

ALTERAÇÃO NO PERFIL DE EXSUDAÇÃO EM PLÂNTULAS DE
MILHO TRATADAS COM ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS
PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

LÍVIA DA SILVA LIMA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Março – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 066/2014

Lima, Livia da Silva

Alteração no perfil de exsudação em plântulas de milho tratadas com ácidos húmicos e bactérias promotoras do crescimento vegetal / Livia da Silva Lima. – 2014.
93 f.

Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas.
Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.
Bibliografia: f. 59 – 69.

1. *H. serepedicae* 2. Interação endofítica 3. Substâncias húmicas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 631.417

ALTERAÇÃO NO PERFIL DE EXSUDAÇÃO EM PLÂNTULAS DE
MILHO TRATADAS COM ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS
PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

LÍVIA DA SILVA LIMA

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 Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof.: Luciano Pasqualoto Canellas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2014

ALTERAÇÃO NO PERFIL DE EXSUDAÇÃO EM PLÂNTULAS DE
MILHO TRATADAS COM ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS
PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

LÍVIA DA SILVA LIMA

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 Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 20 de março de 2014

Comissão Examinadora

Prof. Leonardo Barros Dobbss (D.Sc., Produção Vegetal) - UVV

Prof. Rodrigo Rodrigues de Oliveira (D. Sc., Química de produtos naturais) –
UENF

Prof. Inga Gonçalves Azevedo (D. Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF

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

Ao meu filho João Miguel por trazer alegria e força para continuar em frente;
Ao meu companheiro Gonzaga pelo amor e apoio;
À minha família,
DEDICO

Agradecimentos

Ao professor Luciano Canellas, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelas críticas pela amizade;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pelo apoio ao ensino e à pesquisa;

A FAPERJ pela concessão da bolsa de estudos;

Ao NUDIBA, pelo suporte à pesquisa;

Ao professor Rodrigo Rodrigues e à professora Raquel García, pela contribuição nas análises de RMN;

Ao professor Fábio Olivares, pela concessão dos inóculos microbianos;

A todos os colegas e amigos do Nudiba, especialmente Lelly, Natália Aguiar, Silézio, Aminthia, Inga, Pollyanna, Jucimara, Nathália Duarte e Kamillinha, por todos os momentos agradáveis de alegria e companheirismo;

A família Barbé e família Marcon-Aguiar, por toda amizade e todo amparo, por terem sido minha família em Campos;

Aos amigos e à família, que torcem muito por mim,

Ao Gonzaga, por todo suporte na nossa casa;

Gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Exsudação radicular	4
2.2 Métodos de coleta de exsudados.....	12
2.3 SH e sua influência no metabolismo e exsudação radicular das plantas.....	15
2.4 Mudanças no perfil de exsudação por interações planta-solo-microrganismos e o envolvimento de SH.....	18
3. HIPÓTESE E OBJETIVO.....	20
3.1 Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Extração das substâncias húmicas.....	22
4.2 Obtenção dos inóculos microbianos (<i>Herbaspirillum seropedicae</i>).....	23
4.3 Condições de cultivo.....	23
4.4 Coleta dos exsudados radiculares.....	24
4.5 Ressonância magnética nuclear (RMN ¹ H)	24
4.6 Análise dos componentes principais.....	25
4.7 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	26

4.8 Contagem da população bacteriana inoculada na raiz.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Infecção dos tecidos radiculares.....	28
5.2 Rendimento dos exsudados radiculares.....	30
5.3 Ressonância magnética nuclear ¹ H e análise dos componentes principais (ACP).....	31
5.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS).....	41
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
APÊNDICE.....	70

RESUMO

LIMA, Livia da Silva. Dissertação de mestrado – Produção vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2014. Alteração no perfil de exsudação em plantas tratadas com ácidos húmicos e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas.

A exsudação radicular é um passo essencial para a adaptação das plantas a diferentes ambientes e inclui a regulação da interação entre plantas e bactérias na rizosfera. Já foi observado que as substâncias húmicas promovem mudanças na exsudação de H^+ e nos ácidos orgânicos por raízes de plantas de milho. A hipótese foi que *H. seropedicae* e ácidos húmicos podem modificar o perfil de exsudação de raízes de plântulas de milho e a identificação dessas alterações pode ser utilizada para melhorar o ambiente químico a fim de aumentar o desempenho do crescimento de bactérias promotoras do crescimento vegetal que possam ser utilizadas como bioinoculantes. Foram coletados os exsudados de raízes de plântulas de milho aos 7, 14 e 21 dias de tratamento (controle, ácidos húmicos, *H. seropediace* e a combinação de ácidos húmicos e *H.*

seropedicae) colocando-as em água ultrapura durante duas horas. Após esse período, as soluções recolhidas foram filtradas (0,22 µm), submetidas à cromatografia líquida, utilizando-se uma coluna preenchida com sílica C18 de fase reversa como fase estacionária, e analisadas por espectroscopia de RMN ¹H. As diferenças foram reconhecidas por análise multivariada de dados (ACP) e os principais compostos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os principais grupos estruturais encontrados significativamente foram os compostos nitrogenados, ácidos graxos, ácidos orgânicos e derivados de esteroides e terpenos. Mudanças significativas no perfil de exsudação foram encontradas após 14 dias. Plântulas tratadas com ácidos húmicos exsudaram ácidos graxos, fenóis e ácidos orgânicos em quantidades diferentes em comparação aos outros tratamentos, já *H. seropedicae* e *H. seropedicae* + ácidos húmicos exsudaram maiores quantidades de compostos nitrogenados, principalmente estruturas heterocíclicas. Aos 21 dias, o tratamento com *H. seropedicae*, apresentou maiores quantidades de esteroides e terpenos relacionados com precursores de ácidos giberélicos (ácido caurenóico). Mudanças no perfil de exsudação induzidas pelos tratamentos foram mais evidentes aos 14 e 21 dias após a aplicação e resultaram em maior exsudação de ácidos graxos em tratamentos com ácidos húmicos, assim como compostos nitrogenados e terpenos pelos tratamentos com *H. seropedicae*. O entendimento da influência dos inoculantes bacterianos e tratamentos com substâncias húmicas nos exsudados de plantas pode ser uma importante ferramenta para a compreensão do metabolismo das plantas em resposta ao bioinoculante e melhorar o resultado das culturas de campo.

Palavras-chave: *H. seropedicae*, interação endofítica e substâncias húmicas.

ABSTRACT

LIMA, Lívia da Silva. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2014. Changes in the profile of exudation in plants treated with humic acids and plant growth promoting bacteria.

Root exudation is essential in the adaptation of plants to different environments and includes the regulation of the interaction between plants and bacteria in the rhizosphere. It was previously observed that humic matter changes H⁺ and organic acids extrusion in maize roots. The hypothesis is that *H. seropedicae* and humic acids modify the maize seedling exudation profile and the identification of these changes could be used to improve chemical environment for better performance of plant growth promoting bacteria delivered as bioinoculants. Maize root exudates were collected at 7, 14 and 21 days after treatments (control, humic acid, bacteria and its combination) by placing roots in ultrapure water for two hours. After this time, the exudate solutions were filtered (0.22 µm), submitted to liquid chromatography using C18 reverse phase as stationary phase, and analyzed by ¹H NMR spectroscopy. The main differences were visualized by

multivariate projection analysis (PCA) and the main compounds were identified by gas chromatography mass spectrometry. Nitrogenous compounds, fatty acids, organic acids and steroids and terpenoids derivatives were the main structural moieties founded in root exudates. Significant changes in exudation pattern were observed after fourteen days. Seedlings treated with humic acids exuded fatty acids, phenols and organic acids in different amounts compared to other treatments whereas *H. seropedicae* and *H. seropedicae* + humic acids exudates included a large number of nitrogenous compounds mainly with heterocyclic structures. At 21 days, the treatments with *H. seropedicae* showed higher amount of steroid and terpenoids derivatives related to precursors of giberellic acids (kaurenoic acids). Changes on root exudation profile induced by the treatments were more noticeable at 14 and 21 days after application and resulted in enhanced of fatty acid exudation from HA treatment as well nitrogenated and terpenes compounds from *H. seropedicae* treatment. Knowledge about influence of bacterial inoculants and treatment with humates on plant exudates could be important to understand the plant metabolism response to bioinoculants and improve crop field responses.

Keywords: plant growth promoter bacterial; endophytic, humic substances

1. INTRODUÇÃO

As substâncias químicas secretadas pelas raízes no solo são conhecidas como exsudados (Bais et al., 2002). A exsudação de compostos orgânicos e inorgânicos é um dos principais mecanismos de adaptação das plantas ao ambiente. Compostos exsudados na rizosfera podem regular a atividade da comunidade microbiana, induzir resistência a herbívoros, estimular simbioses, modificar propriedades químicas e físicas do solo, e inibir o crescimento de espécies de plantas concorrentes (Nardi et al, 2000).

A composição e a quantidade de exsudados liberados pelas raízes dependem de vários fatores, entre eles a espécie e a idade da planta, além de fatores externos como os estresses bióticos e abióticos (Badri & Vivanco, 2009). Por exemplo, a composição dos exsudados radiculares de plantas de milho (*Zea mays* L. cv Alize), foi estudada por Azaizeh et al. (1995), que encontraram açúcares, (72-73%), fenóis (17-18%), ácidos orgânicos (7%) e aminoácidos (3%), além de outros compostos liberados em quantidades muito pequenas como ácidos graxos, esteroides, enzimas e reguladores de crescimento de plantas (p.e., auxinas, giberelinas e citocininas) (Neumann e Römheld, 2007). A exsudação altera a composição da matéria orgânica na rizosfera fornecendo compostos lábeis e prontamente utilizados por microrganismos no fornecimento de energia

(carboidratos) e de nitrogênio (aminoácidos) enquanto os produtos do metabolismo secundário podem funcionar como antibióticos (fenóis) e induzir crescimento vegetal (hormônios).

A maior parte da matéria orgânica do solo é composta pelas substâncias húmicas (SH) definidas por Piccolo (2002) como a reunião heterogênea de diversas moléculas de baixa massa molecular, oriundas do produto da transformação de resíduos de origem vegetal e animal e produtos da ressíntese microbiana, em um complexo arranjo supramolecular mantido unido por forças de interação fraca predominantemente hidrofóbicas. As SH além de condicionarem as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (Stevenson 1994) podem modificar diretamente o metabolismo das plantas (Vaughan & Malcolm, 1985). Canellas et al. (2002), observaram aumento na atividade ATPásica em raízes de milho tratadas com substâncias do tipo ácidos húmicos (AH) isolados de vermicomposto. Também foram observadas mudanças no perfil de exsudação radicular de ácidos orgânicos (Canellas et al., 2008) com aumento significativo de ácidos cítrico, succínico e oxálico na solução de cultivo em plantas previamente tratadas com substâncias do tipo húmicas. A adição de pequenas quantidades de ácidos orgânicos, tais como, os exsudados pelas raízes pode liberar componentes dos agregados húmicos (Piccolo et al., 1999; Cozzolino et al., 2001). Rima et al. (2011), verificaram que a adição de concentrações muito baixas (0,5 μM) de ácido cítrico potencializou a capacidade de estimulação do crescimento radicular de plântulas de milho pelos AH, e principalmente, induziu a inibição de uma série de proteínas de MP modificando o metabolismo celular das raízes. Mudanças no perfil de exsudação podem modificar as características da matéria orgânica humificada e aumentar seu potencial de bioestimulação como, por exemplo, aumentando a emergência de raízes laterais. Além disso, mudanças químicas induzidas pela adição de matéria húmica na rizosfera foram associadas à seleção da comunidade microbiana (Puglisi et al., 2009). A rizodeposição, é um processo ecológico importante, pois fornece fontes de carbono prontamente disponíveis aos microrganismos e pode gerar aumento da biomassa microbiana em torno das raízes e afetar tanto a atividade como a composição da comunidade microbiana (Puglisi et al., 2009).

Alguns microrganismos são capazes de promover o crescimento vegetal pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de compostos similares aos

hormônios vegetais, solubilização e disponibilização de nutrientes, produção de antibióticos. Esses microrganismos são conhecidos como promotores do crescimento vegetal e são considerados base para a nova geração de bioinoculantes em plantas não leguminosas. A *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria diazotrófica endofítica capaz de colonizar um grande número de plantas como cana-de-açúcar, milho, arroz e promover aumento na eficiência da utilização do nitrogênio pelas plantas (Baldani et al., 2000). Canellas et al. (2012), observaram que a inoculação com *H. seropedicae* em milho na presença de SH isolada de vermicomposto aumentou a emergência de raízes laterais no estágio inicial de crescimento das plântulas. Foi observado também, uma clara estimulação da H⁺ ATPase de MP e modificação significativa no metabolismo de carboidratos e nitrogênio.

Nesse contexto é possível que alterações provocadas no metabolismo das plantas pelas SH e BPCV possam modificar a exsudação de compostos na rizosfera e, conseqüentemente, alterar o padrão da interação planta-microrganismo. Entender os mecanismos dessa interação pode ser útil para melhorar as respostas das plantas a diferentes bioinoculantes.

Neste trabalho foram avaliadas as mudanças no perfil de exsudação dos compostos liberados por raízes de plântulas de milho (*Zea mays* L.) promovidas por ácidos húmicos e *Herbaspirillum seropedicae* aos 7, 14 e 21 dias de tratamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Exsudação radicular

As substâncias químicas secretadas no solo pelas raízes são conhecidas genericamente como exsudados. Com a exsudação de uma grande variedade de substâncias, as plantas podem, entre outros efeitos, regular a comunidade microbiana da rizosfera, lidar com herbívoros, favorecer simbioses, mudar as propriedades químicas e físicas do solo, e inibir o crescimento de espécies de plantas concorrentes (Nardi et al., 2000). Os exsudados podem também diminuir os efeitos de toxidez de alumínio (Al^{3+}) e de outros metais pesados (Kidd et al., 2001), favorecer a absorção de nutrientes e a liberação de hormônios vegetais (Uren et al., 1988; Marschener et al., 1998), além de servir como sinalizadores para o estabelecimento de simbioses com rizóbios e fungos micorrízicos (Badri & Vivanco, 2009).

