

BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS HÚMICOS EM SOLUÇÃO TRATADOS
COM ÁCIDO CÍTRICO

JANAÍNA APARECIDA HOTTZ RIMA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FEVEREIRO DE 2010

BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS HÚMICOS EM SOLUÇÃO TRATADOS
COM ÁCIDO CÍTRICO

JANAÍNA APARECIDA HOTTZ RIMA

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

Orientador: Prof^o Luciano Pasqualoto Canellas

Campos dos Goytacazes - RJ
Fevereiro - 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 071/2010

Rima, Janaína Aparecida Hottz

Bioatividade de ácidos húmicos em solução tratados com ácido cítrico / Janaína Aparecida Hottz Rima. – 2010.
43 f. : il.

Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2010.
Bibliografia: f. 35 – 43.

1. Substância húmica 2. Ácido húmico 3. Ácido cítrico 4. Bioatividade 5. Proteína de membrana plasmática I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 631.417

BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS HÚMICOS EM SOLUÇÃO TRATADOS COM ÁCIDO CÍTRICO

JANAÍNA APARECIDA HOTTZ RIMA

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

Aprovada em 26 de fevereiro de 2010

Comissão Examinadora:

Sílvia Aparecida Martim (D.Sc., Produção Vegetal) - UFRRJ

Jader Galba Busato (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

Raul Castro Carrielo Rosa (D.Sc., Produção Vegetal) - UESB

Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D., Ciência do Solo) – UENF

Orientador

Dedico aos meus pais Damasio Silva Rima e Maria da Gloria Hottz Rima e aos meus irmãos Rosinete Hottz Rima do Vales e Hermes Hottz Rima.

Agradecimentos

A Deus por me dar forças para alcançar meus objetivos;

Aos meus pais por acreditarem em mim;

Ao Prof^o Luciano P. Canellas pela orientação;

Aos professores Cláudio Retamal e Arnaldo Rocha Façanha pela co-orientação;

Aos amigos Sílvia, Joseph e Artur pela ajuda nos experimentos;

A todos do Laboratório de Solos/NUDIBA;

Às minhas amigas Kamilla e Liz pelos momentos de descontração;

Aos amigos Seu Cesi e Dona Lizete pelos bons conselhos;

A UENF pela oportunidade e pelo ensino de boa qualidade.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Substâncias húmicas	4
2.2 Adição de ácidos orgânicos e mudança conformacional das SH.....	5
2.3 Teoria do crescimento ácido	10
2.4 Membrana plasmática	11
2.4.1 H ⁺ - ATPase	12
2.5. Efeito das SH na expressão das proteínas	13
3. HIPÓTESE	16
4. OBJETIVO GERAL	17
4.1 Objetivos específicos.....	17
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1. Obtenção dos ácidos húmicos	18

5.2. Crescimento de plântulas e tratamento com ácido húmico e ácido cítrico.....	19
5.3. Avaliação do crescimento radicular das plântulas de milho	19
5.3.1. Comprimento e área radicular	19
5.3.2 Sítios de mitose	19
5.3.3 Delineamento experimental e análise estatística	20
5.4 Ensaio bioquímico	20
5.4.1 Preparação da fração microsomal.....	20
5.4.2 Partição de fase	20
5.4.3 Determinação da concentração de proteínas.....	21
5.4.4 Avaliação da atividade das H ⁺ -ATPases de MP	21
5.5 Avaliação qualitativa do padrão diferencial de proteínas	22
5.5.1 Determinações eletroforéticas por SDS-PAGE	22
5.5.2 Determinações eletroforéticas por 2D-PAGE	22
5.5.3 Delineamento experimental e análise estatística	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6.1 Bioatividade dos AH em solução com AC	24
6.2 Atividade da H ⁺ -ATPase.....	27
6.3 Avaliação qualitativa do padrão diferencial de proteínas	28
7. RESUMO E CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

RIMA, Janaína, A. H. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2010. BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS HÚMICOS EM SOLUÇÃO TRATADOS COM ÁCIDO CÍTRICO. Orientador: Prof^o. Luciano Pasqualoto Canellas

A promoção do crescimento vegetal por ácidos húmicos (AH) tem sido atribuída à ação do tipo hormonal capaz de promover o desenvolvimento e proliferação das raízes, resultando em uma absorção mais eficiente de água e nutrientes. Atualmente se busca entender como os AH isolados de vermicomposto (20mg C L⁻¹) em solução com ácido cítrico (0,005mM) podem modificar o metabolismo das plantas. O objetivo deste trabalho foi analisar as mudanças na arquitetura radicular do milho e quantificar o perfil diferencial (indução/supressão) de proteínas de membrana plasmática (MP) purificadas. Para tanto foram analisados comprimento da raiz principal, número de sítios de mitose, número de raízes laterais e área total. Para análise do padrão diferencial das proteínas foi feito o fracionamento celular por ultracentrifugação diferencial e isoladas por eletroforese utilizando géis em uma dimensão (SDS-PAGE) e duas dimensões. Observou-se que os AH em solução com ácido cítrico (AC) aumentam a promoção do crescimento das raízes laterais, da área radicular, número de raízes laterais e a atividade da bomba de H⁺. Os tratamentos AH e AH em conjunto com o AC, reduziram fortemente a quantidade de proteínas associadas à MP. Quando

analisados em conjunto os dados obtidos deste trabalho, pode-se concluir que sob a ação do AC os AH podem atuar em rotas metabólicas que influenciam positivamente o desenvolvimento do sistema radicular.

ABSTRACT

RIMA, Janaína, A. H. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February - 2010. HUMIC ACID BIOACTIVITY IN SOLUTION TREATED WITH CITRIC ACID. Adviser: Luciano Pasqualoto Canellas

The plant growth promotion by humic acids (HA) has been attributed to a hormone type that is able to promote the root development and proliferation, resulting in a more efficient water and nutrient absorption. This research intends to investigate how the humic acids isolated from a vermicompost (20mg C/L) and added to a solution with citric acid (CA) (0.005mM) can modify the plant metabolism. The main objective of this work was to analyze the changes in the corn root system and quantify the differential expression (induction/suppression) of purified plasma membrane proteins. To achieve that, the length of the taproot, the mitotic site numbers, the lateral roots numbers and the total root area, were analyzed. The cell fractionation using differential ultracentrifugation and isolation by SDS gel electrophoresis in one and two dimensions was performed to differentiate protein expression. The results show that the HA in solution with CA increases the lateral root growth promotion (126%), the radicular area (58%), number of lateral roots (55%) and the H⁺ pumps activity (374%). Several proteins associated with the plasma membrane were inhibited when the plants were treated with HA and (HA+CA) solutions. Based in our results It is correct to conclude that the HA and

the CA proteins are acting in metabolic routes that positively influence the root system development.

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos húmicos (AH) promovem o desenvolvimento e o metabolismo das plantas (Vaughan e Malcolm, 1985; Nardi et al., 2002), principalmente sobre o crescimento radicular, devido ou à presença de fitormônios ou uma ação do tipo hormonal capaz de induzir a proliferação das raízes secundárias.

A promoção do crescimento radicular em resposta às substâncias húmicas (SH) foi atribuído, basicamente, a dois fenômenos: o primeiro relacionava a formação de complexos do tipo SH-cátions/ânions e o aumento da solubilidade dos íons e, por conseqüência, sua facilidade de absorção, só que este mecanismo é insuficiente para descrever resultados obtidos com crescimento de plântulas em água ou meio mínimo acrescidos com SH (Vaughan e Malcolm, 1985). O segundo fenômeno está relacionado, com efeito, surfactante das SH sobre as membranas celulares aumentando a sua permeabilidade aos íons (Vaughan e Malcolm, 1985), causando a abertura de orifícios nas membranas fosfolipídicas ocasionando, perda da seletividade e conseqüentemente distúrbios na homeostase celular.

Uma teoria mais geral para a ação das SH no crescimento radicular e absorção de íons foi postulada a partir da observação de que os AH são capazes de estimular a atividade e a quantidade de H⁺-ATPases de membrana plasmática (MP) (Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2002).Essas enzimas têm um papel central na absorção de íons, pois são geradoras do gradiente eletroquímico responsável pela diferença de potencial e acidificação do apoplasto, condição

necessária para o alongamento e divisão celular (teoria do crescimento ácido) (Hager et al., 1991; Rayle e Cleland, 1992). A observação de que os AH podem estimular a síntese de H⁺-ATPases de MP (Canellas et al., 2002) via regulação genética foi confirmada por Quaggiotti et al. (2004).

Além das H⁺-ATPases de MP, os AH podem regular concomitantemente as bombas do vacúolo (V-ATPase e Pirofosfatase), sugerindo a existência de um mecanismo complexo de regulação do metabolismo energético celular de forma similar ao efeito promovido pelas auxinas (Zandonadi et al., 2007).

Os trabalhos relacionando o efeito do tipo auxínico das SH entre os anos 70 e 80 (Nardi et al., 2002) eram realizados principalmente com os ácidos fúlvicos, fração húmica com tamanho/dimensão molecular compatível com os efeitos fisiológicos. No entanto, os resultados com indução do crescimento radicular pelos AH apontavam para uma incongruência: como macromoléculas poliméricas apresentando até alguns milhões de Daltons poderiam acessar o interior da célula e atuar de modo similar às auxinas? A possibilidade de liberação de auxinas das macromoléculas era considerada pouco provável, uma vez que exigia rompimento de ligações estáveis, tais como as co-valentes e, ainda, manutenção da integridade desses compostos prontamente lábeis.

A massa molecular não é um fator decisivo para o efeito de promoção do crescimento radicular e indução da H⁺-ATPases de MP pelas SH, isso foi verificado por Aguiar et al. (2009) utilizando subfrações húmicas obtidas com cromatografia de exclusão de tamanho com gel de Sephadex, e Canellas et al. (2010) com cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho (HPSEC). Em alguns casos, os AH são tão ou mais fisiologicamente ativos que os ácidos fúlvicos.

A possibilidade de liberação de biofragmentos provenientes de plantas e microrganismos da estrutura das SH e seu acesso aos receptores celulares ganhou sentido com a concepção estrutural das SH proposta por Piccolo (ver Canellas et al., 2005), que postula que esses biofragmentos seriam ligados por interações químicas fracas e rompidas facilmente com a adição de ácidos orgânicos (AO) (Piccolo et al. 1996). Ao contrário das macromoléculas ou polímeros, as SH quando em solução, formavam uma associação de compostos orgânicos heterogêneos e de massa molecular relativamente pequena mantidos

por interações fracas e predominantemente hidrofóbicas (Piccolo, 2002). A adição de pequenas concentrações de AO de cadeia simples era capaz de romper essa associação e liberar seus componentes do agregado húmico de massa molecular só aparentemente elevada. Simultaneamente esta teoria foi confirmada por outros pesquisadores de forma independente (Simpson, 2002). Uma revisão sobre a associação húmica e a preservação de biofragmentos nas SH pode ser encontrada no artigo de Sutton e Sposito (2005).

