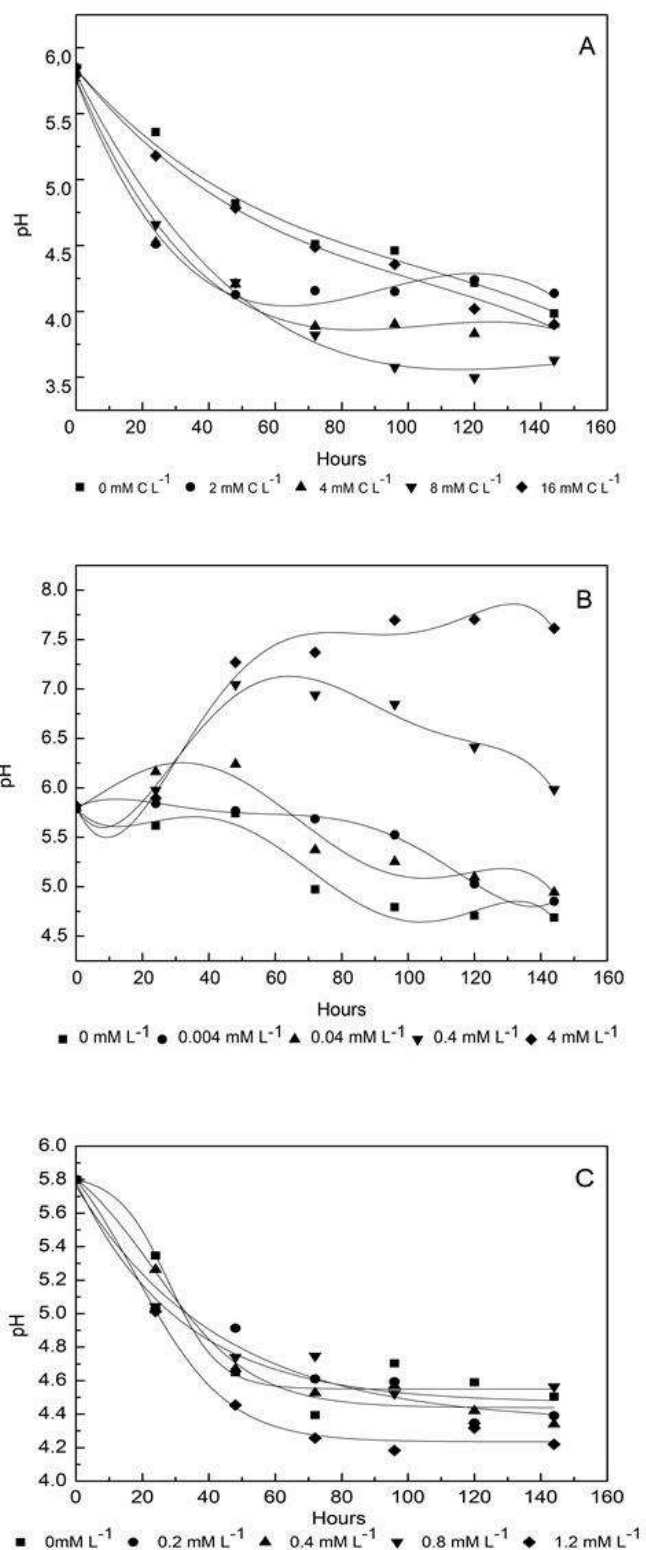


Figura 5: Variação do pH do meio de crescimento em função da concentração de A: ácidos húmicos (mM C L^{-1}); B: ácido acético (mM L^{-1}); C: ácido salicílico (mM L^{-1}).

O pH do meio de crescimento das plântulas tratadas com AH sofreu um decréscimo exponencial estabilizado em valores abaixo do controle em 80 h de tratamento nas concentrações de 8 e 16 mM L⁻¹. Na concentração mais elevada de ácidos húmicos (16 mM C L⁻¹) os valores de pH permaneceram muito próximos do controle. A maior diferença em relação ao controle foi observada com a concentração de 8 mM C L⁻¹ ou seja com pH final mais ácido. A concentração de 2 mM C L⁻¹ apresentou uma variação errática com decréscimos no início do experimento e aumento do pH no final. A adição de ácido salicílico (Figura 5C) promoveu um abaixamento do pH da solução de crescimento em todas as concentrações utilizadas. No entanto, o pH do meio de crescimento das plântulas controle foi menor do que em todas as concentrações de ácido salicílico. O ácido acético nas concentrações de 0,4 e 4 mM L⁻¹ promoveu a alcalinização do meio de crescimento das plântulas (Figura 5 B). Nas concentrações menores de ácido acético o pH do meio permaneceu ácido, porém mais elevado do que o pH do meio controle.

5.2.3. Avaliação da acidificação do citoplasma

O uso da sonda BCECF AM permitiu observar a mudança no pH do citoplasma em função dos tratamentos com os diferentes ácidos utilizados nesse experimento. A Figura 6 apresenta a fluorescência das células das raízes visualizada pela microscopia ótica. Foi possível observar nas células das raízes das plântulas controle a maior emissão de fluorescência indicando pH próximo da neutralidade. O uso de ácidos húmicos na concentração de 8 mM C L⁻¹ promoveu uma forte acidificação do citoplasma demonstrado pelo desaparecimento quase completo da emissão de fluorescência da sonda (Fig 6B). Com a concentração mais elevada (16 mM C L⁻¹) a acidificação promovida no citoplasma foi menor (Fig 6C).