Apesar de sua importância, existem relativamente poucos relatos sobre a composição e a proporção dos diferentes compostos exsudados pelas plantas (Oburger et al., 2012). Um desses é o de Azaizeh et al. (1995), que estudaram a composição de exsudados de milho (*Zea Mays* L. cv Alize) e verificaram a presença de açúcares (72-73%), fenóis (17-18%), ácidos orgânicos (7%) e

aminoácidos (3%), além de outras substâncias liberadas em pequenas quantidades, como hormônios, esteroides, ácidos graxos e enzimas. A quantidade e a classe dos compostos exsudados são determinadas pela idade, pela espécie da planta e pelos fatores externos como estresse biótico e abiótico (Badri & Vivanco, 2009).

A idade das plantas interfere diretamente na composição e quantidade de compostos exsudados. Embora seja difícil quantificar o total de carbono fixado fotossinteticamente que é transferido para a rizosfera em forma de exsudados, estima-se que plântulas liberam cerca de 30-40% de suas emissões de carbono fixado como exsudados (Whipps et al., 1990) e plantas adultas cerca de 5% a 21%. Nguyen et al. (2003), relataram que na partição do ^{14}C de fotoassimilados para raízes, respiração rizosférica e resíduos do solo diminuíram com a idade da planta (28 a 600 dias) 43%, 28% e 20%, respectivamente. Keith & Oades (1986) mediram a quantidade relativa de carbono translocado para as raízes e para a rizosfera, em diferentes estágios de desenvolvimento de trigo cultivado no campo e verificaram que com o decorrer do tempo menos carbono do total fotossintetizado foi transportado para o solo, ocorrendo acentuado decréscimo após a floração. Já em Aulakh et al. (2001), foram avaliadas em dez cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) as taxas de exsudação de carbono total (carboidratos e ácidos orgânicos) em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, sendo verificado em geral, que as taxas de exsudação foram menores na fase de plântula, aumentando até a floração e diminuindo na fase de maturação da planta. Além disso, houve uma mudança no perfil da exsudação com o avançar do crescimento da planta, secretando mais carboidratos do que ácidos orgânicos com o decorrer do tempo, sugerindo assim que, além da idade da planta, espécies diferentes possuem perfis de exsudação diferentes.

Em um dos primeiros trabalhos realizados comparando quantitativamente compostos exsudados entre espécies diferentes de plantas, Rovira (1956) verificou que em 21 dias de crescimento plantas de ervilha exsudaram 22 aminoácidos diferentes enquanto que plantas de aveia exsudaram 14. Além disso, verificou-se que em relação aos carboidratos, as duas espécies de plantas somente exsudaram frutose e glicose até os dez dias de crescimento.

Algumas espécies de plantas leguminosas, exsudam flavonoides e isoflavonoides específicos, que ativam genes responsáveis pela nodulação e que

promovem a quimiotaxia, ou seja, a aproximação de rizóbios para as raízes dessas plantas, gerando uma relação simbiótica, em que as plantas se beneficiam da fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Bais et al., 2006). Já outras espécies de plantas, como, por exemplo, as Poaceas, exsudam carboidratos e aminoácidos que são fonte de energia e nutrientes para microrganismos, aumentando a população de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) na rizosfera (Gray & Smith, 2005), além disso, esses compostos exsudados aumentam a direção dos microrganismos à rizosfera por ativação de movimentos flagelares. Weert et al. (2002) verificaram que a exsudação de alguns ácidos orgânicos como málico, piroglutâmico, succínico e fumárico e aminoácidos como ácido L-aspártico, ácido L- glutâmico, L- isoleucina, L- leucina e L- lisina por plantas de tomate, influencia a motilidade flagelar de *Pseudomonas fluorescens*. Essa aproximação de BPCV beneficia as plantas, pois essas bactérias atuam na FBN e na biossíntese de hormônios vegetais, como a auxina (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Lesuffleur et al. (2007), avaliaram as taxas de liberação de aminoácidos (glicina e serina) em seis diferentes espécies de plantas pertencentes a 4 famílias: Poaceas (milho e azevém-perene), Fabacea (trevo e alfafa), Brassicaceae (colza) e Solanaceae (tomate) escolhidas devido a importância econômica, diferenças fisiológicas e diferenças nas vias metabólicas de nitrogênio e carboidrato, e foi verificado diferenças no perfil de exsudação entre as famílias de plantas. As Fabaceas possuíram maior efluxo de glicina do que nas Poaceas e o efluxo de serina foi maior nas espécies de trevo, alfafa e colza, indicando que espécies diferentes exsudam quantidades e compostos diferentes.

Alguns fatores abióticos são associados a mudanças no perfil de exsudação das plantas. A fim de se adaptarem a condições adversas como estresse nutricional, toxidez causada por alguns elementos, ambientes alagados (anoxia), temperatura (frio) e intensidade luminosa, plantas exsudam compostos específicos para minimizarem os efeitos causados por esses fatores (Badri & Vivanco, 2009; Bais et al., 2002; Nardi et al, 2000)

Nutrientes como fósforo, potássio, zinco e cobre possuem mobilidade limitada no solo. No caso do fósforo, quando se encontra na forma insolúvel pode ser mobilizado por compostos exsudados pelas raízes, como as fosfatases e os ácidos orgânicos. Além desses compostos, carboidratos podem atuar

indiretamente na solubilização do fósforo, servindo como fonte de carbono para microrganismos solubilizadores (Dimkpa et al., 2009).

A toxidez de alguns elementos prejudiciais para o desenvolvimento vegetal também pode ser minimizada pela exsudação de determinados tipos de compostos. O alumínio (Al^{3+}) é tóxico para muitas plantas em concentrações micromolares. Muitas espécies de plantas desenvolveram mecanismos que possibilitam seu crescimento em solos ácidos, nos quais as concentrações de Al^{3+} podem ser limitantes. Plantas como milho, trigo, algumas cultivares de feijão e soja liberam ácidos orgânicos, como o malato e alguns derivados de ácidos orgânicos como os sais citrato e oxalato, que são capazes de quelar o alumínio formando fortes complexos que protegem as raízes das plantas (Ma et al., 2001).

Plantas que sobrevivem em ambientes alagados e anóxicos, desenvolveram estratégias de adaptação como a formação de aerênquimas, (tecido com grandes espaços de ar que permite melhor difusão de gás nas plantas) (Jackson & Armstrong, 2009) e também a exsudação de compostos específicos que envolvem mudanças rápidas no metabolismo do carbono e transporte de ácidos orgânicos como compostos exsudados na rizosfera (Jones, 2004).

Outra forma de alteração na composição e quantidade de exsudados ocorre quando as zonas ao redor das raízes encontram-se em regiões de baixas temperaturas. Este fator causa mudanças na liberação mediada por difusão pela mudança na velocidade do processo e permeabilidade da membrana (Pinton et al., 2007).

A intensidade luminosa afeta diretamente a composição dos exsudados em uma intensidade de 50 a 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cakmak et al., 1998), pois grande parte do carbono orgânico liberado pelas raízes é derivada da fotossíntese feita pela parte aérea das plantas (Pinton et al. 2007).

Rovira (1959), verificou que a diminuição na intensidade de luz altera a quantidade e composição dos aminoácidos exsudados por plantas de tomate e trevo. Já Cakmak et al. (1998), relacionaram a maior taxa de exsudação de fitosideróforos com alta intensidade de luz, em raízes de cevada e cultivares de trigo deficientes em Fe e Zn. Watt & Evans (1999), verificaram que plantas de tremoço branco quando cultivadas sob condições de hidroponia com baixa

concentração de fósforo, exsudam maiores concentrações de ácido orgânico (ácido cítrico) no período diurno onde há maior taxa de fotossíntese. Este desempenho, pode ser reflexo da maior produção de carboidratos (sacarose) que podem servir como precursores de citrato (Pinton et al. 1997) pela parte aérea das plantas durante o dia.

Rovira (1969), descreveu os compostos orgânicos liberados em quantidades significativas na superfície de raízes jovens e associou-os a processos específicos no solo. Um resumo pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Compostos orgânicos liberados por raízes de plantas

Classe de compostos	Componentes individuais	Funções
Carboidratos	Glicose, frutose, galactose, maltose, arabinose, rafinose, raminose, ribose, sacarose e xilose.	Fornecer um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos.
Aminoácidos e amidas	Todos os 20 aminoácidos proteínogênicos, ácido aminobutírico, homoserina, cistationina, ácido mugineico, fitosideróforos	Inibir nematoides e crescimento de raízes de espécies diferentes além da solubilização de nutrientes como o P e Fe e alguns micronutrientes.
Ácidos alifáticos	Ácido fórmico, acético, butírico, propiónico, maleico, cítrico, isocítrico, oxálico, fumárico, malônico, succínico, tartárico, oxaloacético, pirúvico, glicólico, chiquímico, acetônica, valérico, gluconico.	Regulação do crescimento de plantas e atenuação da toxidez causada por alguns elementos como o Al^{3+} .
Ácidos aromáticos	p-hidroxibenzóico, cafeico, p-coumérico, ferúlico, gálico, gentísico, protocatecoico, salicílico, siríngico, sinápico	Estimulam a aquisição de nutrientes, reduzem o estresse anaeróbico nas raízes, intemperismo mineral e atração de patógenos.
Diversos compostos fenólicos	Flavonoides, flavonas, flavanonas, antocianinas e isoflavonoides.	Estímulo a interações simbióticas entre plantas e microrganismos.
Ácidos graxos	linoleico, linolênico, oleico, palmítico, esteárico.	Regulação do crescimento das plantas.
Esteróis	Campesterol, colesterol, sitosterol, estigmasterol.	Regulação do crescimento de plantas
Enzimas e outros	Proteases, fosfatase ácida, peroxidases, hidrolase, lipase (Badri, 2009)	Solubilização de nutrientes

Adaptado de Rovira (1969) apud Bertin et al., (2003).

Exsudados radiculares podem também ser classificados de acordo com sua massa molecular, ou seja, compostos de baixa massa molecular (< 1000 Da) ou alta massa molecular.

São considerados substâncias de baixa massa molecular (BMM) açúcares e polissacarídeos simples (arabinose, frutose, maltose, glicose, manose, oligossacarídeos), reguladores de crescimento, esteroides, terpenoides, alcaloides, poliacetilenos, aminoácidos (arginina, cisteína, asparagina, cistina, glutamina), ácidos orgânicos (ácido acético, ascórbico, benzoico, ferúlico, ácido málico) e compostos fenólicos. Algumas dessas substâncias, especialmente os fenólicos, influenciam no crescimento e desenvolvimento de plantas e microrganismos do solo pelo efeito quimiotóxico (alelopatia e inibição de crescimento de fungos, por exemplo).

Já os compostos de alta massa molecular alta (AMM) são constituídos por polissacarídeos, proteínas, ácidos graxos, nucleotídeos, taninos e carboidratos que são menos comuns, porém muitas vezes compõem a maior proporção de exsudados radiculares (Rovira, 1969; Hale et al. 1978; Curl & Truelove, 1986; Uren, 1988; Fan et al. 1997; Bais et al. 2006).

Os mecanismos pelos quais as raízes exsudam seus compostos são divididos em processos passivos e ativos. São mediados por três vias principais: difusão, canais iônicos e por transporte de vesículas (Neumann & Römheld 2007; Bertin et al. 2003), além de outras vias como os transportadores ABC.

A difusão é típica para compostos orgânicos de BMM, que são liberados por um processo passivo que envolve gradientes de concentração entre o citoplasma das células das raízes e o solo (Neumann & Römheld, 2007). A permeabilidade da membrana determina se é possível a difusão direta através da bicamada lipídica da membrana plasmática (Bertin et al., 2003). Isto depende do estado fisiológico das células das raízes e da polaridade dos compostos a serem secretados. Os fatores que afetam a integridade da membrana, e consequentemente a difusão, incluem a deficiência de nutrientes (K, P, Zn), as temperaturas extremas e o estresse oxidativo (Cakmak & Marschner, 1988; Jones & Darrah, 1995; Jones et al, 1994; Ratnayale et al, 1978; Rovira, 1969).

Alguns produtos químicos, tais como carboxilatos (citrato, malato, oxalato e fitosideróforos), os quais são normalmente exsudados em elevadas concentrações, não podem difundir-se através das membranas radiculares

quando a raiz está sob estresse específico, como deficiência nutricional ou toxidez por Al^{3+} . Nestes casos, canais de íons controlam a liberação desses produtos pelas raízes. A liberação de ânions carboxilatos através de canais de íons, parece ser frequentemente associada com aumento da liberação de prótons através das H^+ ATPase de membrana plasmática ou do aumento dos canais de K^+ , e provavelmente também a liberação de outros cátions para manter o equilíbrio de carga (Sakaguchi et al., 1999; Zhu et al., 2005; Ryan et al., 1995).

O transporte de compostos de AMM geralmente envolve transporte de vesículas (Battey & Blackbourn, 1993). O transporte de polissacarídeos mucilaginosos através da coifa é mediado por vesículas de Golgi, enquanto que as proteínas, tais como ectoenzimas (fosfatase ácida e peroxidase) são sintetizadas ligadas à membrana dos polissomos e entram no lúmen do retículo endoplasmático usando segregação vetorial (Neumann & Römheld, 1999). Através do complexo de Golgi, as proteínas são separadas daquelas destinadas à compartimentação vacuolar, e são transportadas para a membrana plasmática por transferência de vesículas (Chrispeels, 1991; Chrispeels & Raikhel, 1992). Fenóis (Gagnon et al, 1992; Rougier, 1981), substâncias quelantes (Nishizawa & Mori, 1987), assim como compostos de AMM, são armazenados e liberados usando vesículas, mas os mecanismos exatos utilizados permanecem desconhecidos.

Outro mecanismo de exsudação envolve os transportadores de membrana, tais como os transportadores do tipo ABC que podem ser responsáveis pela liberação de exsudados radiculares. Transportadores ABC utilizam a hidrólise do ATP para o transporte quimicamente ativo e não são relacionados a estruturas de compostos de células (Martinoia et al., 2002). A maior parte dos transportadores ABC de plantas caracterizados até agora são localizados na membrana vacuolar (Theodoulou, 2000). Transportadores ABC estão envolvidos em diversos processos celulares, tais como a excreção de compostos com potencial tóxico, a translocação lipídica, a tolerância aos metais pesados, o transporte de nutrientes, o estresse salino e na resistência a doenças (Balzi & Goffeau, 1994; Szczyepka et al., 1994; Maathuis et al. 2003; Kobae et al., 2006; Stein et al., 2006; Badri et al., 2008).