Com base nestas teorias citadas neste presente trabalho se realizou a avaliação da bioatividade de AH isolados de vermicomposto com e sem a adição de ácido cítrico em solução em plântulas de milho. A possibilidade da existência de uma relação entre as respostas das plantas e a mudança conformacional de AH promovidos pela adição de ácido cítrico em solução abrem a perspectiva de insumos biológicos destinados à promoção do crescimento radicular mais eficiente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Substâncias húmicas

As substâncias húmicas (SH) constituem a parte mais estável do carbono presente na matéria orgânica do solo (MOS) e são determinantes no conceito de desenvolvimento sustentável devido à sua influência na manutenção da qualidade do solo (Piccolo, 1996). São geralmente classificadas em função da sua solubilidade em meio aquoso alcalino ou ácido. Os ácidos fúlvicos (AF) são solúveis tanto em meio alcalino como ácido; os ácidos húmicos (AH) são solúveis em solução alcalina que, quando acidificada, é promovida a coagulação dos AH; a fração humina (H) é considerada a fração residual de matéria orgânica, ou seja, são compostos insolúveis tanto em meio alcalino como em meio ácido.

Existem alguns modelos estruturais que tentam explicar a organização das SH. O mais antigo é o que considera as SH como uma macromolécula polimérica decorrente do processo de humificação, no qual a biomassa constituída por resíduos de plantas, animais e microrganismos é transformada até húmus (Stevenson, 1994). Entretanto, Piccolo (2002) mostrou que as SH são melhores descritas teoricamente como uma reunião de diversos compostos químicos de baixa massa molecular, que formam associações dinâmicas estabilizadas por meio de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Estas associações são capazes de se auto-organizar em ambientes aquosos, em estruturas supramoleculares que apresentam tamanhos moleculares só aparentemente elevados.

2.2 Adição de ácidos orgânicos e mudança conformacional das SH

As pequenas subunidades que compõem os agregados húmicos são mantidas unidas principalmente por forças fracas de caráter hidrofóbico (Piccolo, et al., 1996). A elevada dimensão molecular das SH é só aparente uma vez que estas ligações podem ser reversivelmente rompidas pela adição de ácidos orgânicos (Nardi, et al., 1996; Piccolo, et al., 1996), ocorrendo a liberação de pequenos fragmentos para a solução. Isso sugere que as SH (em solução) não se comportam como polímeros como se acreditava anteriormente (Stevenson, 1994). Por analogia com as macromoléculas biológicas (Cantor et al. 1980), as SH se parecem com estruturas formadas por pequenas moléculas auto-associadas randomicamente. A estabilização de tal conformação pode ser atribuída à tendência dirigida pela entropia de excluir moléculas de água da associação húmica e diminuir a energia molecular total (Conte e Piccolo, 1999).

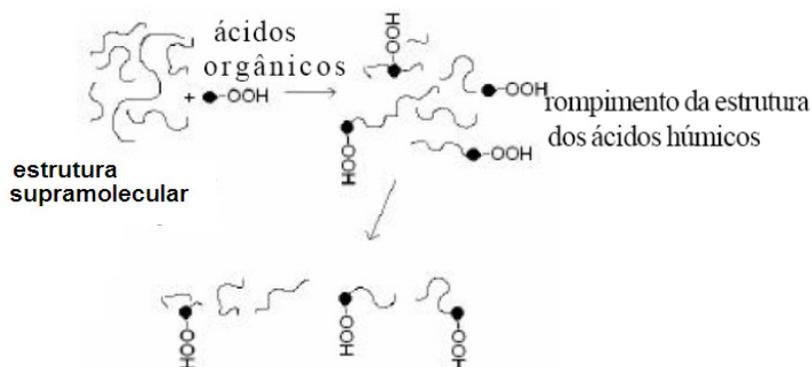


Figura 1: Representação esquemática do modelo de ácidos proposto por Piccolo (1997), conforme Canellas et al. (2005).

O modelo apresentado esquematicamente na Figura 1 foi comprovado experimentalmente por Simpson (2002) utilizando a técnica de DOSY H NMR. Cada componente estrutural das SH apresentou uma mobilidade diferente quando submetido a um gradiente de campo magnético na presença de ácidos orgânicos de cadeia curta.

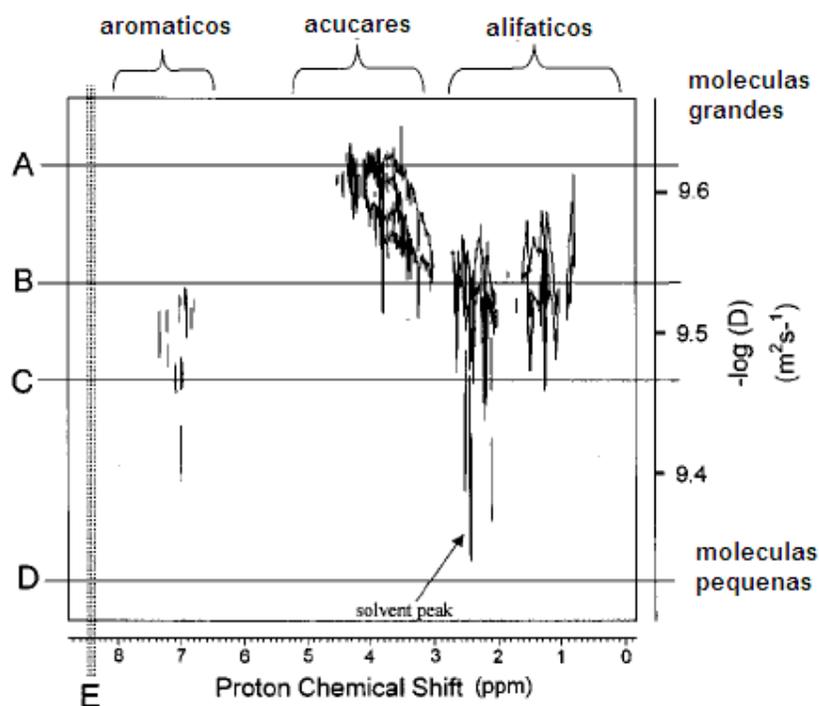


Figura 2: Projeção 2-D DOSY NMR de SH. Adaptado de Simpson et al. (2002).

A projeção dos compostos no experimento DOSY H NMR dão suporte experimental ao postulado de que os componentes das SH não são ligados entre si por forças co-valentes, uma vez que a separação em solução ocorreu com base no fenômeno da difusão (Figura 2). Assim, é possível indicar que as SH são formadas por misturas orgânicas de compostos relativamente simples (compostos aromáticos, açúcares e compostos alifáticos). O arranjo desses compostos em solução prevê a formação de um domínio hidrofóbico (formado por entidades aromáticas pouco substituídas e ácidos graxos de cadeia longa) circundado por um domínio hidrofílico (formado por carboidratos, peptídeos e grupos ácidos) como apresentado na Figura 3.

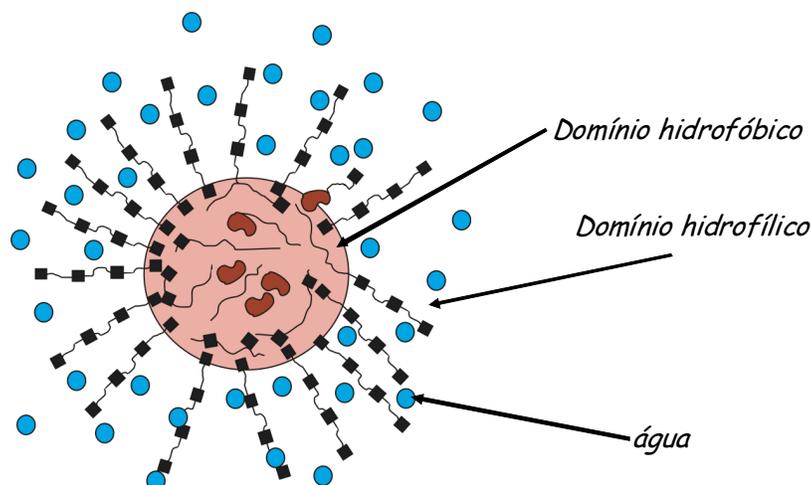


Figura 3. Representação esquemática do arranjo dos compostos nas SH em solução. Adaptado de Conte, 2007.

O domínio hidrofóbico das SH, ou seja, os componentes aromáticos pouco substituídos e os alquílicos são capazes de proteger compostos lábeis contra a degradação microbiana (Spaccini et al., 2002). Canellas et al. (2010) verificaram uma relação significativa entre o aumento do grau de hidrofobicidade da matéria orgânica de um Cambissolo e a preservação de compostos nitrogenados, fosfatados e sulfurados lábeis. Além disso, Canellas et al. (2008a) estudando propriedades químicas de AH isolados de uma seqüência de solos do Norte Fluminense encontraram correlação significativa entre o grau de hidrofobicidade dos AH e seu efeito de promoção no crescimento radicular e estimulação da atividade da H^+ -ATPase de MP. Resultados similares foram encontrados com AH isolados de sete Latossolos de diferentes regiões do Brasil (Canellas et al., 2009). Tomados esses dados em conjunto (i.e., a distribuição de massa molecular não determinante para a bioatividade e as correlações positivas com o grau de hidrofobicidade) é possível sugerir a presença de uma provável relação entre a preservação de biofragmentos nos domínios hidrofóbicos dos HA e sua liberação em solução na presença de ácidos orgânicos de cadeia simples exsudados pelas plantas ou por microrganismos. Nesse sentido, foi observado previamente que os AH modificam o perfil de exsudação de ácidos orgânicos em plântulas de milho aumentando a concentração de ácidos cítrico, oxálico e maleico (Canellas et al.,

2008b). Além disso, Ohno et al., (2004) verificaram aumento da extrusão de citrato relacionado com o aumento da atividade de H⁺-ATPase.

A relação entre a hidrofobicidade dos AH e os efeitos de indução do crescimento radicular foi indiretamente mostrado por Canellas e Façanha (2004), Zandonadi et al. (2007), Canellas et al. (2008a; 2009). Piccolo (1996) postulou que os componentes hidrofóbicos derivados da degradação de plantas e da atividade de microrganismos são capazes de incorporar randomicamente moléculas mais polares e por conseqüência, protegê-las da degradação. Spaccini et al. (2000) mostraram que compostos orgânicos liberados durante a mineralização no solo de resíduos de milho foram estabilizados e protegidos da decomposição pela proteção dos componentes hidrofóbicos. O processo de encapsulação (*trapping*) no interior dos domínios hidrofóbicos sugere que quanto maior a hidrofobicidade, maior é o potencial de incorporação de moléculas bioativas (como os hormônios). Para a expressão do fenômeno de promoção radicular é preciso a sua liberação do domínio hidrofóbico que pode ser conseguida com a simples adição de ácidos orgânicos na solução. O processo ocorre naturalmente pela exsudação de ácidos orgânicos (AO) pelas raízes e pelos microrganismos.