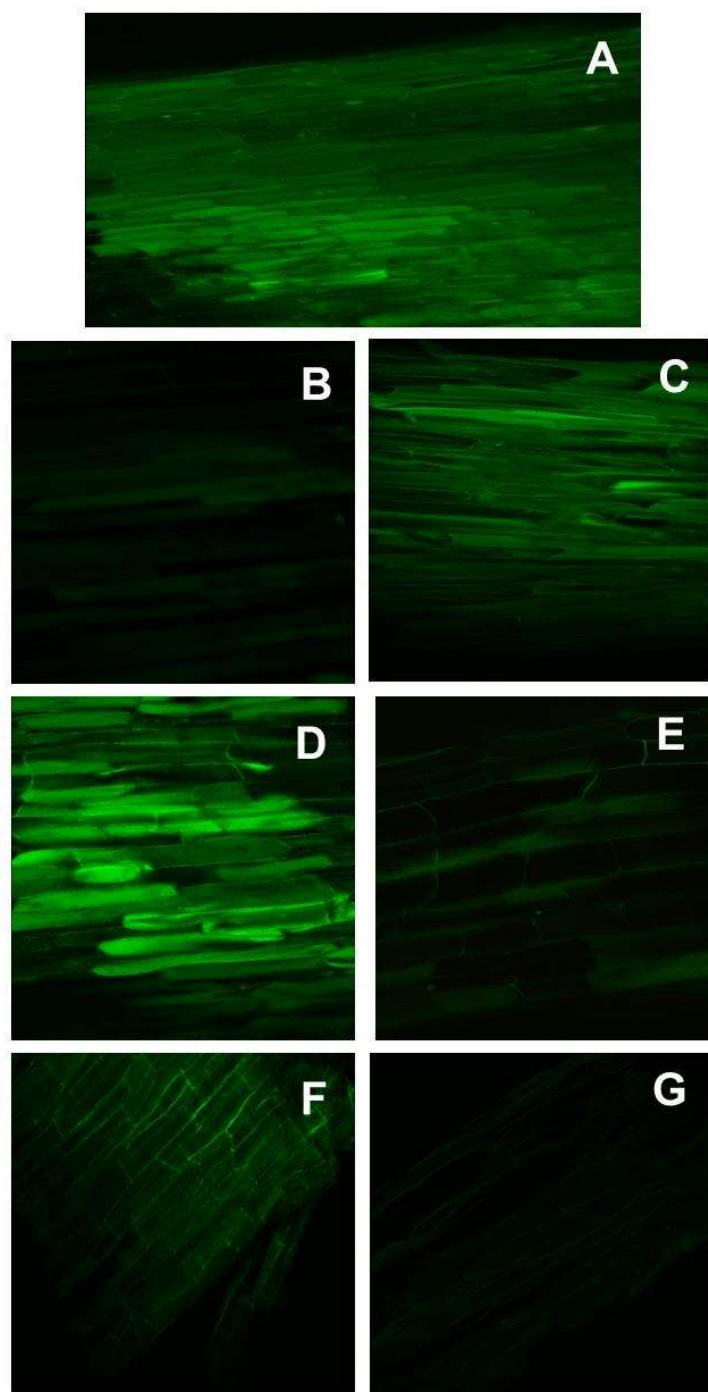


Figura 6. Fluorescência da sonda BCECF, AM 2',7'-Bis-(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína em células da ponta de raízes de plântulas de milho tratadas ou não (controle) com diferentes concentrações de ácidos orgânicos. A: controle; B: ácidos húmicos 8 mM C L⁻¹; C: ácidos húmicos 16 mM L⁻¹; D: ácido acético 0,4 mM L⁻¹; E: ácido acético 4 mM L⁻¹; F: ácido salicílico 0,4 mM L⁻¹; G: ácido salicílico 1,2 mM L⁻¹. Os segmentos radiculares foram cortados manualmente; o uso da sonda foi descrito no material e métodos e as imagens foram obtidas em microscópio ótico da Zeiss com aumento de 20x.

O ácido acético em baixa concentração ($0,4 \text{ mM L}^{-1}$) não alterou significativamente o pH das células em comparação com o controle (Figura 6D) mas provocou forte acidificação do citoplasma na maior concentração (4 mM L^{-1}) com desaparecimento quase completo da fluorescência do sonda (Figura 6E). O ácido salicílico promoveu acidificação do citoplasma nas duas concentrações utilizadas (Figura 6F e 7G).

5.2.4. Avaliação da expressão diferencial da SnRK2.2, malato desidrogenase e Fatores de transcrição WRKY

A expressão diferencial dos genes da proteína quinase SnRK2.2 (serina/treonina quinase relacionada à sacarose não fermentativa SNF) e MDH (malato desidrogenase) nas raízes de plântulas de milho em função de diferentes concentrações de ácidos húmicos e dos ácidos acético e salicílico é mostrada na Figura 7. O nível de transcrição dos fatores de transcrição WKRY foi determinado somente no tratamento com ácidos húmicos na concentração de 4 mM C L^{-1} e pode ser observado na Figura 8 a partir da análise do transcriptoma das raízes.

Todos os ácidos orgânicos aplicados no meio de crescimento das plântulas de milho promoveram aumento da expressão relativa do gene SnRK2.2 em relação ao controle. O ácido acético aumentou a expressão da SnRK2.2 entre 5 e 3,75 vezes em relação ao controle na concentração de 4 e $0,4 \text{ mM L}^{-1}$, respectivamente. O ácido salicílico na concentração de $0,4 \text{ mM L}^{-1}$ foi o que proporcionou o menor aumento da expressão diferencial da SnRK2.2 em relação ao controle. No tratamento com os ácidos húmicos o aumento na expressão diferencial da SnRK2.2 foi de 2,8 e 3,2 vezes em relação ao controle nas concentrações 8 e 16 mM C L^{-1} , respectivamente. Da mesma forma, todos os tratamentos induziram a expressão relativa da malato desidrogenase (MDH) (Figura 7B).

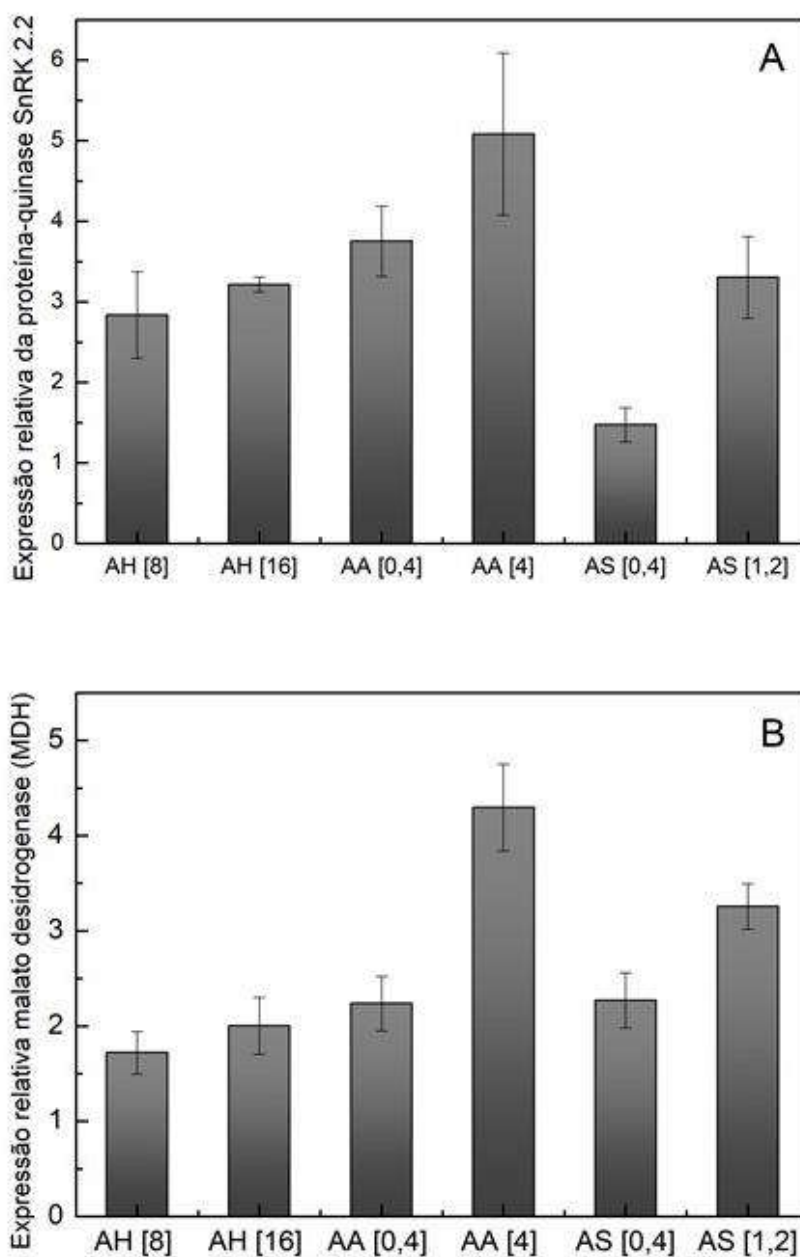


Figura 7A: Expressão da transcrição diferencial dos genes SnRK2.2 (serina/treonina quinase relacionada à sacarose não fermentativa SNF) em raízes de plântulas de milho tratadas com diferentes ácidos orgânicos. B: expressão diferencial da MDH (malato desidrogenase). AH: ácidos húmicos [8 e 16 mM C L⁻¹]; AA: ácido acético (0,4 e 4 mM L⁻¹); AS: ácido salicílico [0,4 e 1,2 mM L⁻¹]. A expressão foi normalizada em relação ao tratamento controle (controle = 1). Os dados representam a média e as barras o desvio padrão (n= 3) em três experimentos independentes.

No entanto, na concentração de ácido acético de 4 mM L⁻¹ foi observado um aumento de 4,3 vezes em comparação com o controle. O ácido acético na concentração de 0,4 mM L⁻¹ teve uma expressão de 2,24 vezes maior que o controle. Os ácidos húmicos em ambas as concentrações utilizadas induziram a expressão da MDH ao redor de duas vezes em relação ao controle. Não foi observada diferença significativa entre as concentrações utilizadas. Os fatores de transcrição WKRY foram encontrados em níveis mais elevados de transcrição nas plântulas de milho tratadas com 4 mM C L⁻¹ em relação ao controle (Figura 8). Os níveis de transcrição variaram de 2 vezes em relação ao controle para os fatores de transcrição WKRY 54, 69 e 70 até perto de 4,5 vezes para os fatores de transcrição WKRY 40, 70 e 74 em relação ao controle.