2.2. Métodos de coleta de exsudados

No estudo da exsudação, a técnica de coleta dos exsudados determina o resultado, sendo, portanto, fundamental estabelecer critérios para a escolha do método a ser utilizado. Muitos trabalhos já foram feitos com diferentes técnicas de coleta de exsudados discutindo-se vantagens e desvantagens. A compreensão da dinâmica dos processos relacionados à rizosfera depende dos procedimentos utilizados para seu estudo (Oburger et al., 2012). A Tabela 2, apresenta um resumo dos métodos comumente utilizados para a amostragem de exsudados radiculares.

Tabela 2: Técnicas convencionais utilizadas para amostragem de exsudatos radiculares e suas vantagens e desvantagens

Crescimento da planta	Amostragem dos exsudados	Vantagens	Desvantagens	Referências
Solução nutritiva (hidroponia)	Solução de captura: H ₂ O, CaCl ₂ , CaSO ₄	<ul style="list-style-type: none"> ● simplicidade; ● ausência de adsorção de exsudatos por partículas do solo; ● degradação microbiana pode ser inibida; 	<ul style="list-style-type: none"> ● baixa concentração de exsudatos; ● sem impedância mecânica; ● diferenças na disponibilidade de nutrientes devido a status redox; ● arquitetura radicular é influenciada pela hidroponia; ● resposta a estresse devido a mudanças no ambiente pode alterar a taxa de exsudatos; 	Hoffand et al. (2006); Liu et al. (2004) Shahbaz et al. (2006) Azaizeh et al. (1995); Hoffand et al. (1989) Liao et al. (2006); Neumann e Romheld (1999); Wouterlood et al. (2004).
Potes/rizotron	Todo sistema radicular: o solo-areia é lavado e as raízes transferidas para uma solução de captura	<ul style="list-style-type: none"> ● plantas crescem no solo; ● ausência de adsorção de exsudatos nas raízes; ● degradação microbiana pode ser inibida; 	<ul style="list-style-type: none"> ● danos às raízes e mudanças abruptas no ambiente podem modificar a exsudação; ● volume grande de amostra com baixa concentração de exsudatos; 	Aulakh et al. (2001) Hayes et al. (2004) Storm et al. (1994)
Colunas de areia/vermiculita/solo	Sistema radicular inteiro: lixiviação em colunas	<ul style="list-style-type: none"> ● condições de crescimento próximas das naturais; ● proliferação natural das raízes; ● não-destrutivo; 	<ul style="list-style-type: none"> ● concentração de exsudatos pode ser alterada por processos de adsorção e pela degradação microbiana; ● volume de amostragem grande com baixa concentração de exsudatos; 	Lesuffleur et al. (2007) Paynel et al. (2001) Sandnes et al. (2005)

(Adaptado de Oburger et al., 2012).

O cultivo de plantas em solução nutritiva (hidroponia) com a subsequente recolha dos exsudatos radiculares tem sido comumente utilizado para evitar

danos mecânicos às raízes, por estar livre de partículas sólidas (Jones, 1998, Personeni et al, 2007). Essa técnica assegura que as taxas de exsudação não sejam superestimadas devido a lesões na raiz, além de não haver risco de degradação microbiana devido à presença de partículas de solo (Jones, 1998). Oburger et al., (2012) concluíram que, apesar do ambiente artificial ser decorrente das técnicas de hidroponia, o método é adequado para triagem geral de reações metabólicas das raízes, porém é recomendado que o cultivo de plantas em solução seja acompanhado por aeração para prevenir o desenvolvimento de condições anaeróbias (Nardi et al., 2005; El-Baz et al., 2004; Tu et al., 2004; Bacilio-Jimenez et al., 2003; Ishikawa et al., 2002).

Existem diferentes maneiras de recolhimento dos exsudados radiculares em meio hidropônico usando diferentes soluções de captura, tais como, a própria solução nutritiva, CaCl_2 , água deionizada e CaSO_4 (Hodge et al., 1996; Lu et al., 1999 e 2000; Aulakh et al., 2001). Além disso, o período de coleta dos exsudados também é um fator importante a ser considerado. Por exemplo, Aulakh et al., (2001), estudaram métodos para o recolhimento de exsudados variando a composição da solução de captura, o tempo de coleta e os seus efeitos sobre a taxa de exsudação e a composição de exsudados radiculares de diferentes cultivares de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.). Eles observaram que após 2 horas começa a diminuição da concentração de exsudados (mais precisamente ácidos orgânicos) nas soluções de captura. Essa diminuição foi atribuída à pequena meia vida das substâncias de baixa massa molecular. O uso da água deionizada como solução de captura promoveu aumento de 20 a 60% na exsudação de compostos orgânicos totais em relação ao CaSO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). O desbalanço osmótico entre a solução do apoplasto e a de água de captura favorece a maior exsudação. O uso da água deionizada pode ser vantajoso no caso de baixas concentrações de exsudados como no estudo com plântulas.

A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de meios de captura de exsudados em plantas crescidas em hidroponia/meio de cultura.

Tabela 3: meios de captura de exsudados em plantas crescidas em hidroponia/meio de cultura.

Idade	Material	Meio de obtenção	Tempo de obtenção	Recuperação dos exsudados	Referência
Plântulas de 5 dias	Milho (<i>Zea Mays</i>)	Água	24 horas	Acetato de etila 3x 1,5L	Awad, et al., 2006
Plântulas de 20 dias	Arabidopsis	Meio líquido Murashige e Skoog	5 dias	Liofilização do meio. Ressuspensão em tampão fosfato pra análise por HPLC	Rudrappa et al., 2008
Plântulas de 10 dias	Arabidopsis	Murashige e Skoog	7, 14, 21, 35 e 48 dias	Partição com hexano	Walker et al., 2003
Plântulas com 20 dias	Arabidopsis	0,8% de placas de agar/água	Os exsudatos foram colhidos por meio da imersão das raízes em 2 mL de água por 1 hora.	HPLC e ESI / MS; compostos fenólicos que foram exsudados pelas raízes foram concentrados utilizando-se colunas descartáveis de 3 mL de C-18	Walker et al., 2003
Diferentes estádios de crescimento	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Solução nutritiva	2, 4 e 6 horas; solução nutritiva, água deionizada ou CaSO ₄ 0,01 M	Carbono orgânico total por digestão. Carboidratos por UV-VIS; ácidos orgânicos HPLC.	Aulakh et al., 2001

2.3. Substâncias húmicas e a sua influência no metabolismo e na exsudação radicular das plantas

A maior parte da matéria orgânica do solo é composta pelas substâncias húmicas (SH) que desempenham múltiplas funções que beneficiam o crescimento e desenvolvimento das plantas (Tan, 1998). O condicionamento das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e os efeitos diretos das SH sobre o metabolismo e a bioquímica das plantas são bem conhecidos (Nardi et al., 2000). Plantas tratadas com SH, possuem aumento no teor de clorofila, que por sua vez pode afetar a taxa fotossintética (Sladky, 1959, Nardi 2002), pela ativação de enzimas relacionadas ao incremento da atividade da fotossíntese (Ferretti et al., 1991). Merlo et al. (1991), verificaram que este efeito positivo das SH foi

observado no metabolismo fotossintético de folhas de milho, onde a diminuição do conteúdo de amido acompanhou o incremento do conteúdo de açúcares solúveis, sugerindo que esta mudança pode ser mediada por variações da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (Nardi et al., 2002).

Diferentes frações húmicas podem afetar a atividade de enzimas relacionadas à glicólise e ao ciclo de Krebs (Muscolo et al., 2007) dependendo da concentração e das características moleculares (Nardi et al., 2007). Além de mudanças no metabolismo de carboidratos foram observados nos estudos de Nardi et al. (2000), que SH de baixa massa molecular (> 3500 Da) são dotadas de atividades semelhantes às do hormônio vegetal giberelina e podem aumentar a absorção de NO_3^- , promovendo a expressão de proteínas responsáveis pelo transporte deste íon (Nardi et al., 2002, Vaughan et al., 1985).

Além disso, essas SH de baixa massa molecular são capazes de aumentar a aquisição de nutrientes e diminuir os efeitos tóxicos de alguns metais por possuírem maior número de grupos funcionais como carboxílicos, fenólicos e aromáticos (Nardi et al., 2007, Nardi et al., 1988, Visser et al., 1986). Outras associações em relação à estimulação metabólica, são os estudos que relatam o aumento da atividade das enzimas H^+ -ATPases de membrana plasmática em decorrência da aplicação de SH em efeito análogo ao promovido pelas auxinas (Canellas et al., 2002, Façanha et al., 2002, Canellas & Façanha, 2004, Zandonadi, et al., 2007).

Devido às alterações no metabolismo primário de plantas tratadas com SH, foi postulado possíveis alterações no metabolismo secundário. Dentre os metabólitos secundários, os mais estudados são os compostos fenólicos (p.e. flavonoides e fenilpropanoides), que são sintetizados pela rota do ácido chiquímico (Cesco et al., 2012) e têm a função de proteger as plantas contra estresses bióticos e abióticos (Dixon & Paiva, 1995).

A fenilalanina amônia-liase (PAL/TAL) destaca-se como uma enzima chave e regulatória da rota de biossíntese dos fenilpropanoides e seus derivados, catalisa a transformação de fenilalanina para ácido trans-cinâmico e tirosina para ácido p-cumárico (Schiavon et al., 2010, Andersen et al., 2007).

Schiavon et al. (2010), verificaram que SH são capazes de alterar a atividade da enzima PAL/TAL. O aumento da expressão dos genes que codificam a PAL/TAL e o aumento nos níveis de compostos fenólicos em plantas de milho

tratadas com determinada concentração de SH, vieram a confirmar esse resultado.

Os ácidos húmicos (AH), são formados por agregados moleculares heterogêneos estabilizados por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Piccolo, 2001). Essas substâncias, têm sido amplamente testadas como promotores de crescimento vegetal, uma vez que podem promover aceleração das taxas de crescimento radicular, incremento de biomassa vegetal e alterações na arquitetura do sistema radicular (incremento da emissão de pelos radiculares e de raízes laterais finas), resultando em aumento da área superficial e, ou, no comprimento do sistema radicular (Pinton et al., 1999; Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004). No entanto, o isolamento de AH de turfas e carvão mineral promove a degradação de ambientes frágeis como as turfeiras e pode exaurir fontes não renováveis. A extração de substâncias do tipo húmicas em compostos e vermicompostos tem se mostrado uma alternativa viável. Em Façanha et al. (2002), verificaram que a presença de grupamentos funcionais com características hormonais e a capacidade de ativar a bomba de prótons da MP são indicadores potenciais da bioatividade dos AH.

Canellas et al. (2008), verificaram que plântulas tratadas com AH de vermicomposto, alteram seu perfil de exsudação de ácidos orgânicos aumentando a concentração de ácido cítrico e oxálico na rizosfera. Em solução, os AH podem liberar parte de seus componentes com a adição de pequenas quantidades de ácidos orgânicos (Piccolo et al., 1999; Cozzolino et al., 2001) tais como os exsudados radiculares. Rima et al. (2011), verificaram que a adição de pequenas concentrações de ácido cítrico potencializou a capacidade de estimulação do crescimento radicular de plântulas de milho pelos AH, e principalmente, induziu a inibição de uma série de proteínas de membrana plasmática modificando o metabolismo das raízes. Além de mudanças no perfil de exsudação de compostos orgânicos, os AH também modificam o perfil de exsudação de compostos inorgânicos como íons H^+ (Canellas et al., 2002).

Devido às alterações no metabolismo primário e secundário, na extrusão de H^+ e de ácidos orgânicos, é possível que ocorram diferenças na composição dos compostos exsudados pelas raízes de plantas de milho tratadas com SH.

2.4. Mudanças no perfil de exsudação por interações planta-solo-microrganismo e o envolvimento de SH

A rizosfera é uma zona biologicamente ativa, onde ocorrem as interações entre planta-solo-microrganismos. A estrutura específica e a diversidade de comunidades bacterianas na rizosfera variam entre espécies de plantas e ao longo do tempo (Baudoin et al., 2003). As zonas diferentes da raiz de uma mesma planta dão suporte para o crescimento de distintas comunidades de microrganismos, refletindo assim diferenças quantitativas e qualitativas na exsudação radicular (Yang & Crowley, 2000). Por exemplo, as plantas podem alterar comunidades rizobacterianas exsudando diferentes substâncias, que podem variar de açúcares até complexas estruturas aromáticas (Kamilova et al. 2006).

Outra forma de atrair microrganismos para a rizosfera é a sinalização química feita pela liberação de determinadas substâncias pelas raízes. Por exemplo, a liberação de isoflavonas por raízes de soja atrai o microrganismo mutualista *Bradyrhizobium japonico* (Bais et al., 2006). O mesmo fenômeno acontece com outras plantas leguminosas, que liberam flavonoides e atraem *Rhizobium meliloti* e são ativados genes responsáveis pela nodulação (Narula et al., 2009). A exsudação de carboidratos e aminoácidos estimula a quimiotaxia de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) para raízes de plantas não leguminosas (Kumar et al., 2007). Um desses processos, é a rizodeposição, que envolve a exsudação de carbono das raízes das plantas para o solo em forma de carbono orgânico prontamente disponível, promovendo um aumento na biomassa microbiana ao redor das raízes, que afeta a atividade e composição de comunidades microbianas (Puglisi et al. 2008). Puglisi et al. (2009), verificaram que há mudança na estrutura de comunidades microbianas na rizosfera de plantas de milho com adição de diferentes frações de AH. Essas alterações na comunidade microbiana na rizosfera de plantas não leguminosas

como o milho, podem beneficiar as plantas como no caso da maior associação a alguns microrganismos, como as BPCV que mobilizam nutrientes, principalmente o nitrogênio, o tornando disponível para as plantas, além de fitormônios que estimulam o crescimento das mesmas (Paterson, 2003; Bonkowski et al., 2004; Barea et al., 2005).