Mudanças no perfil de exsudação de AO pelas plântulas de milho foram induzidas por AH (Canellas et al., 2008b). Onho et al. (2004) verificaram que há uma correlação positiva e direta entre a exsudação de prótons e de AO, também observada por Tomasi et al. (2009). Além disso, Puglisi et al. (2008) também observaram o aumento da exsudação de AO em plântulas de milho tratadas com SH. Dessa forma, pode-se sugerir que a adição de AO pode amplificar os efeitos fisiológicos de uma solução de AH.

A seguir é apresentada uma pequena revisão sobre os principais efeitos dos AH na fisiologia das plantas com atenção especial ao fenômeno de indução do crescimento radicular.

2.3. Efeitos fisiológicos de SH isoladas de vermicomposto

O vermicomposto condiciona a fertilidade do solo pelo aumento da oferta de nutrientes e da melhoria das propriedades físicas do solo (Landgraf et al., 1999). As minhocas aumentam significativamente a velocidade da decomposição

dos resíduos orgânicos (Vincelas-Akpa e Loquet, 1997) e também produzem SH com elevada atividade biológica (Dell'Agnola e Nardi, 1987; Nardi et al., 1996; Muscolo e Nardi, 1997; Masciandaro et al., 1999; Muscolo et al., 1999; Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Canellas et al., 2006; Rodda et al., 2006a,b; Zandonadi et al., 2007). Essas substâncias têm atividade parecida com a dos hormônios vegetais e aumentam a absorção de nutrientes e o crescimento vegetal (Vaughan e Malcolm, 1985; Chen e Aviad, 1990; Nardi et al., 2002).

O uso de vermicomposto como fonte de SH apresenta algumas vantagens: pode ser fácil e comercialmente obtido, é uma fonte renovável de matéria orgânica (diferente da maioria das SH comercialmente disponíveis que são obtidas do lignito ou do carvão mineral) e apresenta capacidade de estimular diretamente o crescimento vegetal (Masciandaro et al., 1999; Canellas et al., 2002; Façanha et al., 2002; Rodda et al., 2006 a,b).

Desde o início do século passado já se conhecia a propriedade dos ácidos húmicos (AH) de estimular o crescimento vegetal quando usados em concentrações relativamente pequenas (Bottomley, 1917). Vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar como as SH podem induzir o crescimento radicular. Os mais tradicionais se referem à formação de complexos solúveis com metais, especialmente com os cátions que também são micronutrientes e encontrados em pequena concentração na solução do solo (Cesco et al., 2002).

Também foi popular a explicação de que a ação surfactante das SH poderia levar ao aumento da permeabilidade das membranas biológicas (Visser, 1987) e como conseqüência ao aumento da absorção de íons. Se por um lado o aumento da permeabilidade das membranas aumenta a entrada de íons, por outro facilita a saída já que o referido aumento não é seletivo. Além disso, são vários os experimentos com ação fisiológica de SH nos quais são usados meios sem a presença de nutrientes.

As auxinas, principal hormônio envolvido no enraizamento, induzem o aumento de proteínas envolvidas no crescimento das plantas como a H⁺-ATPase de membrana plasmática (Frias et al., 1996). As bombas de H⁺ membranares acidificam o apoplasto e deixam a parede celular mais maleável facilitando o alongamento celular (Hager et al., 1991; Frias et al., 1996). A ativação das

bombas de H^+ também promove a nutrição vegetal pela geração do gradiente eletroquímico que dirige o transporte iônico através das membranas celulares via sistemas transportadores secundários (Morsomme e Boutry, 2000).

A presença de moléculas ou unidades bioativas semelhantes às auxinas ligadas ou agregadas às SH foi relacionada com a indução de sítios de mitose nas raízes e ativação das H^+ -ATPases (Canellas *et al.*, 2002).

Foi observado, por meio de imunoenaios ou detecção por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a presença de unidades estruturais semelhantes ao ácido indol acético (AIA) em AH (Muscolo *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, (2002); Façanha *et al.* (2002) e Canellas *et al.* (2002) observaram que AH isolados de vermicomposto induzem a proliferação de raízes laterais emergidas em plântulas de milho que, por sua vez, são formadas por células com membranas enriquecidas com H^+ -ATPases (Jahn *et al.*, 1998).

Os AH podem aumentar a expressão das H^+ -ATPases nas membranas e Canellas *et al.* (2002) justificaram esse fenômeno à luz da teoria do crescimento ácido que postula a acidificação do apoplasto, causado pela ativação das bombas de H^+ como evento essencial para a expansão celular. Tem sido relatado que a auxina pode induzir a síntese de H^+ -ATPase (Hager *et al.*, 1991) pelo mecanismo de indução pós-transcricional (de mRNA de H^+ -ATPase) das isoformas (Mha 1 e Mha2) expressas em milho (Frias *et al.*, 1996). Quaggiotti *et al.* (2004) verificaram superexpressão desse gene em plantas tratadas com SH. Além disso, as SH podem estar envolvidas na indução da sinalização celular uma vez que foi observado uma ativação concentrada entre as bombas de H^+ da plasmalema e tonoplasto (Zandonadi *et al.*, 2007) típica do crescimento ácido vegetal.

2.3 Teoria do crescimento ácido

A teoria do crescimento ácido está relacionada com a capacidade de rápido alongamento e expansão das células vegetais e das paredes celulares em pH ácido. Nesse tipo de crescimento não ocorre o aumento do número de células, porém a parede celular se torna mais flexível pela ação de enzimas específicas (*e.g.*, expansivas) que em pH ácido (menor que 4,2), promovem o aumento da plasticidade da parede celular pela liberação de pequenos segmentos da matriz de glucanos ligados às microfibrilas de celulose (Cosgrove, 1998; 2000),

permitindo assim o aumento do volume da célula devido a processos físicos decorrentes do turgor e osmose. Para que aconteça o crescimento ácido é necessário algum tipo de quê? e à medida que aumenta a concentração de H^+ isso ativa a atividade das expansinas, fazendo com que a parede celular se torne mais extensível pelo relaxamento da tensão, permitindo que a célula absorva mais água e se amplie (Rayle e Cleland. 1992)

2.4 Membrana plasmática

A membrana plasmática (MP) ou plasmalema é a estrutura que delimita todas as células vivas e estabelece a fronteira entre a célula e o meio ambiente (Taiz, 2009; Gunning e Steer, 1996), representando, portanto, um alvo primário para a ação de SH em solução. As MP possuem uma estrutura do tipo mosaico-fluido (Singer e Nicolson, 1972), onde moléculas protéicas estão inseridas e interagem dinamicamente com lipídios dispostos em dupla camada (Figura 4). A MP seleciona as substâncias que entram e elimina substâncias presentes no citoplasma (Creighton, 1983). Por ser o componente celular mais externo, a MP possui receptores específicos que têm a capacidade de reconhecer outras células e diversos tipos de moléculas, como hormônios, desencadeando assim várias reações metabólicas (Darnell, et al., 1995). A MP vegetal exerce funções adicionais, tais como a síntese da parede celular, respostas a fatores bióticos e abióticos (Ephritikhine, et al. 2004).

As proteínas são consideradas os principais componentes funcionais da MP, pois além do papel de sustentação, atuam como canais de passagem de certas moléculas, receptores de sinais químicos, enzimas e bombas para transportes ativos (Taiz, 2009). Estas proteínas, que estão envolvidas na detecção e transdução de sinal que são organizadas em domínios específicos na MP e sua agregação, permitem congregação e orientar os percursos e os membros do sistema de sinalização (Buchanan, et al., 2000).

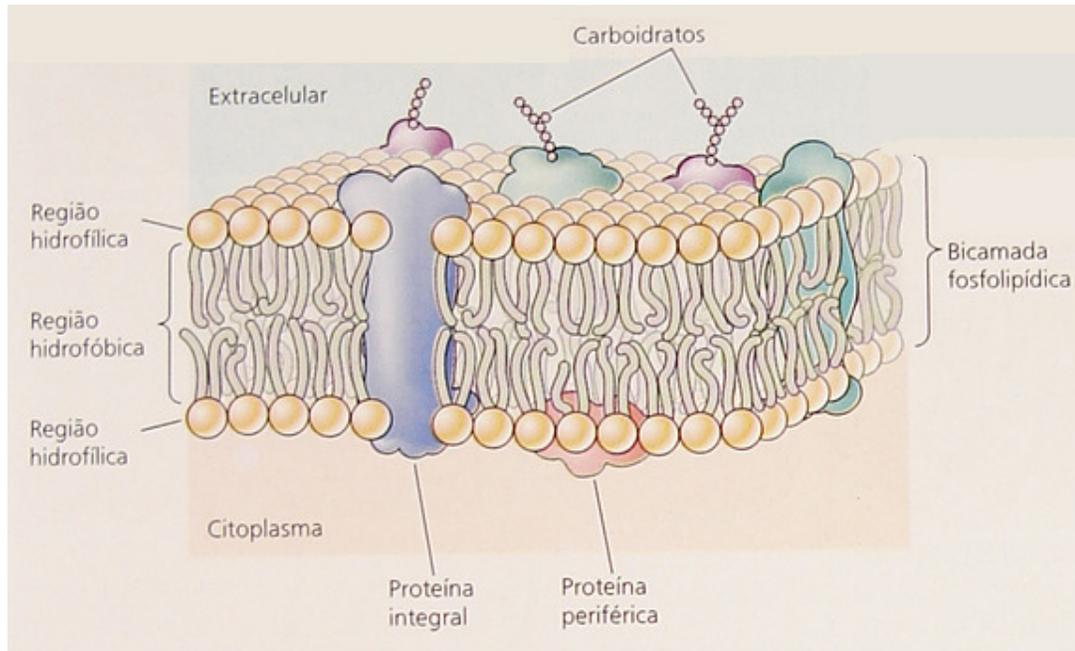


Figura 4: Representação esquemática da membrana plasmática com as proteínas embebidas na bicamada lipídica. Adaptado de Taiz (2004).

Muitas moléculas sinalizadoras atuam em baixas concentrações, já os receptores que as reconhecem e fixam-se nessas proteínas geralmente têm alta afinidade (Darnell, et al., 1995). O cálcio (Ca^{2+}) é um regulador de várias proteínas e atua em baixas concentrações (Taiz, 2009), o Ca^{2+} estimula a atividade da quinase dependente de Ca^{2+} (CDPK), que são proteínas importantes no metabolismo celular (Satterlee e Sussman, 1998). As proteínas CDPK são ativadas tanto pela variação na concentração de Ca^{2+} como pela presença de ácidos graxos (Satterlee e Sussman, 1998). As SH podem modificar a atividade das CDPK em plantas tanto pela alteração na absorção de Ca^{2+} , como pela presença de grupos hidrofóbicos, tais como, ácidos graxos presentes na sua estrutura (Taiz, 2009).