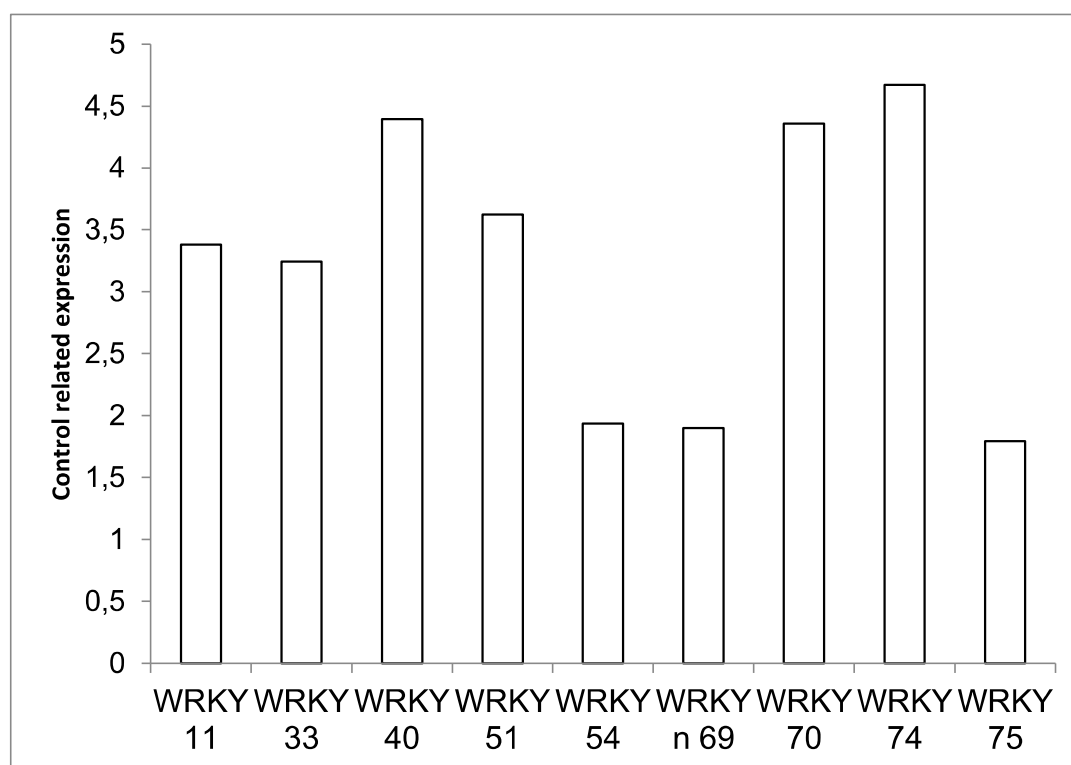


Figura 8. Análise da transcrição diferencial dos fatores de transcrição WRKY em raízes de plântulas de milho tratadas com 4 mM C L⁻¹ de ácidos húmicos isolados de vermicomposto.

6. DISCUSSÃO

A intensificação da agricultura focada principalmente em produtividade tem aumentado o efeito da ação dos diferentes tipos de estresses abióticos. Com as mudanças climáticas o desafio de proteger as lavouras contra os estresses é fundamental principalmente para as economias de base agrícola. O pré-condicionamento de plantas pode ser uma estratégia importante na proteção das lavouras. O pré-condicionamento significa aumentar a tolerância da planta em nível celular melhorando seu desempenho contra agentes de estresse com a aplicação de agentes químicos e/ou biológicos para elicitar essa resposta (Agathokleous et al., 2018). Os AH também podem ser usados para a sensibilização ou pré-condicionamento de plantas para o aumento das respostas aos diferentes tipos de estresse como salinidade, seca e toxicidade de metais pesados (Canellas et al., 2020). Esse trabalho apresenta resultados de um possível mecanismo responsável pela indução de respostas pelos ácidos húmicos envolvendo o mecanismo de resposta ao estresse de ácidos fracos.

Os ácidos húmicos isolados de vermicomposto apresentaram características químicas semelhantes àqueles com elevada atividade biológica devido à presença de sinais de elevada intensidade em 56, 130 até 150 e 174 ppm no espectro de ^{13}C -CPMAS NMR no estado sólido (Aguiar et al., 2013a; de Aquino et al., 2019). A quantidade elevada de grupamentos carboxílicos foi observada tanto por NMR (Figura 1) como pelas curvas de titulação potenciométrica (Figura 2) revelando a presença de comportamento típico de polieletrólito de ácido fraco dos ácidos

húmicos quando em solução. O conteúdo de grupos COOH encontrado foi dentro da faixa normalmente encontrada para ácidos húmicos isolados de vermicomposto (Masini et al., 1998; Landgraf et al., 1999). Na faixa de pH do meio de crescimento das plantas (5,8) é possível indicar a presença de formas não dissociadas de grupamentos COOH (Quadro 3).

A suspensão de ácidos húmicos nas concentrações de 8 e 16 mM de C L⁻¹ promoveu o incremento na biomassa radicular das plântulas de milho em relação ao controle (Figura 3). Embora a aplicação de SH possa estimular o crescimento e desenvolvimento das plantas, o efeito de estimulação pelos ácidos húmicos depende da concentração, da fonte de isolamento, do tipo e da idade da planta (Nardi et al., 2009). De modo geral, o aumento médio observado na massa seca de raízes em resposta a tratamentos com ácidos húmicos foi de cerca de 20%, independente das condições experimentais, conforme a meta análise realizada por Rose et al. (2014). A faixa de estímulo encontrada para aumento da massa fresca da raiz nesse experimento foi de 50 a 80% (Figura 3) em relação ao controle. A atividade de promoção do crescimento radicular de milho pelos ácidos húmicos foi relacionada com a promoção da atividade das bombas de prótons membranares e com a teoria do crescimento ácido (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007). A expressão diferencial dos genes ZmMHA2 que codificam a síntese da H⁺-ATPase de membrana plasmática bem como a atividade hidrolítica dessa enzima foi realizada previamente a este trabalho e os dados podem ser encontrados no anexo 1. O abaixamento significativo do pH do meio de crescimento (Figura 5) nos tratamentos com ácidos húmicos é uma evidência indireta do acionamento das bombas de prótons uma vez que essa correlação já foi obtida experimentalmente (Aguar et al., 2013b).

A promoção do crescimento associada ao uso de baixas concentrações de ácido acético podem ser atribuídos à ativação da via de sinalização do ácido jasmônico que além da promoção do crescimento conferiu tolerância à seca em diferentes tipos de plantas incluindo milho (Kim et al., 2007). Aplicações exógenas de ácido salicílico ou similares têm sido sempre relacionadas com a estimulação do mecanismo de defesa das plantas (Campos et al., 2004). Altas concentrações de ácidos orgânicos reduziram o crescimento radicular entre 20 e 26% em relação ao controle (Figura 3 B e C). Concentrações de ácido acético acima de 4 mM e de

ácido salicílico acima de 1,2 mM levaram a morte das plântulas (dados não apresentados).

O principal efeito de curto prazo dos ácidos orgânicos nas células é o decréscimo do pH do citoplasma pela dissociação de grupos COOH. O decréscimo do pH do citoplasma com a adição de ácidos orgânicos de cadeia curta foi monitorado pela sonda BCECF AM em outros estudos bem como com o uso de microelétrodos (Felle, 1987; Frachisse et al., 1998). Os ácidos húmicos na concentração de 8 mM C L⁻¹ promoveram uma acentuada acidificação do citoplasma em relação ao controle (Figura 5). Em concentração mais elevada a acidificação foi menor como revelado pela maior fluorescência da sonda. Com os ácidos orgânicos de cadeia curta foi observado um efeito contrário, ou seja, em menores concentrações (a de estímulo de crescimento) foi observado um pH mais elevado do citoplasma indicado pela preservação da fluorescência da sonda e em altas concentrações (promoção de estresse e redução do crescimento celular) foi observada a acidificação significativa do citoplasma uma vez que a sonda é específica para citoplasma (Horn et al., 1992).