Estudos com bactérias endofíticas diazotróficas têm se intensificado graças às suas potencialidades como agentes de promoção de crescimento e proteção de plantas. Os AH podem atuar no aumento da população de bactérias diazotróficas, introduzidas em plantas e, conseqüentemente incrementar os efeitos benéficos sobre a planta hospedeira (Marques Júnior et al., 2008). Canellas et al. (2012), verificaram que em milho inoculado com *H. seropedicae* na presença de SH isoladas de vermicomposto ocorreu a indução de raízes laterais em estádios iniciais de crescimento da planta e uma clara estimulação da H⁺ ATPase de membrana plasmática. Além disso, verificou-se que a proliferação de raízes laterais favoreceu a colonização por *H. seropedicae*, causando alterações no metabolismo de carboidratos e nitrogênio, resultando em maior eficiência fotossintética em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. Em experimento de campo foi observado que essa associação provoca aumento na produção de grãos indicando um efeito sinérgico entre SH e microrganismos promotores do crescimento vegetal em alguns casos.

3. HIPÓTESE E OBJETIVO

A hipótese da pesquisa é a de que mudanças na composição química de exsudados induzidas por microrganismos promotores de crescimento e substâncias húmicas favorecerão a colonização de plantas hospedeiras e ampliarão a resposta de estímulo ao crescimento vegetal dos bioinoculantes. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar possíveis mudanças no perfil químico de compostos exsudados pelas raízes de plântulas de milho tratadas com ácidos húmicos isolados de vermicomposto e *H. seropedicae* estirpe HRC 54.

3.1. Objetivos específicos:

- 1- Avaliar a colonização por *H. seropedicae* na presença de ácidos húmicos em raízes de plântulas de milho;
- 2- Avaliar as taxas de exsudação aos 7, 14 e 21 dias de tratamento;
- 3- Identificar as principais classes de compostos exsudados por espectroscopia de RMN ^1H ;

- 4- Identificar as diferenças entre os compostos exsudados por meio de análise multivariada;
- 5- Identificar os principais compostos exsudados nos diferentes tratamentos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Extração das substâncias húmicas

As substâncias do tipo húmicas foram extraídas de vermicomposto produzido a partir de torta de filtro proveniente da usina de cana-de-açúcar (Coagro, Campos dos Goytacazes). A extração das SH solúveis do vermicomposto foi realizada com NaOH 0,1 mol L⁻¹, na razão solvente:vermicomposto de 1:10 (v:v) em atmosfera inerte de N₂. A extração foi repetida até a obtenção de extrato descolorido adquirido, em média, após cinco extrações. Os AH foram obtidos com o ajuste do pH da solução até aproximadamente 1,5 com HCl 6 mol L⁻¹. A operação de redissolução (com NaOH 0,1 mol/L) e precipitação (com HCl 6 mol L⁻¹) foi repetida três vezes. Em seguida, foram adicionados 200 mL de solução aquosa diluída de HF e HCl (preparada com 5 mL de HCl concentrado e 5 mL de HF concentrado, sendo o volume da solução completado para 1 L com água deionizada). A amostra ficou sob agitação durante oito horas e os AH separados por centrifugação. Os AH foram lavados com água deionizada até teste negativo contra cloreto utilizando-se AgNO₃, seguido por

diálise contra água deionizada, utilizando uma membrana de 1000 Da. Antes da liofilização o pH foi ajustado a 7,00 com KOH 0,01 mol L⁻¹.

4.2. Obtenção dos inóculos microbianos (*Herbaspirillum seropedicae*)

Os inóculos da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 foram obtidos no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT/UENF). As bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS sob rotação de 120 rpm a 30°C por 24h. A suspensão de bactérias foi ajustada para 10⁹ células por mL (Döbereiner et al., 1995).

4.3- Condições de cultivo

Sementes de milho híbrido (*Zea mays* L., DEKALB 7815) foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (0,5%) por 30 minutos, e em seguida, após lavagem em água corrente, foram imersas em água destilada por seis horas. As sementes foram acondicionadas em papel filtro para germinação no escuro a 27°C e em incubadora BOD. Dois dias após a germinação, as plântulas com 1,0 cm de raiz foram transferidas para vasos com 1L de capacidade preenchidos com solução nutritiva de Clark 1/4 da força iônica (FI), sendo o teor de N ajustado a uma concentração baixa (1 mmol L⁻¹ NO₃ + NH₄). Foram adicionados os seguintes tratamentos a esta solução: controle (somente a solução nutritiva); AH (35 mg C L⁻¹); *H. seropedicae* (concentração final de 10⁷ células ml⁻¹), AH e *H. seropedicae* (35 mg C L⁻¹ + 10⁷ células ml⁻¹). As soluções tiveram pH ajustado para 5,8 - 6,0. As plântulas foram mantidas em hidroponia com aeração contínua (minicompressores) e crescidas em sala de cultivo com fotoperíodo ajustado para 14 h dia (luz) e 10 h noite (escuro) com temperaturas respectivamente de 25 °C e 22 °C. Foram utilizadas 25 plântulas por vaso e três vasos por tratamento. As plântulas foram coletadas aos 7, 14 e 21 dias, sendo a FI da solução nutritiva aumentada para 1/2 da força aos 14 dias.

4.4. Coleta dos exsudados radiculares

A coleta dos exsudados foi realizada após 7, 14 e 21 dias de tratamento. Para tanto, as plantas foram retiradas dos tratamentos e as raízes imediatamente imersas em uma solução de KOH 0,01 mol L⁻¹ por cinco minutos para remoção de ânions orgânicos aderidos à superfície da raiz. Após este período, as raízes foram lavadas com abundante água, sendo a lavagem final feita com água destilada. Após a lavagem, vinte e cinco plântulas foram acondicionadas em recipientes de vidro contendo 100 mL de água ultrapura (Mili-Q) autoclavada, durante duas horas para coleta dos exsudados (Aulakh et al., 2001). Imediatamente após a coleta, o material foi filtrado com filtro de membrana polietersulfônica, com tamanho de poro de 0,45 µm e totalmente vedado para utilização em seringas, removendo assim os detritos da raiz e as células microbianas. As amostras foram mantidas congeladas até que fossem submetidas à cromatografia líquida de baixa pressão. Foram utilizadas colunas cromatográficas de vidro (20 x 2,5 cm) preenchidas (10 cm) com sílica C18 de fase reversa LiChroprep® RP-18 (15-25 µm) (Merck, Damstadt, Alemanha). Esse tipo de coluna foi escolhido, pois os componentes da amostra são separados com base nas suas diferenças de polaridade, as quais criam forças de interação específicas entre o gel, a fase móvel e os analitos, a fase reversa é mais adequada para análise de compostos orgânicos hidrofílicos, embora moléculas iônicas também possam ser analisadas, otimizando-se a fase móvel. Os compostos foram eluídos da coluna com metanol usando somente a força da gravidade. O solvente foi removido à baixa temperatura (rotoevaporador) e o extrato foi pesado para análise de rendimento (mg de exsudato g⁻¹ massa seca de raízes h⁻¹). Os extratos foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN ¹H) e após a análise foram derivatizados para análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

4.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H)

Uma massa de 30 mg dos exsudados radiculares foi dissolvida em 700 µL de dimetilsulfoxiamida deuterada (DMSO - d₆) e transferidos para tubos de RMN

de 5 mm. Todos os espectros foram registrados à temperatura ambiente em um espectrômetro Bruker Avance 500 DRX (Bruker GmbH, Rheinstetten, Alemanha), operando a 500,13 MHz para ^1H e equipado com uma sonda de detecção inversa de 5 milímetros. Para cada amostra, 360 scans (FID) foram gravadas com os seguintes parâmetros: 64k pontos de dados; largura de pulso de 8,5 mS (90°), largura espectral de 4401 Hz, tempo de aquisição de 7,4 s, e demora de relaxamento de 1,0 s. Para o processamento de espectro, pontos 64K foram usados e uma multiplicação exponencial associada a um alargamento de linha de 0,3 Hz foi aplicada. Os espectros foram referenciados ao tetrametilsilano (TMS) a 0,0 ppm.

4.6. Análise dos componentes principais

A análise dos componentes principais (ACP) permite a identificação das medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem perdas significativas de informações, transformando um conjunto original de variáveis em outro conjunto, os ACP de dimensões equivalentes (Vicini, 2005). Para a determinação dos ACP, é necessário calcular a matriz de variância-covariância, ou a matriz de correlação, encontrar os autovalores e os autovetores e, por fim, escrever as combinações lineares, que serão as novas variáveis, denominadas de CP (Cruz & Regazzi, 2001). Consiste em encontrar combinações não correlacionadas que descrevam a variação entre as amostras.

Os espectros de RMN ^1H foram integrados nos intervalos de deslocamentos químicos 0 – 2,0 ppm (alifáticos), 2,0 - 3,0 ppm (CH_3 de acetilados), 3,0 – 4,0 ppm (OCH_3 – metoxilas e H de açúcares), 4,0 – 5,0 ppm (metilenos oleofínicos, H anoméricos), 6,0 – 7,50 ppm (H aromáticos) e 9,0 – 10,0 (H de OH quelados ou aldeídos). As áreas correspondentes a cada classe de compostos foram calculadas e retirados os pontos relativos ao solvente utilizado (DMSO). O conjunto de dados foi autoescalado e utilizado para a análise de componentes principais (ACP) e aplicado ao software estatístico Unscrambler x 10.1 (Camo Inc., Oslo, Noruega). Este método é capaz de identificar as principais semelhanças e diferenças entre as características estruturais moleculares.

4.7. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

O extrato foi derivatizado (alquilação seguida de metilação) utilizando-se hidróxido de tetrametil amônio (TMAH, Sigma) 25% em metanol (100 μ L) durante uma hora a 37°C e posteriormente silanizado com tetrametilsilano (TMS) (50 μ L) por 30 minutos. As amostras foram secas em dessecador a vácuo com sílica gel e solubilizadas em metanol para análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

As análises de CG-EM foram conduzidas em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP 2010 plus equipado com uma coluna capilar RTX-5MS WCOT (Restek, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 μ m) acoplada através de uma linha de transferência de calor (310°C) com o espectrômetro de massa quadrupolo. A separação cromatográfica foi obtida com o seguinte programa de temperatura: 60°C durante 1 min (isotérmico), levantou a 7°C min⁻¹ a 100°C e em seguida a 4°C min⁻¹ a 320°C, seguido de 10 min a 320°C (isotérmico). O hélio foi o gás portador em 1,90 mL / min, a temperatura do injetor foi de 250°C, e o modo de injeção tinha um fluxo dividido em 30 mL / min. Os espectros de massa foram obtidos no modo EI (70 eV), a digitalização na gama de m/z 45-850 com um tempo de ciclo de 1 s. A identificação dos compostos foi baseada na comparação com espectros de massa registrados na livreria NIST08, espectros publicados e padrões empregados.

4.8. Contagem da população bacteriana inoculada na raiz

A contagem da população bacteriana inoculada na raiz, foi realizada por meio da técnica do Número mais provável (NMP). O número de bactérias na raiz (expresso em log n° de bactérias por g de massa fresca da raiz) foi estimado, tomando-se amostras de 1 g das raízes por repetição para todos os tratamentos, diluídas seriadamente em solução salina (NaCl 0,85 %) de 10⁻² até 10⁻⁷ e aplicando-se 100 μ L das diluições em frascos de vidro (v = 16 mL), com 5 mL de meio JNFb semissólido sem adição de N (Baldani et al., 1992). A composição química média do meio JNFb por litro é: ácido málico (5,0 g); K₂HPO₄ (0,6 g);

KH_2PO_4 (1,8 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g); NaCl (0,1 g) ; CaCl_2 (0,02 g), 0,5 % azul de bromotimol a 0,2 N de KOH (2 mL), solução de vitaminas (1 ml); solução de micronutrientes (2 mL), 1,64 % de solução de Fe . EDTA (4 mL); KOH (4,5 g). Em 100 mL, a solução de vitaminas continha: biotina (10 mg) e pyridoxol - HCl (20 mg), 1 L da solução de micronutrientes consistiu de: CuSO_4 (0,4 g); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,12 g); H_3BO_3 (1,4 g); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,5 g). O pH foi ajustado para 5,8 e foi adicionado $1,9 \text{ g L}^{-1}$ de Ágar (Olivares et al, 1996). Os frascos foram incubados a 30°C , por sete dias. Decorrido este período, avaliou-se o crescimento pela presença de uma película branca na superfície do meio. O número de bactérias foi obtido pela consulta à Tabela de McCrady (Döbereiner et al., 1995) para três repetições por diluição; tendo os valores sofrido transformação logarítmica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Infecção dos tecidos radiculares

A estimativa da população de bactérias associadas às raízes frescas de plântulas de milho foi realizada aos 7, 14, 21 e 30 dias após a inoculação (Figura 1). Em todos os tratamentos, o NMP de células bacterianas nos tecidos das raízes foi mais elevado nos tratamentos que receberam a inoculação com *H. seropedicae*. A comparação entre os tratamentos que receberam o inóculo (BPCV) e os tratamentos que tiveram a combinação entre ácidos húmicos e bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV + AH), demonstra que (BPCV + AH) manteve-se com maior número de células viáveis de *H. seropedicae* até o final das coletas (Figura 1). Estes resultados foram qualitativamente semelhantes aos observados por Canellas et al. 2013, indicando que os AH, por si só, podem aumentar os números de células de *H. seropedicae* que já se encontram naturalmente nos tecidos das raízes e ajudam a preservar alto o número de bactérias que foram inoculadas por mais tempo.

Puglisi et al. (2009), demonstraram que a adição de AH a plantas de milho estimulou a rizodeposição pelas raízes enriquecendo a rizosfera de formas de C prontamente disponíveis aos microrganismos aumentando assim a biomassa

microbiana. Para que ocorra a colonização de raízes por bactérias é necessário que haja movimentação dos microrganismos até a superfície da raiz, seguido de adsorção e ancoragem. AH são estruturas heterogêneas, irregulares e anfifílicas com alta densidade de carga e núcleos hidrofóbicos, facilitando assim fenômenos de adsorção (Piccolo, 2002). Como *H. seropedicae* é um microrganismo flagelado, é possível que ocorra a existência da indução da atividade flagelar por compostos liberados pelas plantas (quimiotaxia), como já descrito para outras bactérias promotoras do crescimento vegetal (Weert et al. 2002).