2.4.1 H^+ -ATPase

As H^+ -ATPases (bombas de H^+) são enzimas transmembranares capazes de hidrolisar ATP (Figura 5), que geram um gradiente de potencial eletroquímico de H^+ (Taiz, 2009). Os AH podem estar envolvidos em rotas metabólicas que estimulam o bombeamento de H^+ mediado pelas H^+ -ATPase de MP (Canellas et

al., 2005). As SH de baixo peso molecular estimulam a atividade da H^+ -ATPase de MP (Varanini et. al., 1993). Vaughan e Malcolm (1985) mostraram que os AH podem estimular o desenvolvimento vegetal tanto quanto os AF. Façanha et. al., (2002) e Canellas et. al. (2002) mostraram que os AH modificam a estrutura radicular, estimulando o crescimento radicular, aumento de sítio de mitose, número de raízes emergidas e área radicular. Além das H^+ -ATPase foi constatado que os AH podem atuar como reguladores da V-ATPase e da Pirofosfatase que são bombas do vacúolo (Zandonadi et. al., 2007). Nas plantas, as H^+ -ATPases também participam de outras funções essenciais para o seu crescimento normal, tais como: tolerância ao estresse salino, regulação do pH intracelular e expansão celular (Taiz, 2009).

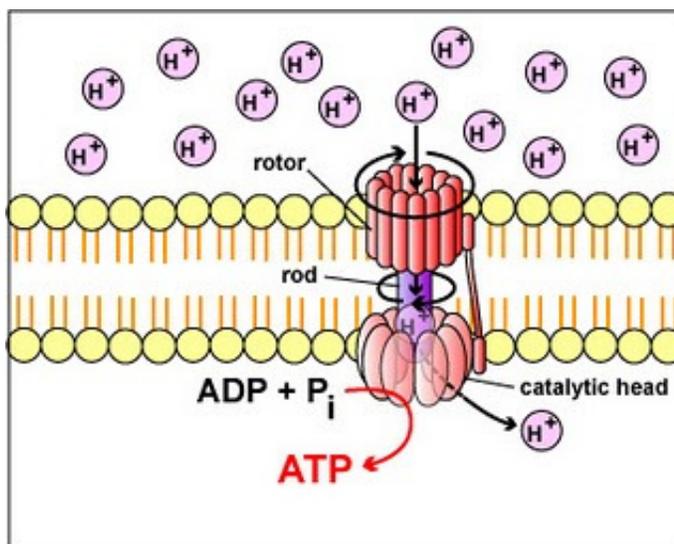


Figura 5: Representação esquemática da H^+ -ATPase de MP.

2.5. Efeito das SH na expressão das proteínas

Os AH modificam o perfil protéico das plantas, tanto na inibição quanto indução da expressão, podendo influenciar em todo metabolismo celular. Os AH podem estimular atividade da peroxidase (Muscolo et al., 1993) e a H^+ -ATPase de MP (Façanha et al., 2002). Além das H^+ -ATPases de MP, os AH podem regular concomitantemente a V-ATPase e a Pirofosfatase (Zandonadi et al., 2007). As proteínas envolvidas com o metabolismo da glicose, sinalização e transporte

celular também sofrem alterações na expressão, como foi descrito por Carletti et. al.,(2008) 63% das proteínas identificadas de MP de raízes de milho, apresentaram supressão da expressão, essas proteínas suprimidas podem estar envolvidas em determinadas rotas metabólicas inibindo estas rotas. Este fenômeno ocorre com as auxinas, que podem ser inibidas por certas proteínas, que bloqueiam o transporte da auxina (Taiz, 2009). O Quadro 1 apresenta resumidamente os efeitos do AH.

Quadro 1 – Efeito de AH sobre a atividade de enzimas em raízes de plantas superiores. Ensaios *in vitro* – adição ao meio de

Planta	Concentração de AH (mgL ⁻¹)	Metabolismo dos Carboidratos										Anti-oxidantes				Metabolismo do fósforo				Catabolismo de proteínas		Referências
		Amlase	Invertase	Sacarose	Privato quinase	Fosfoglicose isomerase	Glicose 6-fosfato de hidrogenase	Hexoquinase	Aldolase	Catalase	Peroxidase	Poli-fenol oxidase	Oxidase ác. Ascórbico	Citocromo oxidase	Esterases	Fosforilase	Fosfatase	Transmenase	Enzimas proteolíticas			
Beterraba	>5	+																		Vaughan (1969)		
Beterraba	Nc	-																		Vaughan & Malcolm (1979)		
Beterraba	Nc							-	-	-										Komissarov & Klimova (1979)		
Trigo	100																	+		Cincerova (1964)		
Trigo	100																			Smidova (1961)		
Trigo	<250	-											+							Malcolm & Vaughan (1979)		
Tomate	Nc							-	-	-										Komissarov & Klimova (1979)		
Trigo	<10																			Bukvora & Tichy (1967)		
Trigo	1-100																			Kristeva & Lukyanenko (1962)		
Trigo	1-100																			Stanchev et al. (1975)		
Trigo	1-500																			Vaughan et al. (1974)		
Aveia	10-500																			Vaughan & Malcolm (1971)		
Pepino	10-100																			Butler & Ladd (1969)		
Tomate	10-100																			De Almeida & Pospisil (1980)		
Pinus	10-100																			Muscolo et al. (2005)		

3. HIPÓTESE

Esse trabalho se fundamenta na hipótese de que a adição externa de pequenas concentrações de ácidos orgânicos de cadeia curta em uma solução de AH promove um incremento da sua bioatividade em função da abertura dos agregados húmicos decorrente do rompimento de interações hidrofóbicas fracas entre as subunidades, promovendo liberação de compostos lábeis tornando-os mais acessíveis aos receptores celulares. Um incremento da bioatividade das SH promovida por baixas concentrações de ácidos orgânicos abre uma perspectiva tecnológica eficiente e de baixo custo na promoção do crescimento vegetal. Para tanto foram realizadas análises morfológicas das raízes de plântula de milho e foi feito um estudo do perfil protéico da MP em gel na primeira e segunda dimensão.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a promoção do crescimento radicular de plântulas de milho tratadas com uma solução de AH (20 mg C L⁻¹) isolado de vermicomposto e adicionada com 0,005 mM de ácido cítrico.

4.1 Objetivos específicos

- Determinar o número de raízes laterais emergidas, comprimento do eixo principal, área e comprimentos totais e número de sítios de mitose; Avaliar a atividade da H⁺-ATPase de MP isolada de raízes de plântulas de milho tratadas com AH e ácido cítrico;
- Determinar qualitativamente as mudanças no perfil das proteínas de membrana plasmática isoladas de raízes de plântulas de milho tratadas com AH e ácido cítrico.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção dos ácidos húmicos

O procedimento de extração dos AH ocorreu de acordo com Canellas et al. (2002). Foi utilizado NaOH 0,5 mol L⁻¹ como extrator, na razão resíduo:extrator orgânico de 1:10 (v:v) em atmosfera inerte de N₂. Após 12 h, foi centrifugada a 5.000 x g e acidificado a pH 1,5 com HCl 6 mol L⁻¹. A solubilização e precipitação dos AH foi repetida três vezes. Em seguida, foram adicionados 200mL de solução aquosa diluída de HF e HCl (preparada com 5mL de HCl concentrado e 5mL de HF concentrado, sendo o volume da solução completado para 1L com água desionizada), agitando-se a amostra durante 12 horas. Os AH foram lavados com água deionizada até teste negativo com AgNO₃. Em seguida, os AH foram dialisados contra água em membranas com limite de exclusão de 14 kDa e secos por liofilização. O AH foi solubilizado com 50 a 100 mL de NaOH 0,05 mol L⁻¹ e o pH foi ajustado para 5,5 com HCl 0,1 mol L⁻¹. A caracterização do AH está de acordo com Canellas et al. (2010).

5.2. Crescimento de plântulas e tratamento com ácido húmico e ácido cítrico

Sementes de milho (*Zea mays* L., var UENF 506/6) foram esterilizadas por meio da imersão em uma solução de NaCl 1,0 %, lavadas e colocadas em água destilada por seis horas. As sementes foram acondicionadas em papel e germinadas no escuro a 28°C. Três dias após a germinação, as plântulas foram transferidas para um meio mínimo contendo somente CaCl₂ 2 mM (Controle). O meio mínimo foi suplementado com AH isolado de vermicomposto na concentração de 20 mg C L⁻¹ (AH), (trabalhos anteriores indicaram esta concentração como dentro da faixa ótima de promoção de crescimento) e com AH na concentração de 20 mg C L⁻¹ mais AC na concentração de 0,005 m mol L⁻¹ (AH+AC). O pH da solução foi ajustado para 5,5 com solução diluída de NaOH e/ou HCl. Após sete dias de crescimento, as plântulas foram coletadas e as raízes utilizadas para o isolamento das proteínas de membrana plasmática.

5.3. Avaliação do crescimento radicular das plântulas de milho

5.3.1. Comprimento e área radicular

As raízes foram escaneadas e em seguida foram analisados o comprimento radicular total e a área radicular de cada plântula e foram calculados como a soma dos comprimentos de todos os segmentos radicular nodais, utilizando o programa *Delta-T Scan*TM.

5.3.2 Sítios de mitose

O sistema radicular foi lavado com água e submetido à fervura a 75 °C por 20 minutos em KOH (0,5%, p/v). Em seguida, as raízes foram lavadas em água e coradas com hematoxilina por 14 h no escuro. Após este procedimento, as raízes foram lavadas com água e colocadas em uma solução de ácido láctico 80% (p/v) a 75°C por 30 a 90 segundos. As raízes foram transferidas para placas de Petri contendo água e observadas em microscópio estereoscópico para avaliar o número de sítios de mitose, visíveis como pontos vermelhos em um fundo branco do tecido da raiz. A solução de hematoxilina é preparada da seguinte forma: 1 g de

hematoxilina, 0,5 g de amônio férrico sulfato, e 50 mL de 45% (p/v) de ácido acético, e foi armazenada no escuro à temperatura ambiente. Foi preparada uma solução estoque que foi diluída na água 40 vezes.

5.3.3 Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições para cada tratamento. Foi realizada a análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste DMS em nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo programa SISVAR da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

5.4 Ensaio bioquímicos

5.4.1 Preparação da fração microssomal

A fração microssomal isolada das raízes de milho foi obtida a partir da centrifugação diferencial (De Michelis e Spanswich, 1986). As raízes foram cortadas, pesadas e homogeneizadas em meio tamponado. O tampão de extração foi composto de HEPES-KOH 50 mM (pH 7,5), sacarose 250 mM, KCl 150 mM, EDTA 150 mM, DTT 1 mM, PVP 0,8 %, BSA 0,2%, PMSF 1 mM, ácido ascórbico 50 mM, na relação massa de tecido:volume de tampão de 1:1,5. A manipulação das soluções foi realizada em temperatura entre 0 e 4°C. O pH foi mantido entre 7,6 e 8,0. O homogenato resultante foi filtrado utilizando-se miracloth e submetido à centrifugação (3.000 x g, 15 min.), o precipitado foi descartado para a remoção de células não rompidas e núcleos. Para o isolamento das mitocôndrias o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 x g, 15 min. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação (100.000 x g, 50 min.). O precipitado dessa centrifugação foi solubilizado em solução tampão contendo: MOPS-KOH 25 mM, sacarose 250mM, EDTA 0,1 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM.