De acordo com Felle e Johannes (1990) ácidos orgânicos lipofílicos entram na célula somente na forma não dissociada e a sua concentração exógena determina a magnitude da mudança do pH intracelular. Além disso, foi observado um efeito transiente da acidificação, uma vez que a capacidade tampão celular é acionada. No presente trabalho foram observadas mudanças permanentes no pH citosólico uma vez que as observações com a sonda foram realizadas com sete dias de exposição aos tratamentos e 30 min de incubação com a sonda e 24h de fixação (ver material e métodos). Curiosamente, Frachisse e colaboradores (1998) observaram um efeito de longo prazo na acidificação do citoplasma por ácidos graxos em comparação com o efeito mais transitório proporcionado pela exposição das plantas ao ácido propiônico. Nebbioso e Piccolo (2009) demonstraram que a maior quantidade de grupos COOH das substâncias húmicas foi encontrada em cadeias saturadas e insaturadas de ácidos graxos.

É possível fazer muitas interpretações sobre o significado da importância fisiológica da acidificação intracelular. Hagendoorn et al. (1994) mostraram a correlação entre a ativação do metabolismo secundário e o abaixamento do pH do citoplasma em diferentes espécies de plantas, evidenciando que a acidificação do

pH do citoplasma não é uma condição necessária para o estímulo do metabolismo secundário e sim uma consequência do aumento da concentração dos compostos fenólicos. Pelagio-Flores et al. (2017) mostraram que a inoculação de plantas com *Trichoderma* promoveu a acidificação do citoplasma e o acúmulo de antocianinas aumentando o mecanismo de proteção das plantas contra estresse biótico. A acumulação de compostos fenólicos em plantas tratadas com substâncias húmicas foi previamente descrita por Schiavon et al. (2010). Esses autores também observaram aumento da atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) a enzima que catalisa o primeiro passo da conversão da fenilalanina até ácido trans-cinâmico. Ácidos húmicos isolados de vermicomposto também induziram a atividade da PAL em plântulas de alface e tomate (Hernandez et al., 2015; Olivares et al., 2015). A expressão diferencial da ZmPAL em plântulas de milho tratadas com 4 mM CL⁻¹ dos ácidos húmicos utilizados nesse trabalho foi determinada previamente e o resultado pode ser observado no anexo 2.

Mudanças no pH do citoplasma podem ocorrer devido a uma ampla variedade de estímulos incluindo hormônios vegetais (Felle, 1988; Gehring et al., 1994; Beffagna et al., 1995), agentes químicos orgânicos e inorgânicos incluindo glicoproteínas, oligossacarídeos, sulfidrilas (Mathieu et al., 1996) hidrocarbonetos poli aromáticos (Zhan et al., 2015). Mathieu et al. (1996) demonstraram que a acidificação celular foi controlada por proteínas de fosforilação incluindo as H⁺-ATPases (Vera-Estrella et al., 1994). Um dos eventos mais estudados sobre os efeitos fisiológicos das substâncias húmicas é a promoção da atividade das bombas de prótons que modulam o ambiente eletroquímico celular (Zandonadi et al., 2007). Além disso, os prótons foram descritos por Felle (2001) como mensageiros celulares importantes na transdução da cadeia de sinalização para ativação de genes de defesa em plantas.

O abaixamento do pH do citoplasma pode ser um componente da rede de sinalização e interagir com outros mensageiros secundários e mudar a concentração de Ca²⁺ no citosol e o potencial de membrana (Mathieu et al., 1996). O pulso de aumento de Ca²⁺ no citoplasma em plântulas de arroz tratadas com ácidos húmicos isolados de vermicomposto foi observado anteriormente por Ramos et al. (2015) usando a microsonda eletrônica vibrátil (SIET). O início da transdução de sinal inclui mudanças fisiológicas como o aumento de Ca²⁺ no citoplasma e

utiliza a via de fosforilação. As proteínas de fosforilação e desfosforilação são a mais ativa modificação pós-translacional que causa a ativação e a inativação de proteínas e seus processos (van Bentem e Hirt, 2007). A fosforilação de proteínas tem um papel central na sinalização celular e as proteínas quinases e as fosfatases catalisam a fosforilação e a desfosforilação de substratos específicos, respectivamente.

As proteínas quinases regulam múltiplos processos nas plantas incluindo metabolismo, ciclo celular, respostas hormonais e diferentes estresses (Crozet et al., 2014). A proteína quinase SNF1 é considerada um elemento crucial na regulação da resposta ao estresse, já que modula a transcrição, o metabolismo e o desenvolvimento e a sobrevivência por meio do controle do balanço energético da célula (Polge e Thomas, 2007). O nível de transcrição da SnR K2.2 foi maior nas plântulas tratadas com os ácidos húmicos e os ácidos orgânicos (Figura 7A). Foi mostrado anteriormente que ácidos húmicos aumentam a atividade e expressão das proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK) (Ramos et al., 2015). Além disso, foi observado que ácidos húmicos promoveram o aumento da expressão da TOR quinase (Canellas et al., 2019) o complexo que regula o nível de açúcares e aminoácidos necessários para a proliferação celular (Robaglia et al. 2012). As proteínas SnRK são um integrador central do nível energético e das respostas contra estresse, pois modulam mais de 1000 genes através da fosforilação de vários fatores de transcrição incluindo muitos fatores de transcrição do tipo WRKY (Baena-González et al., 2007).

A rede de transdução de sinal em resposta aos estresses abióticos é muito complicada, mas há um certo consenso de que os fatores de transcrição podem interagir com as proteínas quinases em uma resposta de via simples (Lan Thi Hoang et al., 2017). O genoma das plantas tem um grande número de fatores de transcrição pertencentes a grandes famílias multigênicas, tais como, NAC, bZip e WRKY. Os fatores de transcrição WRKY são proteínas que se ligam ao DNA e têm papel central nos mecanismos de defesa da planta e nas respostas contra estresses abióticos, mas também contribuem para o controle do desenvolvimento das plantas (Zhou et al., 2008) e do metabolismo secundário (Westphal et al., 2019). O fator de transcrição WRKY33 foi regulado positivamente no transcriptoma de plantas com acidificação do apoplasto (Lager et al., 2010) e do citoplasma

(Westphal et al., 2019). Foi demonstrado previamente que o WRKY23 foi necessário para o crescimento apropriado da raiz e responsável pela estimulação da biossíntese localizada de flavonóis, ou seja, de polifenóis que regulam o transporte de auxina (Grunewald et al., 2012). De acordo com esses autores, a expressão do WRKY23 é controlada pela auxina através de um fator de resposta à auxina (ARF7 e ARF9). O fator de transcrição ZmWRKY33 pertencente ao grupo WRKY I teve a expressão modificada em resposta a diferentes tipos de estresses abióticos (Li et al., 2013), incluindo deficiência nutricional (Devaiah et al., 2007). O fator de transcrição WRKY75 foi o primeiro membro da família envolvido na resposta da deficiência de fósforo incluindo a promoção da síntese de transportadores de fosfato de alta afinidade e emergência de raízes laterais. Ácidos húmicos foram capazes de induzir a expressão de transportadores de fosfato de alta afinidade mesmo em condições de concentração elevada de fosfato no meio de crescimento (Jindo et al., 2016). A ativação de transportadores de fosfato de alta afinidade por fatores de transcrição WRKY45 também foi mostrada por Wang et al. (2014). Vários tipos de fatores de transcrição WRKY tiveram expressão elevada em relação ao controle nas raízes de plântulas de milho tratadas com ácidos húmicos (Figura 8). A análise da expressão diferencial por RT qPCR ainda está em processamento.

A regulação de genes mediada por pH inclui vários tipos de genes incluindo aqueles em resposta a estresses bióticos e abióticos e defesa associada a hormônios. Estes incluem o ácido salicílico que é um sinalizador central na resposta contra patógenos (Lager et al., 2010). O ácido salicílico e o abscísico estão intimamente conectados com a defesa da planta e na tolerância ao estresse abiótico, respectivamente, e várias pesquisas têm focado essas cascatas de sinalização na regulação dos fatores de transcrição WRKY (Rushton et al., 2012). Os fatores de transcrição WRKY podem regular a biossíntese de compostos da via do ácido chiquímico (Naoumkina et al., 2008; Guillaumie et al., 2010) aumentando a produção de flavonoides, ligninas (Besseau et al., 2007). Essa interação foi reforçada pelos resultados que demonstraram que o estresse osmótico pode induzir a síntese de proteínas quinases mediadas por ácido salicílico (Mikołajczyk et al., 2000). O efeito dos ácidos húmicos sobre a via do ácido chiquímico é bem conhecido e foi mencionado anteriormente.