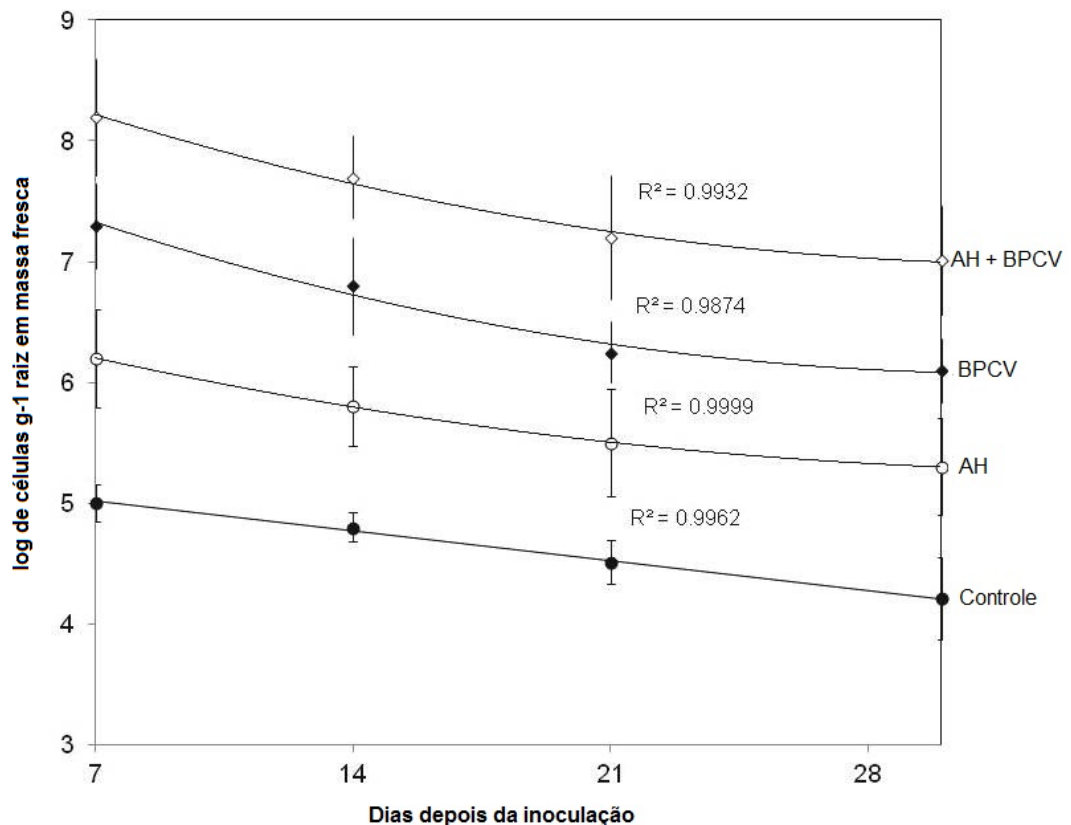


Figura 1: Estimativa da população de *H. seropedicae* estirpe HRC 54 associadas às raízes frescas de plântulas de milho (log do número de células bacterianas por grama de tecido fresco) submetidas aos tratamentos: Controle (solução nutritiva), AH (35 mg C L⁻¹), BPCV (10⁷ células mL⁻¹) e AH + BPCV (35 mg C L⁻¹ + 10⁷ células mL⁻¹) aos 7, 14, 21 e 30 dias após a inoculação.

5.2. Rendimento dos exsudados radiculares

O rendimento dos exsudados radiculares é mostrado na Tabela 1. A variação na massa dos exsudados foi de 0,25 a 4,05 mg de exsudados. g^{-1} de raiz em massa seca. h^{-1} de coleta. A quantidade de exsudados mudou de acordo com o tempo e o tratamento. Nos tratamentos Controle e AH + BPCV, observou-se redução linear com o tempo, enquanto que a massa dos exsudados nos tratamentos AH e BPCV foi maior aos 14 dias seguindo forte queda aos 21 dias de tratamento.

Alguns trabalhos associam o decorrer do tempo com a redução de C translocado para as raízes e a rizosfera do total que é fotossintetizado pela parte aérea, ou seja, quanto maior a idade das plantas menos C é transportado para o solo pelas raízes (Nguyen et al. 2003, Keith & Oades, 1986).

As condições de crescimento das plantas, o modo de coleta dos exsudados e os sistemas utilizados influenciam diretamente nas análises quantitativas. Nesse trabalho, as plântulas de milho cresceram em sistema de hidroponia com solução nutritiva ajustada e os exsudados foram coletados durante duas horas com água ultrapura autoclavada (Aulakh et al. 2001). Uma das desvantagens deste método de recolha é a baixa concentração de exsudados (Hoffand et al. 2006, Liu et al. 2004). Além disso, foram utilizados sistemas de colunas preenchidas com sílica C18 de fase reversa (C18-FR) que possibilitam a seletividade dos compostos que serão analisados (Tang & Young, 1982, Petersen & Böttger, 1991) influenciando dessa forma na quantidade de exsudados finais (tabela 1).

Tabela 1: Rendimento dos exsudados produzidos por raízes de plântulas de milho tratadas com ácidos húmicos (AH), bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), a associação entre ácidos húmicos e bactérias promotoras do crescimento vegetal (AH + BPCV) e controle (solução nutritiva) aos 7, 14 e 21 dias de tratamento.

	7 dias	14 dias	21 dias
	-----mg g ⁻¹ raiz em massa seca hora ⁻¹ ----- ---		
Controle	3,16 ± 1,30	2,12 ± 2,01	2,17 ± 0,03
AH	2,86 ± 1,81	4,05 ± 0,64	2,70 ± 0,35
BPCV	1,15 ± 0,89	2,35 ± 0,56	0,95 ± 0,56
AH + BPCV	3,68 ± 1,00	0,55 ± 0,55	0,25 ± 0,28

*Os valores correspondem à média de três repetições seguidos por desvio padrão

5.3 Ressonância magnética nuclear ¹H e Análise dos componentes principais (ACP)

A ressonância magnética nuclear (RMN ¹H) em conjunto com a análise multivariada (ACP) permitiu a discriminação rápida de exsudados radiculares. Os espectros de RMN ¹H foram obtidos a partir de amostras de exsudados que passaram por colunas C18-FR eluídas com metanol. Nas Figuras 2, 3 e 4 encontram-se os espectros relativos aos compostos encontrados aos 7, 14 e 21 dias de coleta dos exsudados nos 4 diferentes tratamentos.

A Tabela 2, apresentou as áreas de integração dos deslocamentos químicos utilizadas, que foram definidas em intervalos de deslocamentos químicos de 0 – 2,0 ppm (alifáticos), 2,0 - 3,0 ppm (CH₃ de acetilados), 3,0 – 4,0 ppm (OCH₃ – metoxilas e H de açúcares), 4,0 – 5,0 ppm (metilenos oleofínicos, H anoméricos), 6,0 – 7,50 ppm (H aromáticos) e 9,0 – 10,0 (H de OH quelados ou aldeídos). Visualmente nota-se que os espectros de RMN ¹H apresentam predominância de sinais na região de carboidratos (2,5 - 4,5 ppm), seguida de ácidos orgânicos/ alifáticos (0,0 – 3,0 ppm) e regiões aromáticas (5,0 – 8,0 ppm) e que existem diferenças nos perfis dos compostos exsudados em comparação ao tratamento controle e aos tempos de coleta.

Aos 7 dias (figura 2), ocorreram poucas alterações no perfil de exsudação entre os diferentes tratamentos. Os espectros do controle, foram caracterizados por alguns deslocamentos químicos na região referente aos compostos alifáticos, apresentando sinal pequeno em 0,96 ppm e sinal curto, porém acentuado em 1,24 ppm, na região referente a açúcares, apresenta principal sinal em 3,47 ppm e outros sinais com baixa intensidade em 3,74 e 3,93 ppm. Na região dos compostos aromáticos é possível observar pequenos sinais em 6,69- 6,74 e em 6,99 ppm. Os sinais em 1,24 ppm, podem ser relacionados à presença de compostos CH_3 de ácidos alifáticos e βCH_3 de aminoácidos encontrados em extratos de milho. A forte absorção em 3,47 ppm pode ser atribuída à presença de glicosídeos (β - Glc e α - Glc). Os sinais em 6,7 ppm são típicos de ácidos hidroxibenzoicos como o ácido cinâmico e protocatecuico. O triptofano, a histidina e o ácido gálico possuem sinais próximos de 7,0 ppm. No tratamento contendo AH houve alterações na região de absorção alifática onde sinais adicionais foram observados em 0,84, 0,88 e 1,10 ppm. Estes sinais também foram observados nos exsudados de plantas que foram tratadas com *H. seropedicae* que expressaram sinal adicional em 1,64 ppm não observado no tratamento controle. Quando *H. seropedicae* foram utilizados em conjunto com ácidos húmicos, sinais adicionais estavam presentes em 1,08 – 1,10 ppm, 1,20 e 2,0 ppm. O espectro de plântulas tratadas com AH exibiu absorção extra em 3,91 ppm, que pode ser atribuída a sacarose (3,48; 3,84; 3,90; 4,22 e 5,42 ppm) e/ou a lisina, uma vez que o sinal em 1,64 ppm, que é típico desses compostos, foi encontrado nesse tratamento (δCH_2). Nos espectros de exsudados de plântulas de milho tratadas com AH em conjunto com o inóculo, ocorreram sinais complementares, porém muito pequenos em 6,34- 6,62 ppm, que é a região atribuída aos compostos aromáticos e um sinal muito pequeno em 8,52 ppm. Compostos semelhantes à niacina mostraram sinais nessa região.

O perfil dos exsudados recolhidos aos 14 dias (figura 3) é muito diferente dos que foram apresentados aos 7 dias de tratamento. Neste tempo de coleta, o sinal em 1,23 ppm aparece em todos os tratamentos com grande intensidade e corresponde, no tratamento *H. seropedicae*, ao maior sinal detectado. No perfil dos exsudados do tratamento controle aos 14 dias, existe baixa intensidade dos sinais relativos aos compostos aromáticos, apenas um sinal visível em 5,70 ppm. No entanto, esta região foi marcada por fortes diferenças nos exsudados dos

tratamentos com AH e *H. seropedicae*. No tratamento com AH, foi possível observar uma sequência diversificada de sinais em 4,99-5,13; 5,65-5,71; 6,69-6,80 e sinais individuais em 6,99 e 7,18 ppm. A inoculação com *H. seropedicae* produziu sinais mais nítidos nesta região em comparação com o tratamento AH, estes sinais bem definidos podem ser observados em 5,64; 5,85; 6,67; 6,77; 6,93 e 7,20 ppm. Este espectro foi marcado pela intensidade de sinais em 3,54 e 3,72 ppm. Absorções adicionais foram observadas na região dos compostos alifáticos, com aparecimento de sinais em 1,48; 1,77 e 2,03 ppm que não foram encontrados nos tratamentos controle e AH. As características do espectro de RMN ^1H de plântulas de milho tratadas com AH + *H. seropedicae* foram muito semelhantes às do tratamento contendo somente *H. seropedicae*, ou seja, houve modificação intensa na região dos compostos aromáticos incluído um sinal evidente em 6,98 ppm. Porém, ocorreram alterações na região dos carboidratos, incluído aumento da intensidade do sinal em 3,72 ppm.

Aos 21 dias de tratamento (figura 4), as plântulas são menos dependentes das reservas de nutrientes encontradas nas sementes, neste tempo de coleta, os perfis dos exsudados também foram modificados pelos tratamentos. A análise dos espectros nesta fase demonstrou ser a mais complexa em comparação aos outros tempos de coleta, apresentando maior número de sinais em todos os tratamentos. O perfil dos exsudados do tratamento controle mostrou uma ampla variedade de sinais pequenos na região dos compostos alifáticos, mas diferentemente do que ocorreu aos 7 e 14 dias os principais sinais nessa região estão em 2,08 ppm. Sinais adicionais foram observados na região de carboidratos, entre 3,03 – 3,45 ppm, incluindo um sinal intenso em 3,18 ppm. A principal absorção nesta região foi observada em 3,73 ppm como apresentado nos outros tempos de coleta de exsudados. Pequenos sinais adicionais foram observados em 9,69; 9,76 e 9,78 ppm. No perfil dos exsudados das amostras tratadas com AH ocorreram algumas semelhanças com o perfil do tratamento controle, porém existiram diferenças significativas, por exemplo, o sinal de alta intensidade em 2,25 ppm ocorreu no tratamento AH e o mesmo não aconteceu no controle. Também houve a adição do sinal acentuado em 5,77 ppm no tratamento AH, este sinal ocorreu igualmente no tratamento AH + *H. seropedicae*, sendo o principal sinal deste tratamento, o mesmo não ocorreu no controle e no *H.*

seropedicae. Ocorreram muitas semelhanças entre o perfil do tratamento *H. seropedicae* e o controle.