5.4.2 Partição de fase

A fração microssomal foi submetida à metodologia de partição de fase (Ephrikhine et al., 2004) para a purificação das proteínas de membrana plasmática. O primeiro meio da partição de fase: DEXTRAN T500 6,2%

(peso/peso), sacarose 250 mM, MOPS-KOH 25 mM (pH 7,8), KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM. O segundo meio da partição de fase: Polyethylene glicol 3350 6,2% (p/p), sacarose 250 mM, HEPES-KOH 25 mM (pH 7,8), KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM. Adiciona-se o meio de partição de fase na fração microsomal que foi ressuspensa, fazendo agitação e inversão do frasco por 40 vezes. O meio obtido é submetido a uma primeira centrifugação (1.500 x g por 5min), e a segunda centrifugação (100.000 x g por 60min). As diferentes amostras foram devidamente aliquotadas, identificadas e estocadas a -20° C para posteriores análises.

5.4.3 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As amostras foram ensaiadas em duplicata, com as concentrações de BSA variando de 0 a 20 µg, com intervalos de 2 µg. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Spekol UV VIS 3.01), a 595 nm de comprimento de onda.

5.4.4 Avaliação da atividade das H⁺-ATPases de MP

A atividade ATPásica foi determinada colorimetricamente conforme descrito por Fiske e Subbarow (1925), medindo-se a quantidade de fosfato inorgânico liberado pela reação. A reação foi iniciada com a adição da proteína, e parada pela adição de ácido tricloroacético (gelado) para uma concentração final de 10% (v/v). Composição do meio reacional: MOPS-KOH pH 6,5 ou 7,0, 50 mmol L⁻¹; MgCl₂ 3 a 5 mmol L⁻¹, KCl 100 mmol L⁻¹, ATP 1 mmol L⁻¹ e 50 µg de proteína. A hidrólise de ATP representa a atividade sensível a 0,2 mmol L⁻¹ de vanadato. A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H₂SO₄ 2 % + Ácido Ascórbico 1% e, após 15 minutos, efetuou-se a leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Nessa reação, o fosfato é incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul. Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase foi

medida a 30 °C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída à ATPase.

5.5 Avaliação qualitativa do padrão diferencial de proteínas

5.5.1 Determinações eletroforéticas por SDS-PAGE

As proteínas extraídas das amostras de tecido radicular (membranas) de plantas após a ação do AH e AH+AC e controle foram submetidas a eletroforeses em géis desnaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). A aplicação das amostras seguiu da seguinte forma: foi adicionada uma parte de tampão de amostra 4x (contendo SDS 2%, β -mercaptoetanol 4%, uréia 8M) para cada duas partes de extrato de proteína. Foi aplicado nos poços um total de 50 μ l do extrato de proteína. As amostras foram submetidas à separação por eletroforese em SDS-PAGE. A separação protéica ocorreu sob uma corrente de 120 V até a linha de tampão de amostra chegar à parte inferior do gel. Posteriormente os géis foram revelados com azul brilhante de Coomassie R-250. As análises da mobilidade eletroforéticas e a quantificação relativa das bandas foram realizadas mediante varredura (scanner) do gel unidimensional obtendo uma imagem em formato TIFF em um software comercial e logo se realizou um estudo densitográfico utilizando o programa computacional "gel perfect" (Bozzo e Retamal, 1991, Retamal et al. 1999). A determinação da massa molecular relativa foi realizada relacionando a mobilidade das proteínas das amostras em estudo, com aquelas de proteínas de massa molecular conhecida, utilizando o mesmo programa computacional.

5.5.2 Determinações eletroforéticas por 2D-PAGE

As eletroforeses bidimensionais seguiram o método elaborado por O'Farrel (1975) com algumas inovações feitas por Gorg et. al., (1980). Dentre elas consta um gradiente de pH imobilizado por meio da polimerização de anfólitos químicos com a matriz de acrilamida para a focalização isoeétrica na primeira dimensão, em um sistema de focalização chamado IPGphor (Amersham-Pharmacia). O extrato contendo as proteínas, 60 μ g foram diluídos em solução de

focalização isoeétrica (IEF) (constituindo de uréia 8M, CHAPS 2% m/v, tampão IPG (pH 3-10) 2%, azul de bromofenol 1 μ l) e usados para re-hidratação das tiras de gel. A eletrofocalização procedeu-se em tiras de gel de 7cm, com gradiente de pH imobilizado de 3 a 10 (Amersham-Pharmacia) em aproximadamente 28.000 Vh. A segunda dimensão foi feita, após o equilíbrio da tira em tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida para alquilação e redução das proteínas, usando-se um sistema vertical para eletroforese (BIORAD) sob voltagem constante de 120V.

5.5.3 Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com duas repetições para cada tratamento, cada vaso com aproximadamente 300 plântulas. A análise estatística foi feita utilizando o teste DMS $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Bioatividade dos AH em solução com AC

As alterações do sistema radicular em resposta aos estímulos hormonais e ambientais e a quantidade de raízes laterais são influenciadas por uma diversidade muito complexa de sinais externos e internos (Torrey, 1986; López-Bucio et al., 2003; Sorin et al., 2005). Foi observado que plantas de milho tratadas com AH em solução com AC apresentam habilidade de induzir mudanças no padrão de enraizamento (Figura 7). A exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes pode desarranjar a estrutura das SH e liberar compostos similares às auxinas, que, ao acessar receptores externos à célula, desencadeiam a mudança na arquitetura radicular (Canellas *et al.*, 2002; Zandonadi *et al.*, 2007; Dobbss *et al.*, 2007; Aguiar *et al.*, 2009; Canellas *et al.*, 2010).

O sistema radicular do milho foi significativamente modificado tanto pela adição de AH quanto pela adição de AH+AC à solução de cultivo utilizada para crescimento das plantas. O comprimento do eixo principal (CEP) das plantas tratadas com AH e AH+AC apresentou redução de 39,7% e 28,3%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 7A). Este encurtamento é um efeito tipicamente observado em plantas tratadas com auxina (Zandonadi et al., 2007), sugerindo a presença do hormônio ou uma ação do tipo hormonal presente nos AH.

O número de raízes laterais emergidas aumentou 37% em relação ao controle com o tratamento das plântulas com AH e 55% quando tratadas com uma solução de AH+AC. A indução de raízes laterais é o resultado típico da influência das SH sobre o crescimento radicular (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007; Dobbss et al., 2007).

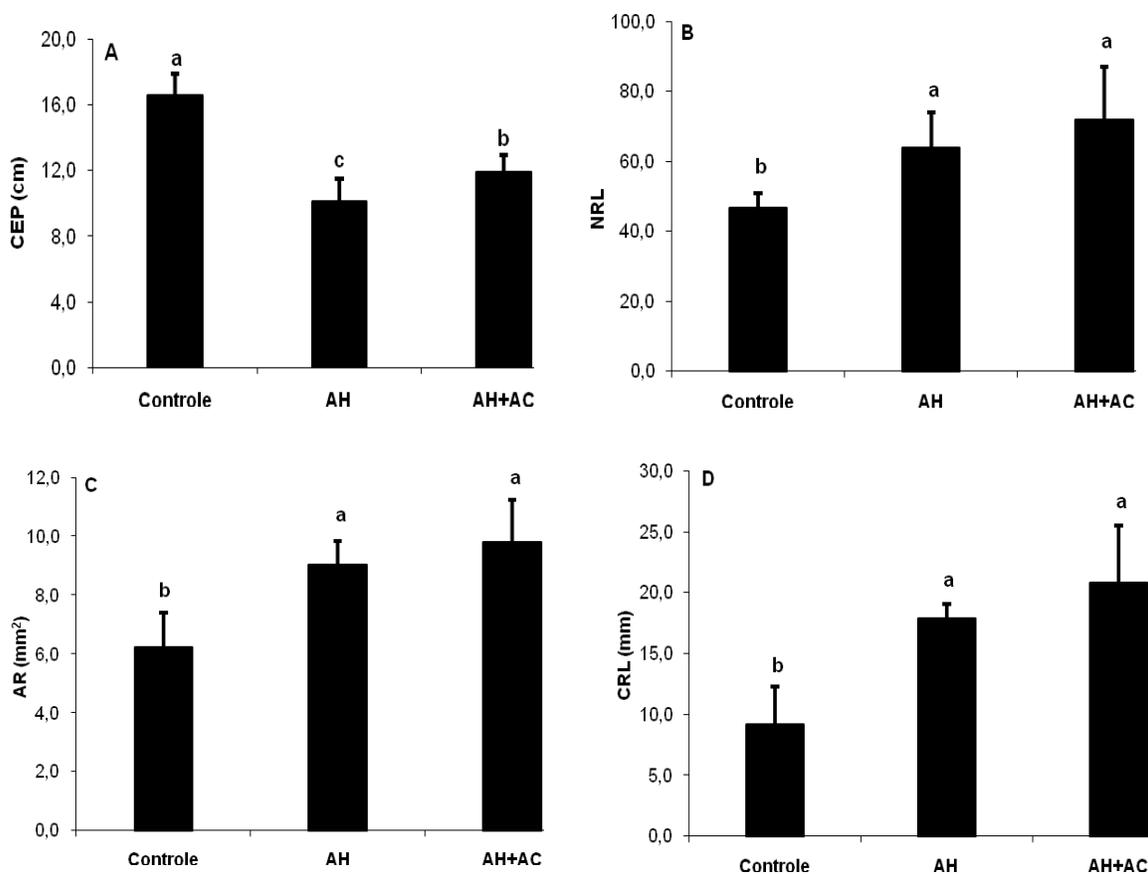


Figura 7: Efeito do AH isolado de vermicomposto e da adição de ácido cítrico juntamente com AH (AH+AC) sobre a morfologia do sistema radicular de milho. Dados de comprimento do eixo principal (A); número de raízes laterais (B); área radicular (C); e comprimento de raízes laterais (D) O comprimento das raízes laterais e o comprimento do eixo principal foram normalizados em relação ao controle (CONT=100%). Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste DMS $p < 0,05$.

Foi observado aumento na área radicular (Figura 7C) das plântulas tratadas com AH (45%) e com AH+AC (58%) em relação às plântulas controle. O

comprimento das raízes laterais (Figura 7D) apresentou aumento significativo de 94% para o AH e de 126% para o AH+AC.

Os tratamentos com AH promoveram aumento no número de raízes laterais, na área radicular e no comprimento de raízes laterais em comparação com o controle. A adição de AC não aumentou o efeito de indução de emergência de raízes laterais (Figura 8). Essas mudanças morfológicas promovidas pelas SH já foram observadas já há bastante tempo (Bottonley, 1917). Geralmente é observado um forte estímulo no desenvolvimento radicular (bem mais do que na parte aérea) com uso de concentrações relativamente pequenas de SH em solução e inibição do crescimento em doses maiores, semelhante à curva normalmente obtida nos ensaios com hormônios vegetais (Vaughan e Malcolm, 1985). Segundo Parry e Estelle (2006), o sinal primário que dispara a iniciação da raiz lateral é promovido pela auxina que induz a iniciação da raiz lateral pelo movimento descendente polar desde as folhas jovens até a ponta da raiz através do cilindro vascular (pelo periciclo ou xilema diferenciado). O AH induziu o aumento no número de sítios de mitose (Figura 8), já para o AH+AC se manteve igual ao controle. Esse dado pode indicar uma maior velocidade de promoção de emergência de raízes laterais, uma vez que os primórdios radiculares podem ser transformados mais rapidamente em raízes emergidas com aumento da concentração de auxinas. Assim, a adição de um ácido orgânico pode acelerar o enraizamento lateral, já que o AH estaria disponível mais rápido para a planta.