Finalmente, os mecanismos que contribuem para a regulação do pH celular nas plantas podem ser simplificados em dois tipos. O mecanismo baseado na regulação metabólica, i.e., pH bioquímico é um componente crítico da regulação do pH do citoplasma. Compostos do metabolismo bioquímico são liberados para atuar como tampão celular. Entre eles se encontram aqueles capazes de produzir reações de carboxilação e descarboxilação como o malato (Felle, 2001). O nível elevado da expressão gênica da enzima malato desidrogenase foi observado em todos os tratamentos (Figura 7B). O controle do pH pode ser exercido pela carboxilação (consumo de OH), que é estimulada em pH elevado e descarboxilação (produção de OH) em pH baixo. A enzima málica realiza esse processo. O segundo componente da regulação do pH é biofísico e relacionado com o transporte transmembranar de H⁺ entre o apoplasto, citoplasma e o vacúolo. Esse transporte é facilitado pela atividade das bombas (V, P H⁺-ATPase e pirofosfatase) que são coordenadamente moduladas por ácidos húmicos (Zandonadi et al., 2007).

7. CONCLUSÕES

Os ácidos húmicos da mesma forma que os ácidos orgânicos (acético e salicílico) induzem uma resposta similar à resposta de estresse por ácido fraco. Os ácidos húmicos promoveram a acidificação do pH do citoplasma como demonstrado com o uso da sonda BCECF AM sugerindo que este abaixamento do pH possa estar relacionado com a cascata de sinalização uma vez que a proteína quinase SnRK2.2 teve seu nível de transcrição elevado em todos os tratamentos. Os fatores de transcrição WRKY foram também encontrados em nível significativamente maior que o controle em todos os tratamentos. Esses fatores de transcrição foram acionados em resposta ao estresse de ácido fraco demonstrado por outros autores. Como esperado, a expressão da enzima MDH relacionada atividade da malato desidrogenase foi encontrada em nível mais elevado do que o controle em todos os tratamentos já que a regulação do pH intracelular envolve um componente bioquímico, além das bombas de H^+ , relacionado à regulação de múltiplos processos nas plantas incluindo metabolismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agathokleous, E., Kitao, M., & Calabrese, E. J. (2019) Hormesis: a compelling platform for sophisticated plant science. *Trends in plant science*, 24(4), 318-327.
- Aguiar, N. D. O., Canellas, L. P., Dobbss, L. B., Zandonadi, D. B., Olivares, F. L., & Façanha, A. R. (2009) Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33(6), 1613-1623.
- Aguiar, N. O., Novotny, E. H., Oliveira, A. L., Rumjanek, V. M., Olivares, F. L., & Canellas, L. P. (2013a) Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 95-102.
- Aguiar, N. O., Olivares, F. L., Novotny, E. H., Dobbss, L. B., Balmori, D. M., Santos-Júnior, L. G., & Canellas, L. P. (2013b). Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant and soil*, 362(1), 161-174.
- Albergoni, L., & Pelaez, V. (2007) Da revolução verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas? *Revista de Economia*, 33(1).
- Armstrong, J., & Armstrong, W. (2001) Rice and Phragmites: effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. *American Journal of Botany*, 88(8), 1359-1370.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448(7156), 938-942.
- Baldotto, M. A., & Baldotto, L. E. B. (2014) Ácidos húmicos. *Revista Ceres*, 61, 856-881.

- Baldotto, M. A., Muniz, R. C., Baldotto, L. E. B., & Dobbss, L. B. (2011) Root growth of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. treated with humic acids isolated from typical soils of Rio de Janeiro state, Brazil. *Revista Ceres*, 58(4), 504-511.
- Beardsell, M. F., & Cohen, D. (1975) Relationships between leaf water status, abscisic acid levels, and stomatal resistance in maize and sorghum. *Plant Physiology*, 56(2), 207-212.
- Beffagna, N., Romani, G., & Gatti, L. (1995) Changes in chloride fluxes and cytosolic pH induced by abscisic acid in *Elodea densa* leaves. *Botanica Acta*, 108(2), 74-79.
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., & Legrand, M. (2007) Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *The Plant Cell*, 19(1), 148-162.
- Bin, A. (2004) *Agricultura e meio ambiente: contexto e iniciativas da pesquisa pública*.
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., & Laurière, C. (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41758-41766.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº30, de 12 de novembro de 2010. Estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, 17 nov. 2010. Seção 1, p.4-10.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº24, de 20 de junho de 2007. Métodos reconhecidos para determinação de metais pesados tóxicos em fertilizantes, corretivos agrícolas, condicionadores de solo e substratos para plantas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, 21 jun. 2007. Seção 1, p.23.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014) Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and soil*, 383(1), 3-41.
- Campos, Â. D., Ferreira, A. G., Hampe, M. M. V., Antunes, I. F., Brancão, N., Silveira, E. P. D., & Augustin, E. (2004) Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(7), 637-643.
- Canellas, L. P., & Olivares, F. L. (2014) Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1(1), 1-11.

- Canellas, L. P., Canellas, N. O., Irineu, L. E. S. D. S., Olivares, F. L., & Piccolo, A. (2020) Plant chemical priming by humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 7(1), 1-17.
- Canellas, L. P., Canellas, N. O., Soares, T. S., & Olivares, F. L. (2019) Humic acids interfere with nutrient sensing in plants owing to the differential expression of TOR. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(1), 216-224.
- Canellas, L. P., Dantas, D. J., Aguiar, N. O., Peres, L. E. P., Zsögön, A., Olivares, F. L., Dobbss, L. B., Façanha, A. R., & Piccolo, A. (2011) Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *Annals of Applied Biology*, 159(2), 202-211.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Okorokova-Façanha, A. L., & Façanha, A. R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant physiology*, 130(4), 1951-1957.
- Canellas, L. P., Zandonadi, D. B., Médice, L. O., OLIVARES, F., & FAÇANHA, A. (2005) Bioatividade de substâncias húmicas: ação sobre o metabolismo e desenvolvimento das plantas. CANELLAS, LP; SANTOS, GA *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacases, 224-243.
- Chen, Y., & Aviad, T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. *Humic substances in soil and crop sciences: selected readings*. Madison: Soil Science Society of America.
- Colombo, C., Palumbo, G., Angelico, R., Cho, H. G., Francioso, O., Ertani, A., & Nardi, S. (2015) Spontaneous aggregation of humic acid observed with AFM at different pH. *Chemosphere*, 138, 821-828.
- Criollo, H., Lagos, T., Piarpuezan, E., & Pérez, R. (2011) The effect of three liquid bio-fertilizers in the production of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Agronomía Colombiana*, 29(3), 415-421.
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., & Baena-González, E. (2014) Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Frontiers in plant science*, 5, 190.
- Da Silva, S. F., Olivares, F. L., & Canellas, L. P. (2017) The biostimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 1-6.
- de Aquino, A. M., Canellas, L. P., da Silva, A. P., Canellas, N. O., da S Lima, L., Olivares, F. L., Piccolo, A., & Spaccini, R. (2019) Evaluation of molecular

properties of humic acids from vermicompost by ^{13}C -CPMAS-NMR spectroscopy and thermochemolysis–GC–MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 141, 104634.

de Zelicourt, A., Colcombet, J., & Hirt, H. (2016) The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling. *Trends in plant science*, 21(8), 677-685.

Devaiah, B. N., Karthikeyan, A. S., & Raghothama, K. G. (2007) WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 143(4), 1789-1801.

Dobbss, L. B., Pasqualoto Canellas, L., Lopes Olivares, F., Oliveira Aguiar, N., Peres, L. E. P., Azevedo, M., Spaccini, R., Piccolo, A., & Facanha, A. R. (2010) Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3681-3688.

dos Santos Soares, A. M., & Machado, O. L. T. (2007) Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas*, 1(1), 10.