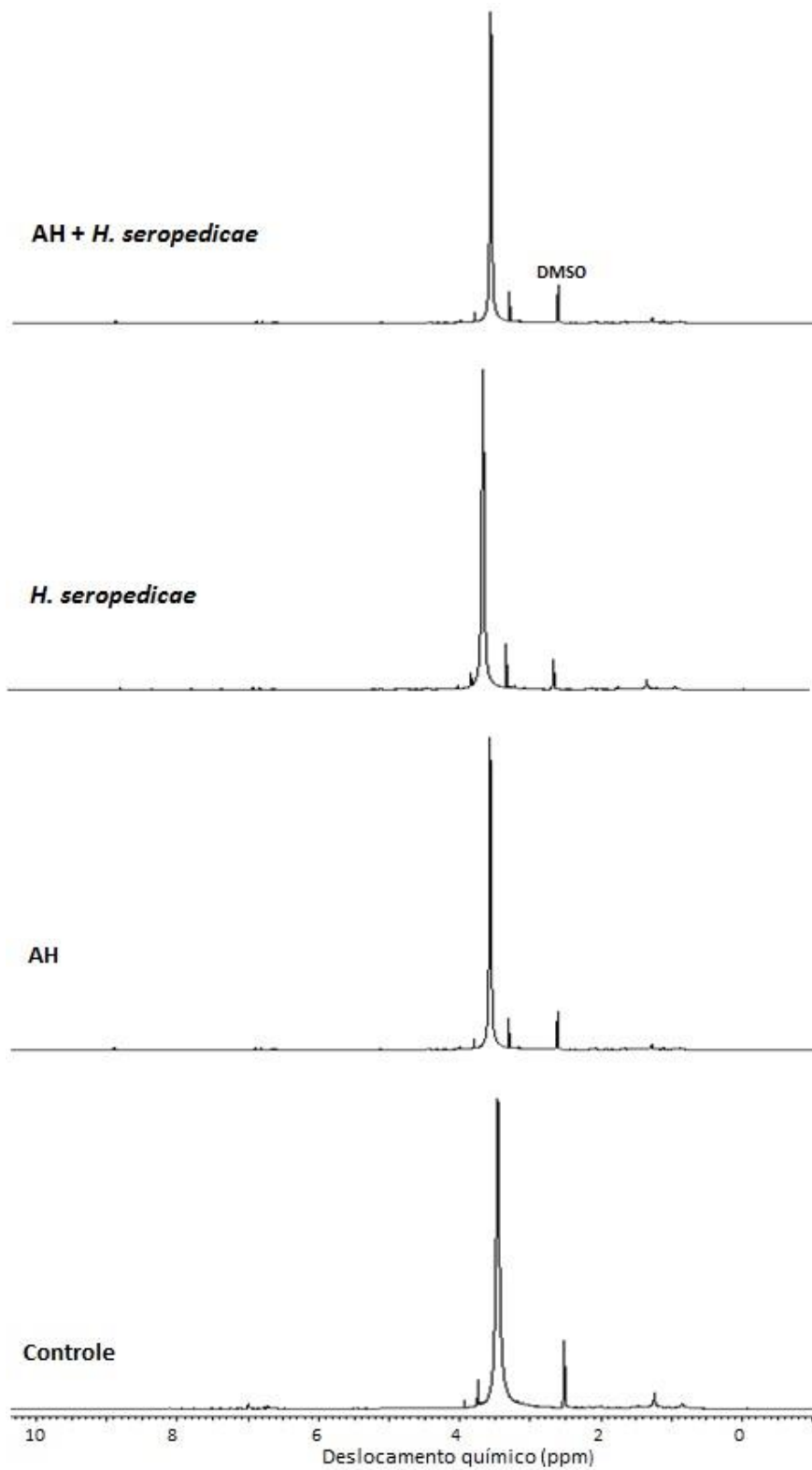


Figura 2: Espectros de ressonância magnética nuclear ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* aos 7 dias de coleta.

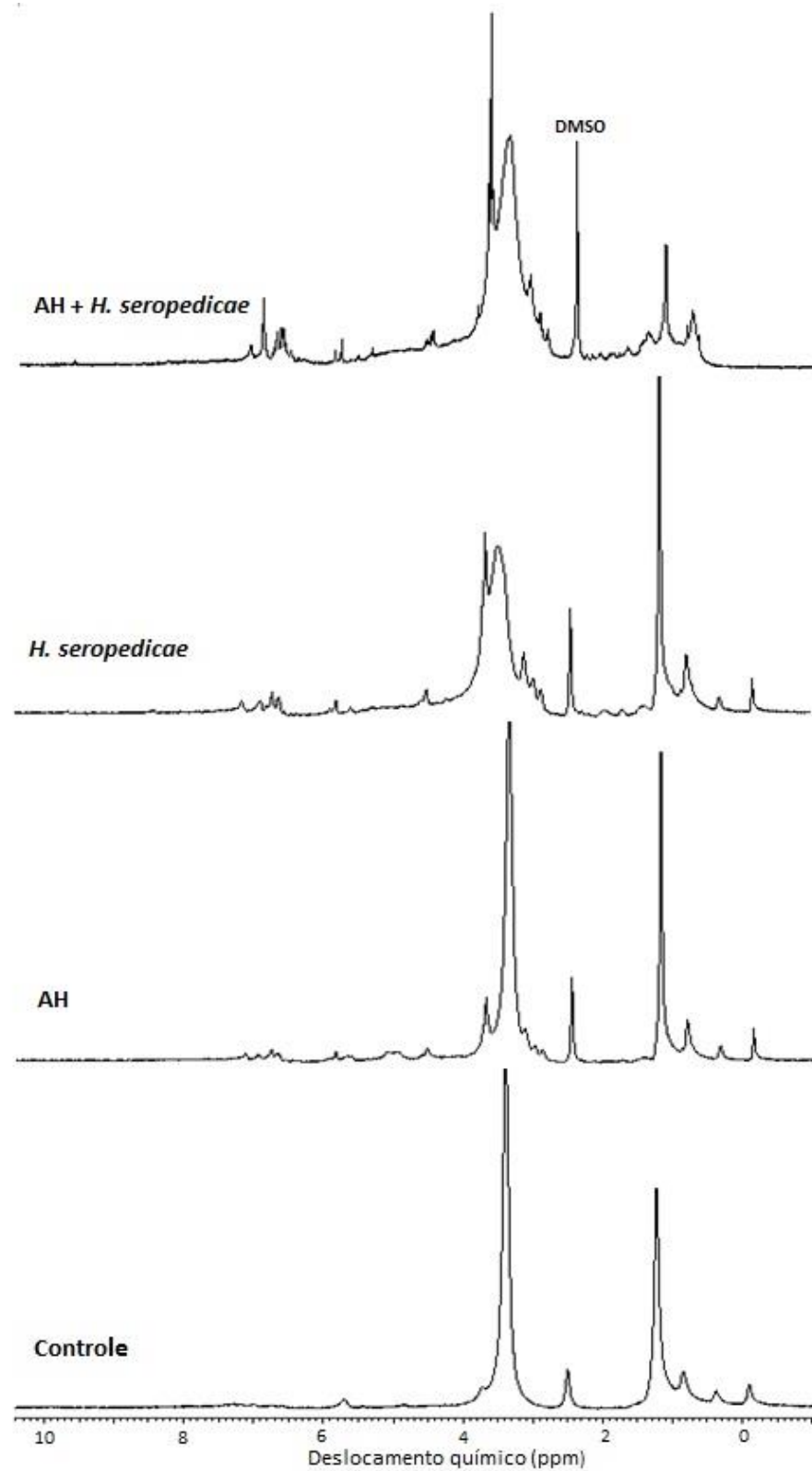


Figura 3: Espectros de ressonância magnética nuclear ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* aos 14 dias de coleta.

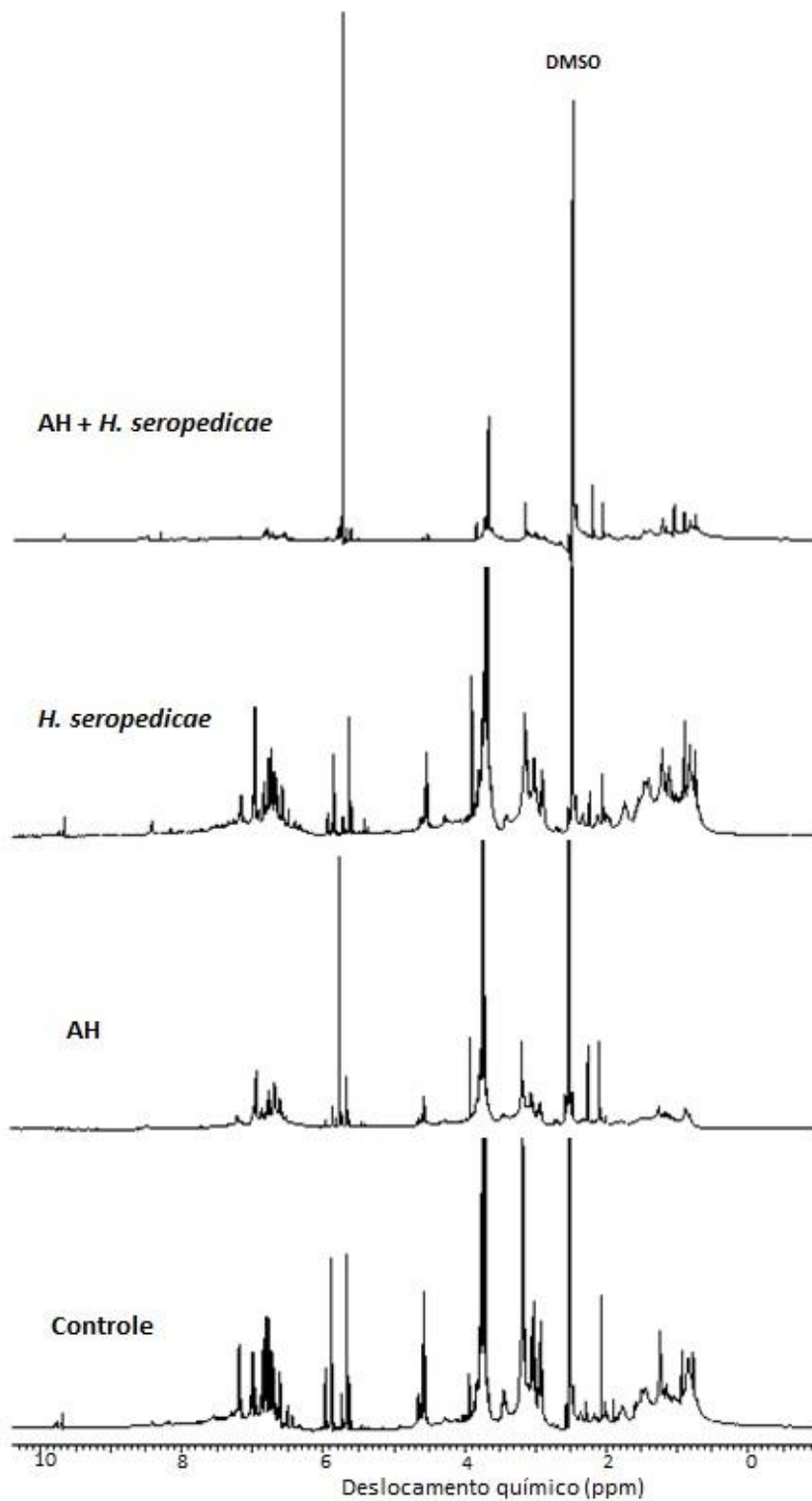


Figura 4: Espectros de ressonância magnética nuclear ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), *AH*, *H. seropedicae* e *AH + H. seropedicae* aos 21 dias de coleta.

Tabela 2: Áreas de Integração dos deslocamentos químicos (ppm) dos espectros de ressonância magnética nuclear ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* aos 7 dias de coleta.

7 dias				
Áreas de integração	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
ppm	% das integrações			
0,0 - 2,0	6,74273	6,35897	4,46700	4,25752
2,0 - 3,0	3,73443	4,00000	1,62436	2,18068
3,0 - 4,0	87,65560	85,64102	91,97969	92,00415
4,0 - 5,0	0,72614	3,17948	1,62436	1,24610
5,0 - 7,5	1,14107	0,82051	0,30456	0,31152
7,5 - 9,0	-	-	-	-

Tabela 3: Áreas de Integração dos deslocamentos químicos (ppm) dos espectros de ressonância magnética nuclear ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* aos 14 dias de coleta.

14 dias				
Áreas de integração	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
ppm	% das integrações			
0,0 - 2,0	41,41104	26,63934	27,02149	14,51776
2,0 - 3,0	0,20449	0,71721	1,63766	4,06091
3,0 - 4,0	55,82822	63,52459	58,85363	59,18781
4,0 - 5,0	1,73824	3,99590	7,67656	10,35532
5,0 - 7,5	0,81799	5,12295	4,81064	10,76142
7,5 - 9,0	-	-	-	1,11675

Tabela 4: Áreas de Integração dos deslocamentos químicos (ppm) dos espectros de ressonância magnética nuclear ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* aos 21 dias de coleta.

21 dias				
Áreas de integração	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
ppm	% das integrações			
0,0 - 2,0	33,82663	17,60176	33,12236	53,60576
2,0 - 3,0	8,56236	14,85148	8,96624	10,93750
3,0 - 4,0	35,83509	35,42354	27,84810	18,14903
4,0 - 5,0	4,75687	7,70077	7,48945	
5,0 - 7,5	14,58773	24,42244	18,88185	13,34134
7,5 - 9,0	2,43128	-	3,69198	3,96634

As similaridades e as divergências entre os tratamentos e os tempos de coleta dos exsudados foram confirmadas utilizando-se a análise dos componentes principais (ACP) (Figura 5), utilizando-se as áreas de integração dos deslocamentos químicos dos espectros de ressonância magnética nuclear ^1H (tabelas 2, 3 e 4). Observou-se que a PC1 representou (89%) e que a PC2 (10%), ou seja, 99% da variância total do conjunto de dados de RMN ^1H foi capturada. Observando-se os scores de dispersão no PC1 vs PC2, pode-se encontrar três grupos separados de acordo com o tempo de coleta dos exsudados. O grupo formado pelo material coletado aos 7 dias localizou-se na PC1 na área correspondente aos valores positivos e na PC2 aos valores negativos. Os valores positivos na PC1 e os loadings responsáveis pelo coeficiente de distinção entre os compostos, demonstraram que aos 7 dias os espectros de RMN ^1H tiveram mais carboidratos em sua composição devido à correspondência com região de 3-4 ppm. O grupo dos espectros de compostos coletados aos 14 dias apresentou valor negativo na PC2 no tratamento HA + PGPB e valores positivos nos outros tratamentos. Neste tempo de coleta, os tratamentos HA e PGPB não diferiram entre si e o controle demonstrou possuir altos valores de compostos do grupo dos alifáticos correspondendo à região do espectro de RMN ^1H de 0-2 ppm. Finalmente, aos 21 dias de coleta dos exsudados, os tratamentos HA+PGPB e HA apresentaram composição muito diferente quando comparados. O tratamento HA+PGPB demonstrou possuir alto conteúdo de compostos aromáticos enquanto que HA alto conteúdo de compostos alifáticos, já os tratamentos controle e PGPB foram bastante semelhantes. A análise de PCA ajuda na interpretação e comparação dos dados. Portanto, foi possível verificar que aos 7 dias de coleta a composição dos exsudados não mudou significativamente de acordo com o tratamento, porém aos 14 e 21 dias de tratamento as diferenças foram muito claras (Figura 5). Estas evidências foram comprovadas pela análise de CG – EM.