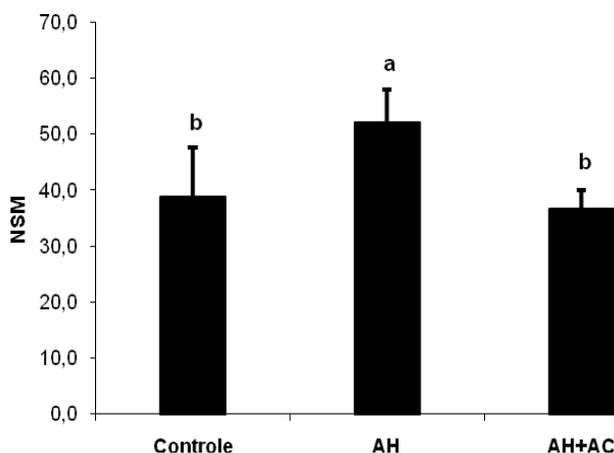


Figura 8. Número de sítios de mitose. Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste DMS $P < 0,05$.

6.2 Atividade da H⁺-ATPase

As MP isoladas das raízes de plântulas de milho tratadas por sete dias com AH e AH+AC apresentaram um estímulo da atividade ATPásica sensível ao vanadato. O tratamento com AH promoveu um incremento de 77% em relação ao controle na atividade ATPásica (Figura 9). A estimulação dos AH na presença de AC foi de 374% em relação ao controle. Outros trabalhos relatam também o aumento da atividade hidrolítica em plântulas tratadas com AH (Canellas et. al., 2002; Zandonadi et al., 2007; Dobbss et al., 2007; Aguiar et. al., 2009; Canellas et. al, 2010). Canellas et al., (2008) observaram que os AH promoveram maior exudação de ácidos orgânicos pelas raízes, estando esta observação de acordo com a proposta de que a estrutura do AH pode ser facilmente quebrada pela adição de ácidos orgânicos (Piccolo, 2002). Ohno et al. (2004) relataram que há uma relação direta entre a atividade da H⁺-ATPase e a exsudação de AC. Provavelmente quando o AC entra em contato com o AH em solução, libera grupamentos com atividade tipo hormonal aumentando assim a atividade da H⁺-ATPase de MP.

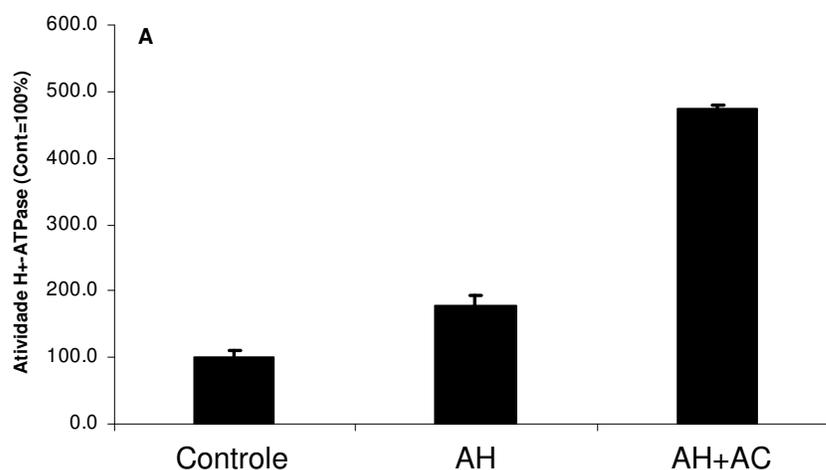


Figura 9: Atividade específica da H⁺-ATPase em plântulas de milho tratadas com AH e AH+AC em solução. Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste DMS P<0,05.

6.3 Avaliação qualitativa do padrão diferencial de proteínas

As proteínas extraídas das raízes de milho foram submetidas a géis na primeira e na segunda dimensão. Na Figura 10 encontram-se os géis dos tratamentos e controle na primeira dimensão e na segunda dimensão.

Analisando a Figura 11, observa-se que a(s) proteína(s) de massa molecular (Mm) de 178,05 kDa foram induzidas pelos tratamentos de AH e AH+AC, sendo que o AH apresentou o percentual de 5,8% e para os AH+AC de 7,4% e não apareceram no controle, o mesmo acontece para a(s) proteína(s) com Mm de 146,68 kDa, com 5,1% de proteínas para o tratamento com AH e 7,2% para AH+AC, mas para a(s) proteína(s) com Mm de 135,74 kDa apareceram somente no controle. A banda que representa as proteínas de Mm igual a 100,91 kDa, mostra que houve indução destas proteínas somente quando as plantas foram tratadas com AH+AC, porém para as proteínas de Mm de 94,04 kDa foram suprimidas pelo tratamento do AH+AC, aparecendo em proporção igual tanto no controle quanto no tratamento com AH. A banda com Rf 0,21 cujo Mm é de aproximadamente 66kDa, aparece mais forte em relação às outras bandas, provavelmente por causa da adição de BSA durante o processo de extração. As bandas com Mm entre 56 e 57kDa possivelmente são as mesmas proteínas, aparecem em todos os tratamentos e no controle na seguinte proporção: controle com 2,1%, AH com 1,7% e AH+AC com 2,5%. A(s) proteína(s) de Mm entre 50 e 51 kDa aparecem com mais intensidade do que as outras bandas do gel e também apareceram tanto no controle quanto nos tratamentos com percentual de 11,8% para o controle, 14,5% para o AH e 14,7% para AH+AC. A(s) proteína(s) de Mm de 42 a 43kDa podem representar as mesmas proteínas e aparecem os seguintes percentuais: controle 7,6%, AH 7,3% e AH+AC 7,7%. A(s) proteína(s) de Mm de 38 e 39 Mm também estão presentes em todos os tratamentos bem como no controle, porém aparecem em maior intensidade para o tratamento AH+AC (4,3%). A(s) proteína(s) representadas pelas Mm de 34 e 35 kDa, também estão presentes tanto no controle quanto nos outros tratamentos, apresentando o percentual de 8,4% para o controle, 8,8% para o AH e 7,2% para AH+AC. A(s) proteína(s) de Mm 32kDa foram totalmente inibidas pelo AH+AC, aparecendo com 3,5% para o controle e 2,5% para o AH. Proteína(s) de Mm de 31kDa foram

totalmente inibidas pelo controle e AH sendo expressa(s) somente no tratamento de AH+AC, já as de Mm de 27kDa, foram expressa(s) somente no controle e quando as plantas foram tratadas com AH e AH+AC na proporção de 2,1 e 1,7%, respectivamente. O mesmo acontece para a(s) proteína(s) cujo Mm é de 25kDa, sendo expressa(s) somente no controle (6,8%) e no AH (6,9%). E finalmente a(s) proteína(s) representada(s) pelas Mm de 21, 18 e 15kDa foram totalmente inibidas quando tratadas com AH e AH+AC.

Observa-se que 5 bandas da(s) proteína(s) no gel na primeira dimensão só apareceram no controle, e 5 bandas foram totalmente inibidas no controle. Quando as plântulas foram tratadas com AH, observou-se que 7 bandas do gel foram suprimidas e que 2 bandas foram expressas com AH, porém inibidas quando tratadas com AH+AC. Para o tratamento com AH+AC, 11 bandas do gel foram totalmente inibidas e 2 aparecem somente nesse tratamento. Essas bandas com expressões diferenciadas são alvos pra futuros estudos.

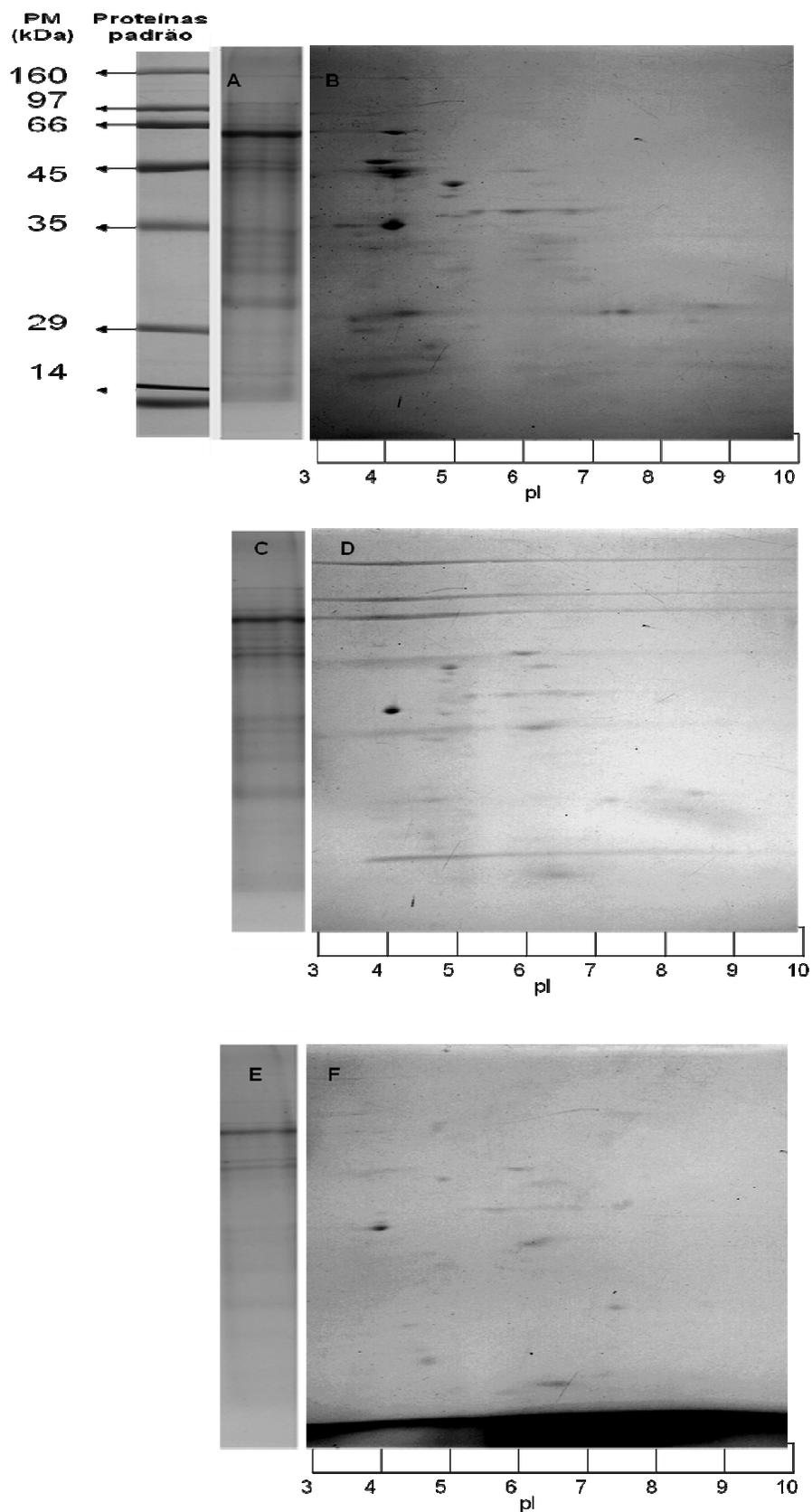


Figura 10: Gel na primeira dimensão: Controle (A), AH (C) e AH+AC (E). Gel na segunda dimensão: Controle (B); AH (D); e AH+AC (F). Ponto isoelétrico (pI).