Façanha, A. R., Façanha, A. L. O., Olivares, F. L., Guridi, F., Santos, G. D. A., Velloso, A. C. X., Rumjanek, V. M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz-Filho, R., de Oliveira, M. A., & Canellas, L. P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37(9), 1301-1310.

Felício, M. J. (2011) Contribuição ao debate paradigmático da questão agrária e do capitalismo agrário.

Felle, H. (1987) Proton transport and pH control in *Sinapis alba* root hairs: a study carried out with double-barrelled pH micro-electrodes. *Journal of Experimental Botany*, 38(2), 340-354.

Felle, H. (1988) Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta*, 174(4), 495-499.

Felle, H. H. (2001) pH: signal and messenger in plant cells. *Plant biology*, 3(6), 577-591.

Felle, H., & Johannes, E. (1990) The regulation of proton/amino acid symport in *Riccia fluitans* L. by cytosolic pH and proton pump activity. *Journal of experimental botany*, 41(5), 587-592.

Frachisse, J. M., Johannes, E., & Felle, H. (1988) The use of weak acids as physiological tools: a study of the effects of fatty acids on intracellular pH and electrical plasmalemma properties of *Riccia fluitans* rhizoid cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 938(2), 199-210.

- García, A. C., Izquierdo, F. G., & Berbara, R. L. L. (2014b) Effects of humic materials on plant metabolism and agricultural productivity. In *Emerging technologies and Management of crop stress tolerance* (pp. 449-466). Academic Press.
- García, A. C., Santos, L. A., Izquierdo, F. G., Rumjanek, V. M., Castro, R. N., dos Santos, F. S., de Souza, L. G. A., & Berbara, R. L. L. (2014a) Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Journal of Geochemical Exploration*, 136, 48-54.
- Gehring, C. A., Irving, H. R., & Parish, R. W. (1994) Gibberellic acid induces cytoplasmic acidification in maize coleoptiles. *Planta*, 194(4), 532-540.
- Goodman, D., Sorj, B., & Wilkinson, J. (2008) Da lavoura às biotecnologias: agricultura e indústria no sistema internacional.
- Grandis, A., Godoi, S., & Buckeridge, M. S. (2010) Respostas fisiológicas de plantas amazônicas de regiões alagadas às mudanças climáticas globais. *Brazilian Journal of Botany*, 33(1), 1-12.
- Grunewald, W., De Smet, I., Lewis, D. R., Löffke, C., Jansen, L., Goeminne, G., Beeckman, T. (2012) Transcription factor WRKY23 assists auxin distribution patterns during *Arabidopsis* root development through local control on flavonol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1554-1559.
- Guillaumie, S., Mzid, R., Méchin, V., Léon, C., Hichri, I., Destrac-Irvine, A., Trossat-Magnin, C., Delrot, S., & Lauvergeat, V. (2010) The grapevine transcription factor WRKY2 influences the lignin pathway and xylem development in tobacco. *Plant molecular biology*, 72(1-2), 215.
- Guo, Z. P., & Olsson, L. (2016) Physiological responses to acid stress by *Saccharomyces cerevisiae* when applying high initial cell density. *FEMS yeast research*, 16(7).
- Hagendoorn, M. J., Wagner, A. M., Segers, G., van der Plas, L. H., Oostdam, A., & van Walraven, H. S. (1994) Cytoplasmic acidification and secondary metabolite production in different plant cell suspensions (a comparative study). *Plant physiology*, 106(2), 723-730.
- Hernandez, O. L., Calderín, A., Huelva, R., Martínez-Balmori, D., Guridi, F., Aguiar, N. O., Olivares, F. L., & Canellas, L. P. (2015) Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy for sustainable development*, 35(1), 225-232.
- Horn, M. A., Meadows, R. P., Apostol, I., Jones, C. R., Gorenstein, D. G., Heinstein, P. F., & Low, P. S. (1992) Effect of elicitation and changes in extracellular pH on

- the cytoplasmic and vacuolar pH of suspension-cultured soybean cells. *Plant physiology*, 98(2), 680-686.
- Horváth, E., Szalai, G., & Janda, T. (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), 290-300.
- Hu, Y., Dong, Q., & Yu, D. (2012) Arabidopsis WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Science*, 185, 288-297.
- Jindo, K., Martim, S. A., Navarro, E. C., Pérez-Alfocea, F., Hernandez, T., Garcia, C., & Canellas, L. P. (2012) Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant and Soil*, 353(1), 209-220.
- Jindo, K., Soares, T. S., Peres, L. E. P., Azevedo, I. G., Aguiar, N. O., Mazzei, P., & Canellas, L. P. (2016) Phosphorus speciation and high-affinity transporters are influenced by humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 179(2), 206-214.
- Kang, G., Li, G., & Guo, T. (2014) Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(9), 2287-2297.
- Kim, J. M., To, T. K., Matsui, A., Tanoi, K., Kobayashi, N. I., Matsuda, F., & Seki, M. (2017) Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nature Plants*, 3(7), 1-7.
- Kononova, M. M. (1961) Soil organic matter, its nature, its role in soil formation and in soil fertility. *Soil organic matter, its nature, its role in soil formation and in soil fertility*.
- Kopp, M. M., Luz, V. K. D., Coimbra, J. L. M., Sousa, R. O. D., Carvalho, F. I. F. D., & Oliveira, A. C. D. (2007) Níveis críticos dos ácidos acético, propiônico e butírico para estudos de toxicidade em arroz em solução nutritiva. *Acta Botanica Brasílica*, 21(1), 147-154.
- Kren, A., Mamnun, Y. M., Bauer, B. E., Schüller, C., Wolfger, H., Hatzixanthis, K., & Kuchler, K. (2003) War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Molecular and cellular biology*, 23(5), 1775-1785.
- Lager, I. D. A., Andréasson, O., Dunbar, T. L., Andreasson, E., Escobar, M. A., & Rasmusson, A. G. (2010) Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. *Plant, cell & environment*, 33(9), 1513-1528.

- Lan Thi Hoang, X., Du Nhi, N. H., Binh Anh Thu, N., Phuong Thao, N., & Phan Tran, L. S. (2017) Transcription factors and their roles in signal transduction in plants under abiotic stresses. *Current genomics*, 18(6), 483-497.
- Landgraf, M. D., Alves, M. R., Silva, S. C. D., & Rezende, M. O. D. O. (1999) Caracterização de ácidos húmicos de vermicomposto de esterco bovino compostado durante 3 e 6 meses. *Química Nova*, 22(4), 483-486.
- Leung, J., Valon, C., Moreau, B., Boeglin, M., Lefoulon, C., Joshi-Saha, A., & Chérel, I. (2012) Mécanisme moléculaire d'action de l'acide abscissique en réponse à la sécheresse chez les végétaux. *Biologie aujourd'hui*, 206(4), 301-312.
- Li, H., Gao, Y., Xu, H., Dai, Y., Deng, D., & Chen, J. (2013) ZmWRKY33, a WRKY maize transcription factor conferring enhanced salt stress tolerances in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation*, 70(3), 207-216.
- Malik, K. A., & Azam, F. (1985) Effect of humic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling growth. *Environmental and Experimental Botany*, 25(3), 245-252.
- Masini, J. C., Abate, G., Lima, E. C., Hahn, L. C., Nakamura, M. S., Lichtig, J., & Nagatomy, H. R. (1998) Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. *Analytica Chimica Acta*, 364(1-3), 223-233.
- Mathieu, Y., Lapous, D., Thomine, S., Laurière, C., & Guern, J. (1996) Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta*, 199(3), 416-424.
- Mazoyer, M., & Roudart, L. (2006) A history of world agriculture: from the neolithic age to the current crisis. NYU Press.
- Mikołajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszyńska, G., Klessig, D. F., & Dobrowolska, G. (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *The Plant Cell*, 12(1), 165-178.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreno, A. M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M., & García-Mina, J. M. (2010) Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of plant physiology*, 167(8), 633-642.
- Mora, V., Baigorri, R., Bacaicoa, E., Zamarreno, A. M., & García-Mina, J. M. (2012) 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*, 76, 24-32.