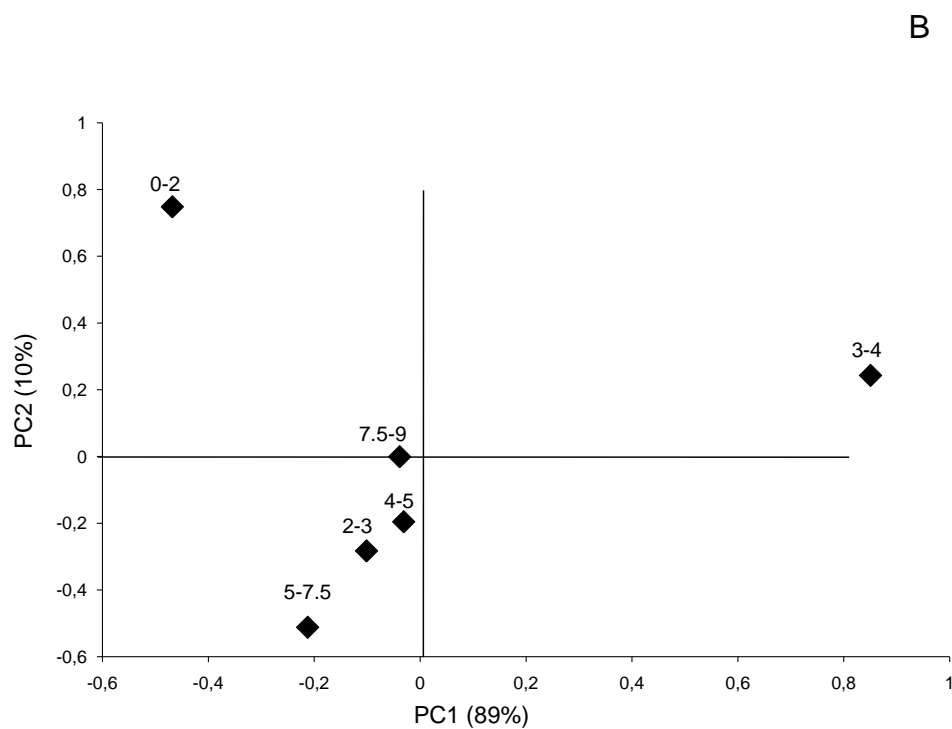
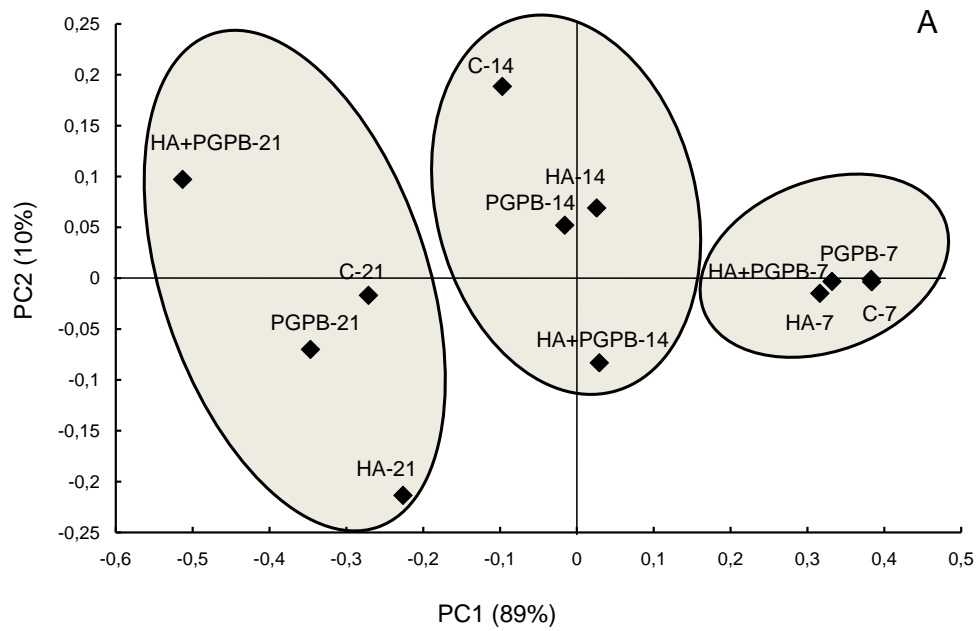


Figura 5: Análise dos componentes principais (ACP) dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H) de plântulas de milho tratadas com ácidos húmicos (HA), *Herbaspirillum seropedicae* (PGPB), ácidos húmicos + *Herbaspirillum seropedicae* (HA + PGPB) e controle (C) aos 7, 14 e 21 dias de coleta dos exsudados. Scores estão representados na figura 3 (A) e loadings na figura 3 B.

5.4. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS)

Os cromatogramas podem ser vistos nas Figuras 6, 7 e 8 e os compostos exsudados identificados por CG-EM estão apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7. Aos 7 dias de coleta, os cromatogramas foram bastante semelhantes e os principais compostos observados foram os nitrogenados e os ácidos graxos como os ésteres metílicos. No entanto, algumas diferenças podem ser observadas entre os tratamentos, que incluem maior exsudação de compostos da classe dos carboidratos por raízes de plântulas tratadas com AH e AH + *H. seropedicae* (tabela 5). As áreas destes compostos nos cromatogramas foram duas vezes maiores comparando-se com o tratamento controle e foi identificada a presença de estruturas piranosídicas como manose, galactose e glicose. Alguns grupos D-glicopiranosídeos associados a anéis aromáticos foram encontrados nos exsudados do tratamento controle enquanto que 1,6 β – glicose ocorreu em exsudados de plântulas tratadas com AH e AH + *H. seropedicae*. A quantidade e diversidade de compostos nitrogenados também foram maiores em exsudados dos tratamentos contendo AH e AH + *H. seropedicae* comparando-se com o controle aos 7 dias (Tabela 5). Foram encontradas benzilaminas, poliaminas, derivados de pirrol, aminoácidos complexos e derivados de nucleotídeos, porém, benzilaminas e poliaminas somente foram encontradas nos tratamentos com AH e AH + *H. seropedicae*. Compostos nitrogenados da rota da fenilalanina estavam presentes como a pirimidina, pirrol- 3- ácido carboxílico e do derivado da hidrólise do ácido p- cumárico com tempo de retenção em 28.91 min. Que foi identificado como cafeína. Estruturas derivadas da adenosina foram encontradas em todos os tratamentos, enquanto que procedentes de purina somente foram encontradas no tratamento com *H. seropedicae*. Em uma visão geral, os tratamentos contendo AH e AH + *H. seropedicae* induziram uma alta exsudação de compostos nitrogenados em comparação com as plantas controle, incluindo tanto maior quantidade quanto diversidade de compostos.

Os ácidos graxos foram a segunda classe de compostos mais exsudados ao final dos 7 dias. Os tratamentos contendo *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* tiveram menor participação desta classe de compostos em relação

ao tratamento controle e principalmente o tratamento com AH. A área do cromatograma com estes compostos, possui um incremento de 52% nos tratamentos com AH em relação ao controle aos 7 dias. O principal ácido graxo exsudado pelas plântulas foi o ácido hexanoico (ácido palmítico). O ácido esteárico (octadecanóico) foi exsudado principalmente por plântulas controle, enquanto que os ácidos tridecanoico e eicosanoico, também conhecidos como ácidos araquídicos, que são pequenos constituintes do óleo de milho, foram encontrados apenas em exsudados de mudas tratadas com AH. Os ácidos graxos obtidos nos exsudados de *H. seropedicae* foram os ácidos tridecanoico, palmítico e esteárico. Apesar da técnica de CG-EM não ser muito adequada para a análise de ácidos orgânicos de cadeias curtas, foi possível observar a presença de ácido propenoico, mas associado a cadeias longas de carbono no controle e no AH e ácido succínico associado a grupos aromáticos em AH + *H. seropedicae*. O ácido benzenodicarboxílico foi um dos principais compostos aromáticos encontrados e um esteroide identificado com isosteviol foi obtido em todos os exsudados. Outros esteroides como o Cholene e Androstano foram encontrados nos tratamentos AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae*.

As principais classes de compostos encontradas aos 7 dias de tratamento também foram observadas aos 14 e 21 dias (tabelas 6 e 7), mas a diversidade de compostos reduziu progressivamente com o crescimento das plântulas. Algumas diferenças podem ser observadas entre os tratamentos aos 14 dias de coleta, como a maior participação dos compostos nitrogenados nos tratamentos com AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae*, que foi de três a quatro vezes maior em relação ao controle. Contrariamente ao observado aos 7 dias, não foram identificados adenosina e outros derivados de nucleotídeos. Produtos que fazem parte da formação da fenilalanina e da piridina foram encontrados em *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae*, enquanto que o cianato de fenila e derivados de pirrol foram encontrados em exsudados de plântulas tratadas com AH. Os compostos presentes em *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* foram muito semelhantes (tabela 6), porém, apenas o benzeno e o 1-isocianato-4-metoxi foram exsudados em *H. seropedicae* e o ácido carbônico, a monoamida, o N-(2,4 dimetoxifenil), éster de butilo por AH + *H. seropedicae*. A maior exsudação de carboidratos foi encontrada nos tratamentos AH e *H. seropedicae* com os mesmos compostos identificados aos 7 dias, já o tratamento AH + *H. seropedicae*,

apresentou derivados de carboidratos em menores quantidades e o controle não apresentou esses açúcares. Os ácidos graxos foram encontrados em todos os tratamentos, todavia a maior diversidade foi observada no tratamento com *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae*, diferentemente do que foi visto aos 7 dias onde o tratamento AH mostrou maior quantidade e diversidade. Semelhante ao observado nos produtos dos 7 dias de tratamento, o isosteviol foi encontrado em todos os exsudados, além de outros esteroides derivados de androstan.

Os compostos identificados aos 21 dias estão apresentados na tabela 7. Este tempo de coleta foi caracterizado pela menor diversidade de compostos quando comparado com os encontrados aos 7 e 14 dias. O hexanol, apresentou maior participação nos exsudados do controle enquanto que produtos de fenoxietanol foram encontrados no tratamento *H. seropedicae*, provavelmente devido a reações de hidrólise de carboidratos. Os compostos nitrogenados, fazem parte dos principais grupos de compostos que são retidos na coluna C18-FR, contudo, somente o ácido carbônico, N-(2,4-dimetoxi fenil) monoamida, -butil éster foi encontrado nos exsudados do tratamento controle aos 21 dias. O 2,5-dimetoxi fenil isocianato foi encontrado em maior quantidade nos tratamentos com AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae*, assim como um derivado de acetamida e 3,4-dimetoxi, 6-amino tolueno. Finalmente, os produtos da acetamida, parecem ser típicos de exsudados de *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* e foram encontrados aos 21 dias nos tempos de retenção 29.34 e em 32.13 minutos.

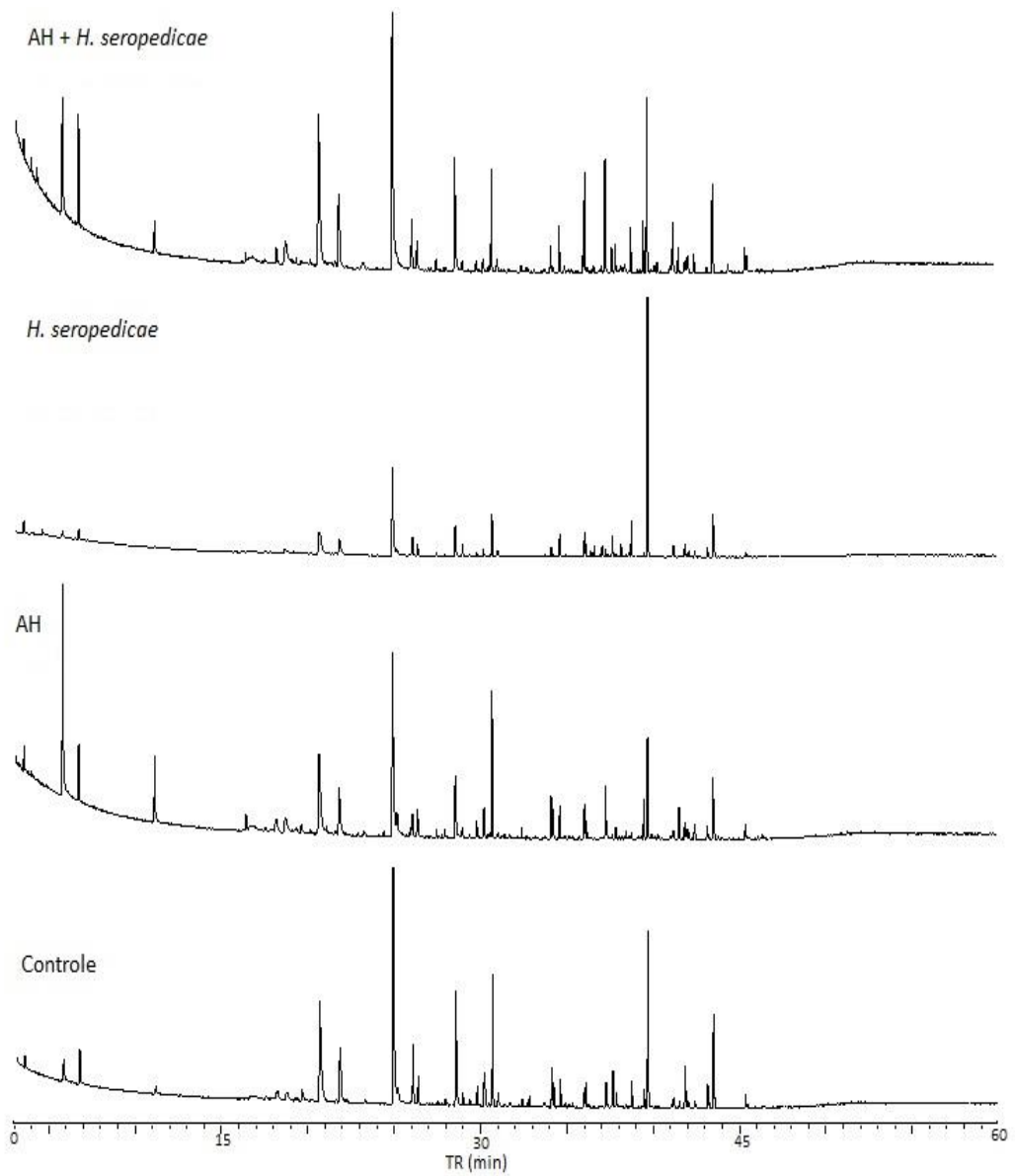


Figura 6: Cromatogramas dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* aos 7 dias de coleta.