A					B					C				
Rf	Tira	area	%	PM kD	Rf	Tira	area	%	PM kD	Rf	Tira	area	%	PM kD
0.03	—	281	5.4	171.28	0.02	—	191	5.8	178.05	0.02	—	132	7.4	178.05
0.07	—	217	4.5	135.74	0.06	—	167	5.1	146.68	0.06	—	128	7.2	146.68
0.14	—	317	6.5	94.04	0.14	—	211	6.4	94.04	0.13	—	181	10.1	100.91
0.21	—	757	15.6	66.20	0.21	—	619	18.9	66.20	0.21	—	390	21.8	66.57
0.26	—	101	2.1	56.47	0.26	—	57	1.7	57.77	0.25	—	44	2.5	59.09
0.30	—	574	11.8	50.41	0.30	—	478	14.5	50.41	0.29	—	282	14.7	51.57
0.36	—	369	7.6	42.67	0.37	—	241	7.3	42.10	0.35	—	137	7.7	43.82
0.41	—	177	3.6	38.87	0.42	—	121	3.7	38.36	0.40	—	76	4.3	39.92
0.46	—	411	8.4	35.41	0.47	—	289	8.8	34.94	0.45	—	129	7.2	35.89
0.50	—	172	3.5	32.70	0.51	—	81	2.5	32.26	0.53	—	113	6.3	31.00
0.55	—	370	7.6	29.95	0.55	—	228	6.9	29.95					
0.60	—	104	2.1	27.97	0.60	—	56	1.7	27.97					
0.65	—	332	6.8	25.82	0.65	—	227	6.9	25.82					
0.72	—	189	3.9	22.77	0.72	—	95	2.9	22.77					
0.76	—	52	1.1	21.50										
0.81	—	172	3.5	18.40										
0.87	—	194	4.0	15.06										

Figura 11: Análise densitométrica do gel SDS-PAGE. Controle (A), AH (B) e AH+AC (C)

A Figura 12 (A, B e C) mostra a separação das proteínas de MP no gel 2D. No gel controle foram encontrados 22 *spots*, no AH e 15 *spots* e no AH+AC 8 *spots*. O AH+AC inibiu a expressão das proteínas em 63% em relação ao controle, e para o AH essa inibição foi de 31,2%. Observa-se que o tratamento com o AH+AC suprime muitas proteínas, tais proteínas poderiam estar envolvidas com certas rotas metabólicas impedindo a sua ativação, e que quando suprimidas levaram ao maior desenvolvimento radicular.

Segundo Nannipieri et al.1993, as SH aumentam a respiração e a velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs, resultando em um aumento da produção de ATP. Canellas et al, (2002) e Façanha et al., (2002) mostraram que os AH estimulam as H⁺-ATPase de MP e esse processo está diretamente envolvido com dois mecanismos fundamentais do desenvolvimento vegetal: a energização de sistemas secundários de translocação de íons e o aumento da plasticidade da parede celular para possibilitar o processo de crescimento e divisão celular, que está relacionado com a teoria do crescimento ácido que postula um aumento da extrusão de prótons mediado pela H⁺-ATPase, promovendo a acidificação do apoplasto, ativando enzimas específicas que atuam

sobre a parede celular aumentando sua plasticidade e, conseqüentemente, permitindo o alongamento celular (Rayle e Cleland, 1992).

Analisando a influência de SH de alta massa molecular na atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo, absorção e assimilação do N em duas espécies de *Pinus*, Panuccio et al. (2001), verificaram que as SH estimularam a absorção de NH_4^+ , enquanto que a absorção de NO_3^- não foi afetada, e a assimilação do NH_4^+ foi afetada diferentemente nas espécies estudadas. Para as plântulas de *Pinus laricio* apenas a atividade da malato desidrogenase nas folhas foi aumentada, enquanto que nas plântulas de *Pinus pinaster* houve um aumento das atividades da glutamato desidrogenase nas folhas e da fosfoenolpiruvato carboxilase nos ramos e folhas.

Um estudo realizado por Carletti et al., (2008), mostrou que plântulas de milho quando tratadas com SH, apresentaram inibição de várias proteínas envolvidas em diferentes rotas metabólicas. Nesse estudo foi constatado que além de indução das H^+ -ATPase pelas SH outras proteínas envolvidas no transporte celular aumentaram sua expressão como as anexinas, e para proteínas envolvidas na sinalização celular como a proteína quinase Ca-dependente, proteína 14-3-3 e a lipoxigenase foram inibidas. Isso afirma que os AH realmente modificam o perfil protéico, portanto os *spots* do presente trabalho que apresentaram expressões protéicas diferenciadas serão alvos para futuras pesquisas, como a identificação destas proteínas e para elucidar quais rotas metabólicas que os AH mais atuam.

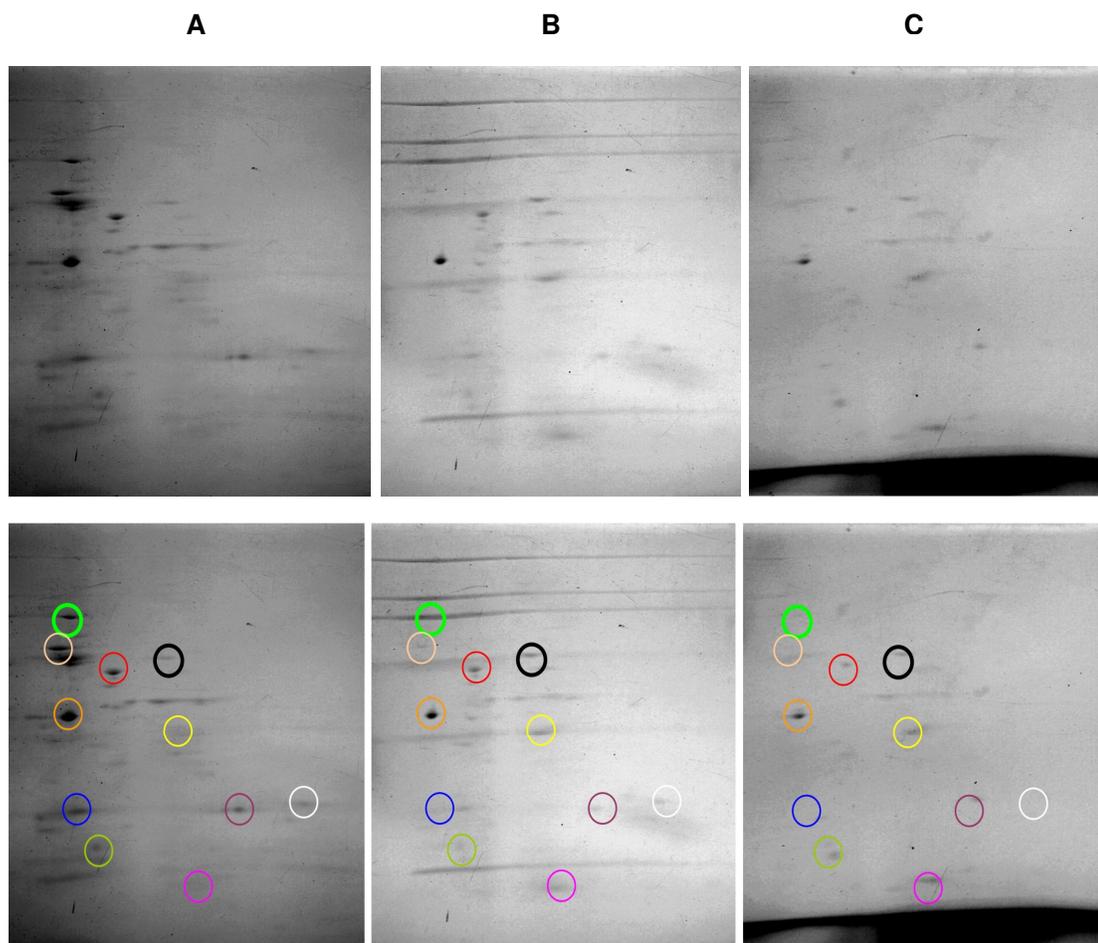


Figura 12. Gel 2D de proteínas isoladas de MP de raízes de milho. Controle (A); AH (B); e AH + AC (C), os círculos da mesma cor marcam os spots que apresentam as principais diferenças entre o controle e os tratamentos.

7. RESUMO E CONCLUSÕES

1- A presença de um sistema radicular ramificado com grande abundância de raízes laterais é fundamental para o crescimento de plantas. O maior volume de solo explorado é uma adaptação importante no caso de solos com baixo conteúdo de nutrientes e capacidade de troca de cátions.

2- A adição de ácido cítrico à solução de AH foi capaz de aumentar a bioatividade dos AH notadamente sobre a atividade das bombas de prótons apontando para um processo de inovação tecnológica para a produção de insumos biológicos para a agricultura. Os resultados obtidos mostram que os AH em solução com ácido cítrico (AC) aumentam a promoção do crescimento das raízes laterais (126%), da área radicular (58%), número de raízes laterais (55%), porém não foram diferentes da solução contendo apenas AH. A maior atividade da bomba de H^+ (374%) foi obtida com AC+AH em solução. Esses resultados estão de acordo com a conformação supramolecular das SH, uma vez que pequena adição de AC pode desestruturar a agregação húmica e liberar substâncias bioativas contidas no interior do agregado húmico.

3- Ocorreram mudanças no perfil padrão de expressão protéica, os AH suprimiram várias proteínas, e em conjunto com o AC essa supressão se tornou mais evidente, mostrando que o AC interage com os AH, liberando os compostos que agem no metabolismo celular, promovendo o desenvolvimento radicular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar N. O., Canellas, L. P., Dobbss, L. B., Zandonadi, D. B., Olivares, F. L. e Façanha, A. R. (2009). Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*.
- Bottomley, W.B. (1917) Some effects of organic growth-promotion substances (auximones) on the growth of *Lemna minor* in mineral cultural solutions. *Proc. Royal Soc. Lond. (Biol.)*, 89: 481-505.
- Bozzo, S., Retamal, C. (1991) Geles unidimensionales. Un nuevo método densitométrico para computadores personales. *Arch. Biol. Med. Exp.*, 24: 181.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. E Jones, R.L. (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *Amer. Soc. Plant Physiologist*, Rockville, MD.
- Canellas, L. P., Zandonadi, D. B., Médici, L. O., Peres, L. E. P., Olivares, F. L. e Façanha, A. R. (2005). *In: Humosfera: tratado sobre a química das substancias húmicas*. Canellas, L.P., e Santos, G. A., 309p.
- Canellas, L.P., Façanha, A. R. (2004) Chemical nature of soil humified fractions and their bioactivity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n.3, p.233-240, mar.