- Muscolo, A., & Nardi, S. (1997) Auxin or auxin-like activity of humic matter. The role of humic substances in the ecosystems and environmental protection. Wroclaw, Polish Society of Humic Substances, 987-992.
- Muscolo, A., Cutrupi, S., & Nardi, S. (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biology & Biochemistry*, 30(8-9), 1199-1201.
- Nannipieri, P., Muccini, L., & Ciardi, C. (1983) Microbial biomass and enzyme activities: production and persistence. *Soil biology and biochemistry*, 15(6), 679-685.
- Naoumkina, M. A., He, X., & Dixon, R. A. (2008) Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula*. *BMC plant biology*, 8(1), 1-14.
- Nardi, S., Arnoldi, G., & Dell'Agnola, G. (1988) Release of the hormone-like activities from *Allolobophora rosea* (Sav.) and *Allolobophora caliginosa* (Sav.) feces. *Canadian Journal of Soil Science*, 68(3), 563-567.
- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., & Muscolo, A. (2009) Biological activities of humic substances. *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*, 2(part 1), 305-339.
- Nardi, S., Concheri, G., Dell'Agnola, G., & Scrimin, P. (1991) Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(9), 833-836.
- Nardi, S., Ertani, A., & Francioso, O. (2017) Soil–root cross-talking: The role of humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180(1), 5-13.
- Nardi, S., Muscolo, A., Vaccaro, S., Baiano, S., Spaccini, R., & Piccolo, A. (2007) Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(12), 3138-3146.
- Nardi, S., Panuccio, M. R., Abenavoli, M. R., & Muscolo, A. (1994) Auxin-like effect of humic substances extracted from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(10), 1341-1346.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., & Ertani, A. (2018) Hormone-like activity of the soil organic matter. *Applied Soil Ecology*, 123, 517-520.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., & Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1527-1536.

- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., & Ertani, A. (2016) Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, 73(1), 18-23.
- Nebbio, A., & Piccolo, A. (2009) Molecular rigidity and diffusivity of Al³⁺ and Ca²⁺ humates as revealed by NMR spectroscopy. *Environmental science & technology*, 43(7), 2417-2424.
- Olaetxea, M., De Hita, D., Garcia, C. A., Fuentes, M., Baigorri, R., Mora, V., & Garcia-Mina, J. M. (2018) Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root-and shoot-growth. *Applied Soil Ecology*, 123, 521-537.
- Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Rosa, R. C. C., & Canellas, L. P. (2015) Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 183, 100-108.
- Olivares, F. L., Busato, J. G., De Paula, A. M., da Silva Lima, L., Aguiar, N. O., & Canellas, L. P. (2017) Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and biological technologies in agriculture*, 4(1), 1-13.
- Olk, D. C., Dinnes, D. L., Scoresby, J. R., Callaway, C. R., & Darlington, J. W. (2018) Humic products in agriculture: potential benefits and research challenges—a review. *Journal of Soils and Sediments*, 18(8), 2881-2891.
- Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2017) Trichoderma-induced acidification is an early trigger for changes in Arabidopsis root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in plant science*, 8, 822.
- Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science.
- Piccolo, A., Nardi, S., & Concheri, G. (1992) Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(4), 373-380.
- Piccolo, A., Spaccini, R., Drosos, M., Vinci, G., & Cozzolino, V. (2018) The molecular composition of humus carbon: recalcitrance and reactivity in soils. In *The future of soil carbon* (pp. 87-124). Academic Press.
- Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S., & Varanini, Z. (1999) Modulation of NO₃-uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H⁺ ATPase. *Plant and soil*, 215(2), 155-161.

- Pizzeghello, D., Francioso, O., Ertani, A., Muscolo, A., & Nardi, S. (2013) Isopentenyladenosine and cytokinin-like activity of different humic substances. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 70-75.
- Pizzeghello, D., Nicolini, G., & Nardi, S. (2001) Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvaticae* forests. *New Phytologist*, 151(3), 647-657.
- Pizzeghello, D., Nicolini, G., & Nardi, S. (2002) Hormone-like activities of humic substances in different forest ecosystems. *New Phytologist*, 155(3), 393-402.
- Polge, C., & Thomas, M. (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends in plant science*, 12(1), 20-28.
- Ramos, A. C., Dobbss, L. B., Santos, L. A., Fernandes, M. S., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., & Canellas, L. P. (2015) 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*, 2(1), 1-12.
- Rao, M. V., Paliyath, G., Ormrod, D. P., Murr, D. P., & Watkins, C. B. (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂). *Plant Physiology*, 115(1), 137-149.
- Robaglia, C., Thomas, M., & Meyer, C. (2012) Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Current opinion in plant biology*, 15(3), 301-307.
- Rose, M. T., Patti, A. F., Little, K. R., Brown, A. L., Jackson, W. R., & Cavagnaro, T. R. (2014) A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in agronomy*, 124, 37-89.
- Rushton, D. L., Tripathi, P., Rabara, R. C., Lin, J., Ringler, P., Boken, A. K., Langum, T. J., Smidt, L., Boomsma, D. D., Emme, N. J., Chen, X., Finer, Q. J., & Rushton, P. J. (2012) WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant biotechnology journal*, 10(1), 2-11.
- Sambrook J and Russel DW (2001) Rapid isolation of yeast DNA. In: *Molecular cloning, a laboratory manual* (Sambrook J and Russel DW, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 631-632
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., & Nardi, S. (2010) High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of chemical ecology*, 36(6), 662-669.
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., & Dixon, K. (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*, 30(2), 157-161.

- Shim, J. S., Jung, C., Lee, S., Min, K., Lee, Y. W., Choi, Y., & Choi, Y. D. (2013) A t MYB 44 regulates WRKY 70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *The Plant Journal*, 73(3), 483-495.
- Singh, B., & Usha, K. (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, 39(2), 137-141.
- Spaccini, R., Mbagwu, J. S. C., Igwe, C. A., Conte, P., & Piccolo, A. (2004) Carbohydrates and aggregation in lowland soils of Nigeria as influenced by organic inputs. *Soil and Tillage Research*, 75(2), 161-172.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Conte, P., Haberhauer, G., & Gerzabek, M. H. (2002) Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(12), 1839-1851.
- Taiz, L., Zeiger, E., & Maffei, M. (2013) *Elementi di fisiologia vegetale*. Piccin.
- Tanaka, M. T., Sengik, E., da Silva Santos, H., Júnior, C. H., Scapim, C. A., Kvitschal, M. V., & Arquez, I. C. (2003) Efeito da aplicação foliar de biofertilizantes, bioestimulantes e micronutrientes na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 25(2), 315-321.
- Tejada, M., & Gonzalez, J. (2003) Effects of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on maize yield. *Agronomie*, 23(7), 617-623.
- Theron, M. M., & Lues, J. R. (2010) *Organic acids and food preservation*. CRC press.
- Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., & Nardi, S. (2010b) Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. *Plant signaling & behavior*, 5(6), 635-643.
- Trevisan, S., Pizzeghello, D., Ruperti, B., Francioso, O., Sassi, A., Palme, K., Quaggiotti, S. & Nardi, S. (2010a) Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 12(4), 604-614.
- van Bentem, S. D. L. F., & Hirt, H. (2007) Using phosphoproteomics to reveal signalling dynamics in plants. *Trends in plant science*, 12(9), 404-411.
- Vasconcelos, A. C. F. D., Zhang, X., Ervin, E. H., & Kiehl, J. D. C. (2009) Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. *Scientia Agricola*, 66(3), 395-402.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Higgins, V. J., & Blumwald, E. (1994) Plant defense response to fungal pathogens (activation of host-plasma membrane H⁺-ATPase