- 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*, 1951-1957.
- Canellas, L.P., Piccolo A., Dobbss, L. B., Spaccini, R., Olivares, F. L., Zandonadi, D. B., Façanha, A. R. (2010). Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*
- Canellas, L.P., Zandonadi, D.B., Busato, J.G., Baldotto, M.A., Simoes, M.L., Martin-Neto, L., Façanha, A.R., Spaccini, R., Piccolo, A. (2008) Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. *Soil Science*: 173: 1-10.
- Canellas, L.P., Zandonadi, D.B., Olivares, F.L., Façanha, A.R. (2006) Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às H⁺-ATPases. In: *Nutrição Mineral de Plantas*. Fernandes, M.S. (Ed.). p. 175-200,.
- Canellas, L.P.; Mendonça, E.S.; Dobbss, L.B.; Baldotto, M.A.; Velloso, A.C.X. e Amaral-Sobrinho, N.M.B. (2008b) Reações da matéria orgânica. In.: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. Fundamentos da matéria orgânica do solo: *Ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2^a ed. Porto alegre: Metrópole. 1: 45-53..
- Canellas, L.P.; Teixeira Junior, L.R.L.; Dobbss, L.B.; Silva, C.A.; Médici, L.O.; Zandonadi, D.B. e Façanha, A.R. (2008a) Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Annals Applied Biol.*, 153: 157–166,
- Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. (1980) Biophysical Chemistry. Part I: *The Conformation of Biological Macromolecules* Freeman and Co.: New York; p 144.
- Carletti, P., Mais, A., Spolaore, B., De Laureto, P.P., De Zorzi, M., Turetta, Ferretti, M.,L., e Nardi, S. (2008) Protein expression changes in maize roots in response to humic substances. *Chem Ecol.* 34: 804-818.

- Cesco, S.; Romheld, V., Varanini, Z., Pinton, R. (2002) Uptake of Fe-59 from soluble Fe-59-humate complexes by cucumber and barley plants. *Plant Soil*, 241: 121-128,.
- Chen, Y.; Aviad, T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: Maccarthy, P.; Capp, C.E.; Malcolm, R.L. e Bloom, P.R., eds. Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. Madison, *American Society of America*, p. 161-186.
- Conte, P., Spaccini, R., Šmejkalová, D., Nebbioso, A., Piccolo, A., (2007). Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite humic acids. *Chemosphere* 69, 1032–1039.
- Conte, P. e Piccolo, A. (1999) High pressure size exclusion chromatography (HPSEC) of humic substances. Molecular sizes, analytical parameters, and columns performance. *Chemosphere* 38:517-528,
- Cosgrove, D.J. (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* 38,109-124.
- Cosgrove, D.J. (1998) Cell Wall Loosening by expansins, *Plant Physiology*, 118:333-339.
- Creighton, T.E. (1983) Proteins: Structures and Molecular Principles. W.H. *Freeman*, New York.
- Darnell, J., Lodish, H., e Baltimore, D. (1995). *Molecular Cell Biology*, 3^{ed}. Scientific American Books, W.H. Freeman, New York.
- De Michelis, M. I., Spanswick, R. M. (1986), H⁺-pumping drive by vanadate sensitive ATPase in membran vesicles from corns roots. *Plant Physiology* 81:542-547.
- Dell’Agnola, G., Nardi, S. On overview of earthworm activity in the soil. In: Bonvicini Pagliai A.M., Omodeo P. (1987), *On earthworms selected symposia and monographs*. Part 2. Mucchi Editore, Modena, Italy, p. 103-112,.

- Dobbss, L.B., Medici, L.O., Peres, L.E.P., Pino-Nunes, L.E., Rumjanek, V.M., Façanha, A.R., Canellas, L.P., (2007). Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols. *Ann. Appl. Biol.* 151, 199–211.
- Ephritikhine G., Ferro, M., Rolland, N. (2004) Plant membrane proteomics. *Plant Physiology and Biochemistry* 42 943–962.
- Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz-filho, R., Oliveira, M.A. Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37, 1301-1310.
- Fiske, C.F., Subbarow, Y. (1925) The colorometric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375,.
- Frias, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Culianez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, A., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8: 1533-1544.
- Gorg, A; Postel, W; Westermeier, R (1980) Gel gradient electrophoresis, isoelectric-focusing and two-dimensional techniques *In Horizontal, Ultrathin Polyacrylamide Layers. Journal of Biochemical and Biophysical Methods* : 273-284.
- Gunning, B. E.S., e Steer, MW. (1996) *Plant Cell Biology: Structure and Function of Plant Cells*. Jones and Bartlett, Boston.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and raip synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPases. *Planta* 185:527-537
- Jahn, T.; Baluska, F.; Michalke, W.; Harper, J.F.; Volkmann, D. (1998) Plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiologia Plantarum*, 104: 311-316

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature*, 227: 680-685.
- López-Bucio, J.; Cruz-Ramírez, A. & Herrera-Estrella, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biol.*, 6: 280-287, 2003
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Garcia, C. (1999) Soil agroecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores Technol.*, 59: 199-206.
- Morsomme, P., Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica*, 1465: 1-16,.
- Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F., Nardi, S. (1999). Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. Biochem.*, 31: 1303–1311.
- Muscolo, A., Cutrupi, S., Nardi, S. (1998). IAA detection in humic substances. *Soil Biology e Biochemistry*, 30: 1199-1201.
- Muscolo, A., Nardi, S. (1997). Auxin or auxin-like activity of humic matter. In: Drozd, J., Gonet, S.S., Senesi, N., Weber, J. (eds.), *The Role of Humic Substances in the Ecosystems and Environmental Protection. Polish Society of Humic Substances*, Wroclaw, Poland, p. 987–992.
- Nannipieri, P.; Grego, S.; Dellagnola, G.; Nardi.S. (1993) Proprieta biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. *Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agrnomici, chimici, ecologici, ecologie selvicolturali*. Bologna,
- Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A., Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1527-1536.
- Nardi, S., Concheri, G., Dell'Agnola, G. (1996). Biological activity of humus. In: Piccolo, A. (ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Elsevier*, New York, p. 361–40, .
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975 May 25;250(10):4007–4021

- Ohno, T., Nakahira, S., Suzuki, Y., Kani, T., Hara, T., Koyama, H., (2004). Molecular characterization of plasma membrane H⁺-ATPase in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion. *Plant Physiol.* 122, 265–274. 707
- Panuccio, M.R.; Muscolo, A.; Nardi, S. (2001) Effect of humic substances on nitrogen uptake and assimilation in two species of Pinus. *Journal of Plant Nutrition*, v.24, p.623-704.
- Parry, G., Estelle, M. (2006) Auxin receptors: a new role for F-box proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 18:152-156.
- Piccolo, A. (1997) New Insights on the conformational structure of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. In: Drozd, J; Gonet, S.S., Senesi, N.; Weber, J. (eds). The role of humic substances in the ecosystems and in environmental protection. Wroclaw, *Polish Society of Humic Substances*, p. 19-38.
- Piccolo, A., Nardi, S. e Concheri, G. (1996).Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *European J. of Soil Sci.* 47: 319 – 328.
- Piccolo. A. (2002) The Supramolecular Structure Humic Substances: A Novel Undersand of Humus Chemistry and Implications in *Soil Science*. *Adv. Agron.*, 75: 57-134.
- Puglisi, E., Fragoulis, G., Del Re, A.M., Spaccini, R., Gigliotti, G., Said-Pullicino, D., Trevisan, M., (2008). Carbon deposition in soil rhizosphere following amendments with soluble fractions, as evaluated by combined soil-plant rhizobox and reporter gene systems. *Chemosphere* 73, 1292–1299.
- Quaggiotti S, Ruperti B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot.* 55: 803-813.
- Rayle, D. L. Cleand, R (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99: 1271-1274.

- Retamal C., Thiebaut P, Alves E. W. (1999). Protein Purification from Polyacrylamide Gels by Sonication Extraction. *Analytical Biochemistry* 268, 15–20.
- Rodda, M.R.C., Canellas, L.P., Façanha, A.R., Zandonadi, D.B., Guerra, J.G.M., Almeida, D.L. de; Santos, G.A. (2006a). Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - Efeito da concentração. *R. Bras. Ci. Solo*, 30: 649-656.
- Rodda, M.R.C.; Canellas, L.P.; Façanha, A.R.; Zandonadi, D.B.; Guerra, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. DE; Santos; G.A. (2006b) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. II - efeito da fonte de vermicomposto. *R. Bras. Ci. Solo*, 30: 657-664,.
- Satterlee, J.S., Sussman M.R. (1998) Unusual Membrane-Associated Protein Kinases in Higher Plants. *J. Membrane Biol.* 164, 205–213.
- Simpson, A. J. (2002). Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chem.*, 40: S72 - S82,
- Singer, S.J. e Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731
- Sorin, C., Bussell, J.D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G. (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *Plant Cell*, 17: 1343-1359.
- Spaccini, R.; Piccolo, A.; Conte, P.; Haberhauer, G. & Gerzabek, M. H. Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biol. and Biochem.* 34: 1839-1851 , 2002.
- Stevenson, J.F. (ed.) (1994) Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2nd ed., New York: *John Wiley e Sons INC.*, 496p.
- Sutton, R. e Sposito, G. (2005) Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 9009 -9015,.

- Taiz, L. e Zeiger, E. (2009). *Fisiologia Vegetal*, 4ed – Porto Alegre: Artmet,
- Tomasi, N., Kretschmar, T., Espen, L., Weisskopf, L., Thoe Fuglsang, A., Palmgren, G., Neumann, G., Varanini, Z., Pinton, R., Martinoia, E., Cesco, E., (2009). Plasma membrane H⁺-ATPase-dependent citrate exudation from cluster roots of phosphate-deficient white lupin. *Plant Cell Environ.* 32, 465–475.
- Torrey, J.G. (1986) Endogenous and exogenous influences on the regulation of lateral root formation. *Developments in plant and soil sciences*, Kluwer, 20: 31- 66.
- Vaughan, D. Malcolm, R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological process. In: Vaughan, D., Malcom, R.E. (eds), *Soil Organic Matter and Biooical Activity. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers*, p. 37-75.
- Varanini, Z., Pinton, R., De Biase, M.G., Astolfi, S., Maggioni, A. (1993) Low molecular weight humic substances stimulate H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant and Soil* 153:61-69.
- Vinceslas-Akpa, M., Loquet, M. (1997). Organic matter transformations in lignocellulosic waste products composted or vermicomposted (*Eisenia fetida* Andrei): chemical analysis and ¹³C CPMAS NMR spectroscopy. *Soil Biol Biochem.*, 29: 751–758.
- Visser, S.A. (1987). Effect of humic substances on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Sci. Total Environ.*, 62:347-354.
- 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):1583-95.