- by elicitor-induced enzyme dephosphorylation). *Plant Physiology*, 104(1), 209-215.
- Vivan, J. L. (1998) *Agricultura e Florestas: princípios de uma interação vital*.
- Wang, H., Xu, Q., Kong, Y. H., Chen, Y., Duan, J. Y., Wu, W. H., & Chen, Y. F. (2014) Arabidopsis WRKY45 transcription factor activates PHOSPHATE TRANSPORTER1; 1 expression in response to phosphate starvation. *Plant physiology*, 164(4), 2020-2029.
- Westphal, L., Strehmel, N., Eschen-Lippold, L., Bauer, N., Westermann, B., Rosahl, S., Scheel, D., & Lee, J. (2019) pH effects on plant calcium fluxes: lessons from acidification-mediated calcium elevation induced by the γ -glutamyl-leucine dipeptide identified from *Phytophthora infestans*. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
- Xiao, J., Gong, S., Zhao, Y., & LeDoux, M. S. (2004) Developmental expression of rat torsinA transcript and protein. *Developmental Brain Research*, 152(1), 47-60.
- Xu, W., Dubos, C., & Lepiniec, L. (2015) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes. *Trends in plant science*, 20(3), 176-185.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends in plant science*, 10(2), 88-94.
- Zandonadi, D. B., Canellas, L. P., & Façanha, A. R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225(6), 1583-1595.
- Zandonadi, D. B., Matos, C. R. R., Castro, R. N., Spaccini, R., Olivares, F. L., & Canellas, L. P. (2019) Alkamides: a new class of plant growth regulators linked to humic acid bioactivity. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6(1), 1-12.
- Zandonadi, D. B., Santos, M. P., Dobbss, L. B., Olivares, F. L., Canellas, L. P., Binzel, M. L., Okorokova-Façanha, A. L., & Façanha, A. R. (2010) Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*, 231(5), 1025-1036.
- Zhan, X., Yi, X., Yue, L., Fan, X., Xu, G., & Xing, B. (2015) Cytoplasmic pH-stat during phenanthrene uptake by wheat roots: a mechanistic consideration. *Environmental science & technology*, 49(10), 6037-6044. n. *Environmental science & technology*, v. 49, n. 10, p. 6037-6044, 2015.
- Zhou, Q. Y., Tian, A. G., Zou, H. F., Xie, Z. M., Lei, G., Huang, J., & Chen, S. Y. (2008) Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13,

GmWRKY21, and GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant biotechnology journal*, 6(5), 486-503.

APÊNDICE

ANEXO I

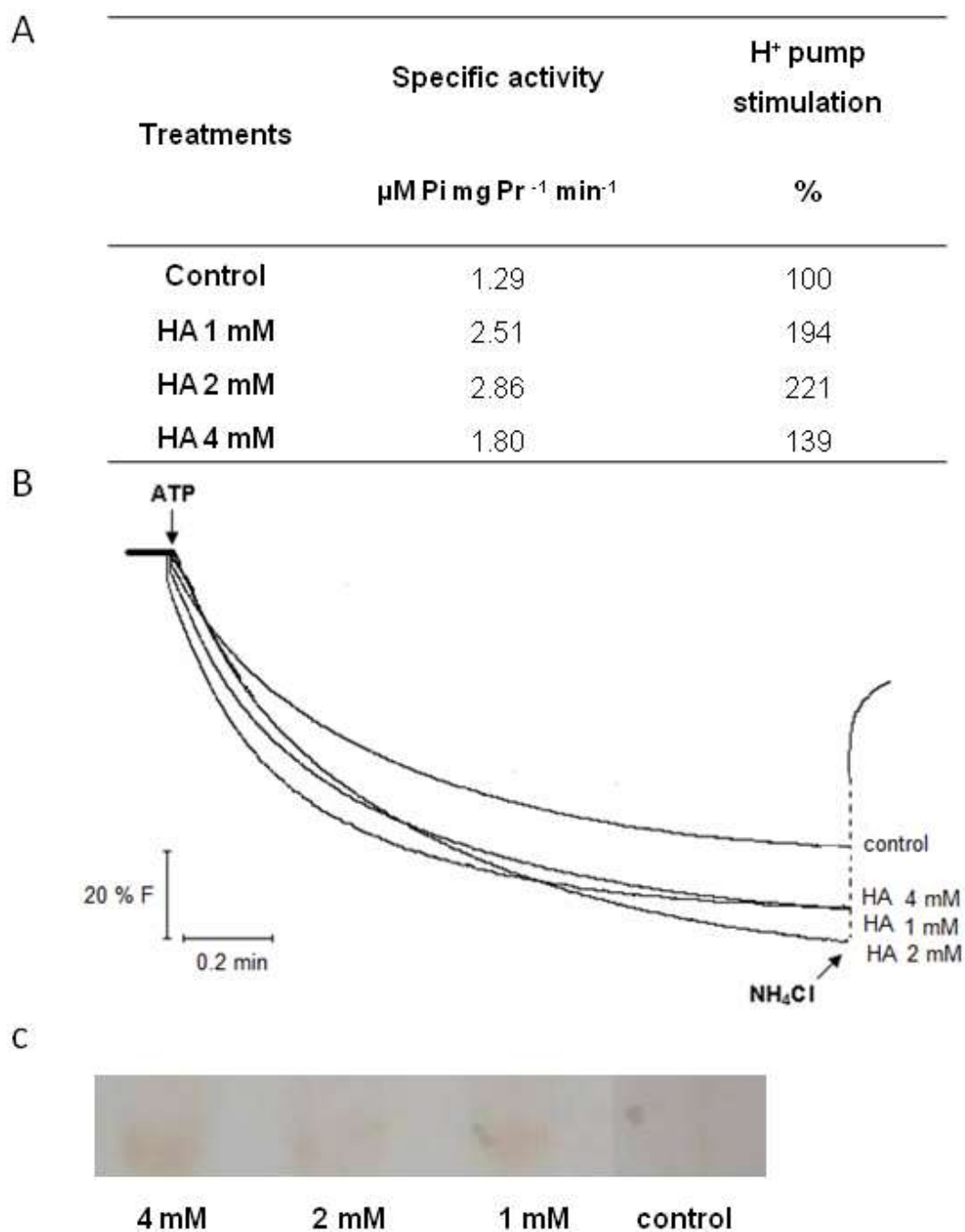


Figura 9. A expressão diferencial dos genes ZmMHA2 que codificam a síntese da H⁺-ATPase de membrana plasmática.

ANEXO II

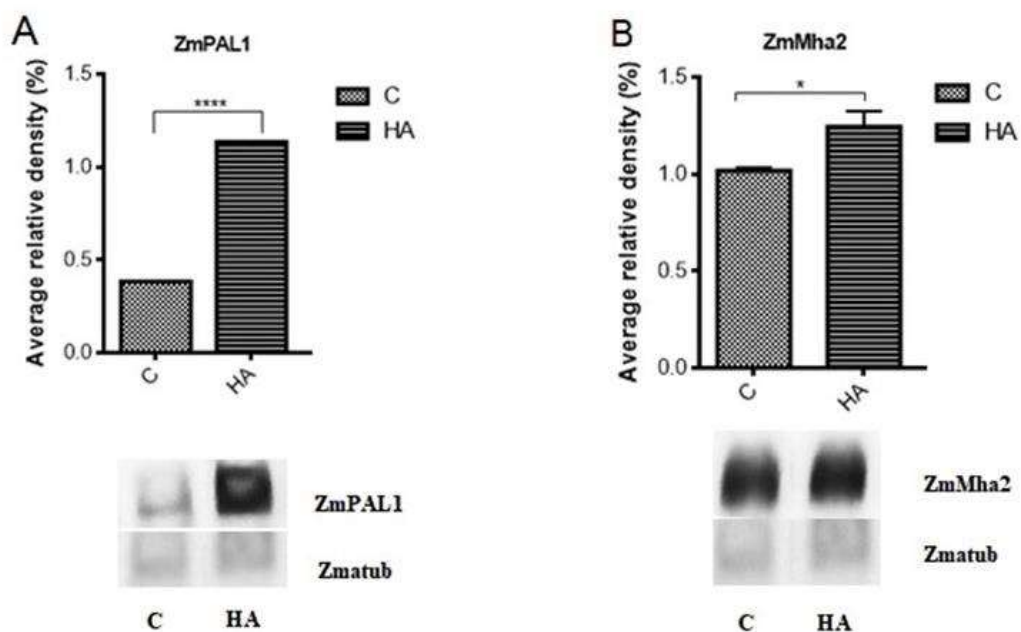


Figura 10. A expressão diferencial da ZmPAL em plântulas de milho tratadas com 4 mM CL⁻¹ de ácidos húmicos de vermicomposto.