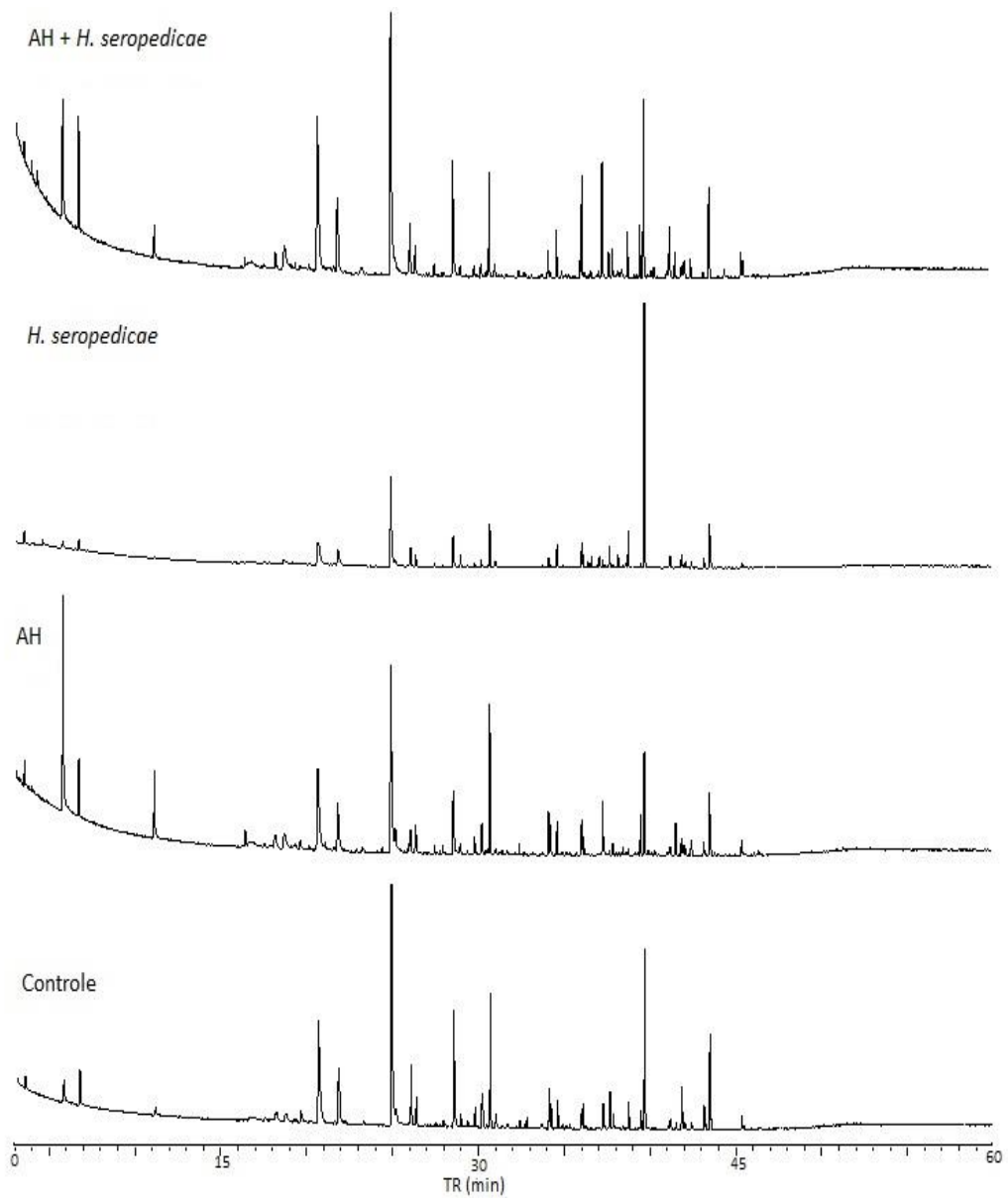


Figura 7: Cromatogramas dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* aos 14 dias de coleta

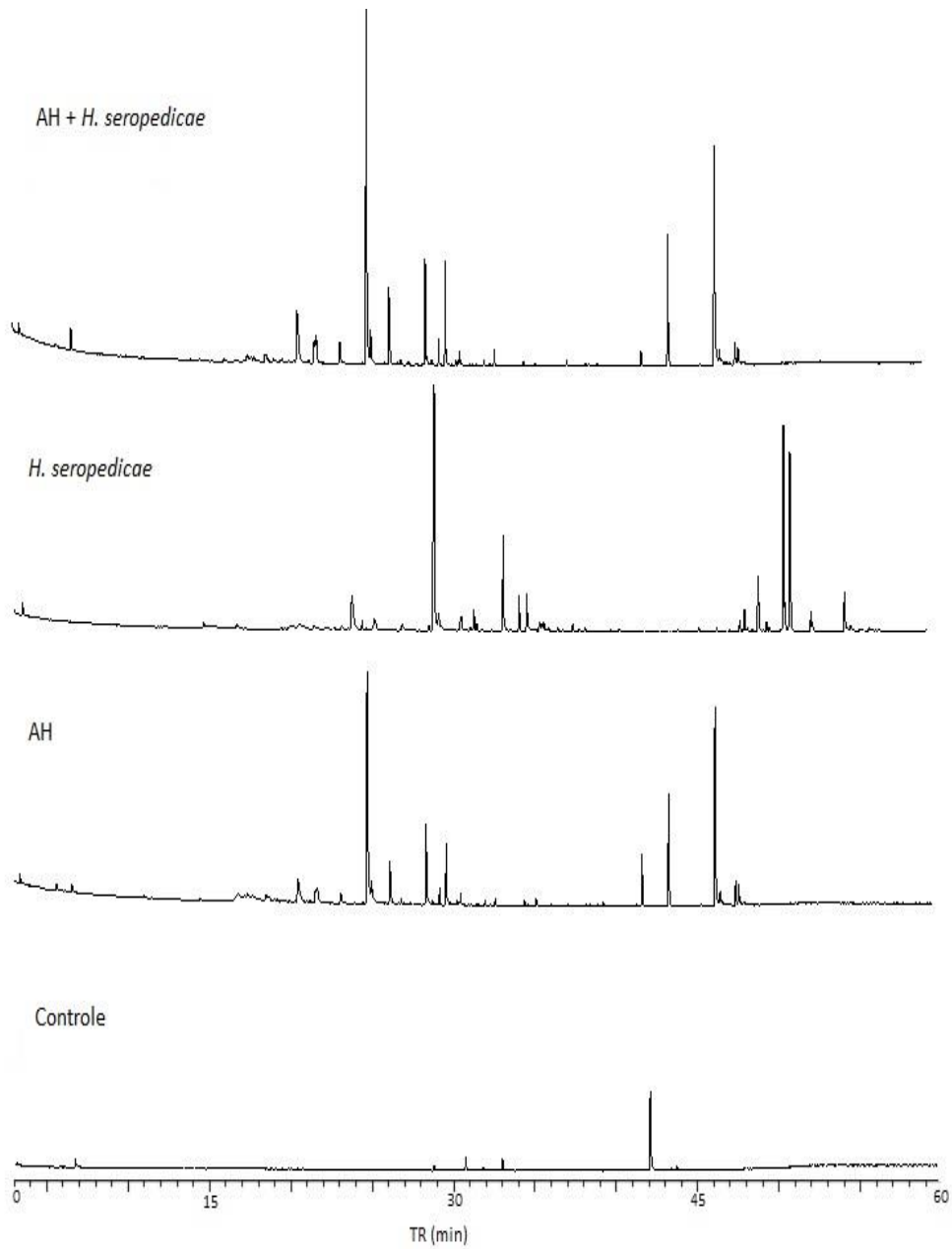


Figura 8: Cromatogramas dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae* aos 21 dias de coleta

Tabela 5: Principais compostos exsudados por plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, BPCV (*H. seropedicae*) e AH + BPCV (*H. seropedicae*) identificados por CG-EM aos 7 dias de coleta.

7 dias						
Classe	Nome	TR (min)	C	AH	BPCV	AH + BPCV
Carboidratos						
	1,6-Anidro D-glicose, trimetil éter	18,168	0	1,35	0	0,83
	Metil 2,3,4,6-tetra-O-metil- α D-glicopiranosídeo	34,846; 37,199; 38,368	1,74	3,17	0,73	4,24
Nitrogenados						
	3,4-Dimetoxi -6-amino tolueno	20,634	8,54	8,93	7,41	0
	5- Metil- formil-1-(metoxi metil)-1H-pirrol-3-carboxilato, ME	21,787	4,22	0	0	12,14
	3,4,5-Trimetoxi benzilamina	21,795	0	5,11	3,47	0
	2,5-Dimetoxi fenil isocianato	24,878	11,41	16,78	14,36	4,56
	2,4-Dimetoxi fenilamina, N-etoxi carbonila	25,952	0,48	0	0	18,82
	N, N, 9-trimetil-9H-purin-6-amida	26,019	2,15	1,30	1,97	0,68
	Biciclo [2.2.1] heptano-2-acetamida, N-(1,3-dihidro-5,6-dimetoxi-3-oxo-4-isobenzofuranila	28,503	3,04	4,69	3,51	1,84
	Cafeína	28,915	0	0,48	0	5,26
	N,N,3- trimetil-3H-Purin-6-amina	30,952	0	0	0,61	0
	3-metil-3,5-di-O-metil, Uridina	35,077	0	0	0	0,58
	N-metil-2,3,5-trimetil éter, Citidina	35,926	0,62	1,44	1,52	0,19
	N,O,O-trimetil, Timidina	36,019	0,91	1,62	2,24	0,55
	N-(12-dodecilamina), Aziridina	37,792	0,52	0,58	0	3,37
	N,N,O,O-tetrametil, Adenosina	41,125	0	0,65	1,60	0,95
	N,N-dimetil-3-amino, Adenosina	42,007	0	0,20	0,46	2,11

Tabela 5 cont.

Classe	Nome	TR (min)	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
Ácidos graxos						
	Ácido tridecanoico, 12-metil, ME	26,320; 27,901	0,77	0,28	1,06	0,80
	Ácido tetradecanoico, ME	26,323	0	1,22	0	0
	Ácido hexadecanoico, ME	27,419	0	0,32	0	0,37
	Ácido hexadec-9-enoico, ME	30,133	1,06	2,94	0,84	0,47
	Ácido octadec-9-enoico, ME	30,181	0	0	0	0,13
	Ácido hexanoico, ME	30,625	4,22	7,28	4,05	3,22
	Ácido octadec-9-enoico, ME	34,053	1,27	0	0	0
	Ácido octadec-8-enoico, ME	34,164	0,67	0	0	0
	Ácido octadecanoico, ME	34,548	0,95	1,36	2,15	1,40
	Ácido eicosanoico, ME	38,161	0	0,16	0	0
Ácidos orgânicos						
	Ácido succínico, di (5-metoxi-3-metilpent-2-il) éster	40,052	0	0	0	0,36
Aromáticos						
	Fenol, 4,6-bis (1,1- dimetil)-6-metil	19,337	0	0,24	0	0,23
	(1-metildodecil) Benzeno	37,592	0,31	0	1,98	0,80
	Ácido 1,2- benzenodicarboxílico, éster	41,779	0	0	1,49	0,44
	Ácido 1,2- benzeno dicarboxílico, 2-etilhexil monoéster	41,784	1,55	0	0	0
Esteroides						
	17β-hidroxi-6α-pet-4-ox-5β-androst-3-ano	43,074	0	0,74	0,93	0
	Diidroxi isosteviol	43,412	3,88	3,94	5,05	3,46
	Diidroxi isosteviol	43,481	0	0	0,40	0,23
	3, 24- diidroxi 5-Cholene	39,849	0	0	0	0,12
Alcools						
	2-(2-metoxietoxi) etanol	3,974	0	0	0	0,33
	2- etil, 1- hexanol	6,715	1,65	2,71	0,86	3,39

Tabela 5 cont.

Classe	Nome	TR (min)	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
Derivados de lignina	2-Ácido propenoico, 3-(4- metoxifenil), ME	25,152	0	1,17	0	0
	2- Ácido propenoico, 3-(3,4- dimetoxifenil), ME	29,738	0,49	0	0	0,23
	2- Ácido propenoico, 2-metil, dodecil éster	36,154	0	0	0	0,12
Artefatos						
	Dimetil sulfona	3,551	0,49	0,94	1,19	0,41
	Decametil, ciclopentasiloxano	11,113	3,70	3,23	0	1,16
	Dodecametil, ciclohexasiloxano	16,403	1,04	0,81	0	0
	1,3,5-trimetil-2,4(1H,3H)-pirimidina	19,601	0	0,60	0	0
	Octametil, trisiloxano	28,924; 36,544; 37,009	0	0	2,12	0,4
	4,6-Dimetil-1,2-diidro-3- piridinacarbonitrila	36,323; 36,411; 36,540;	0	0	1,16	0,16
	Octadecil, trietoxisilano	38,683	0	0,30	0	0
	Hexametil, ciclotrisiloxano	39,401	0	1,90	0	0
	Octametil, trisiloxano	38,088	0	0	1,17	0
	4,6-Dimetil-1,2-diidro-3- piridinacarbonitrila	38,088	0	0	0	0,19
	Dodecil trietoxi, silano	38,685	0	0	3,33	1,41
	Ácido fitálico	38,688	0,52	0	0	0
	Naftaleno	39,401	0	0	0,47	0
	Hexametil, ciclotrisiloxano	39,403	1,81	5,77	0	1,73
	Octametil, trisiloxano	39,625	24,03	5,77	30,04	6,33
Não identificados						
	-	38,362	0	0	0	0,42
	-	39,253	0	0	0	0,09
	-	40,230	0	0,20	0	0,37
	-	40,964	0	0	0	0,31
	-	41,908	0	0,49	0	0,41
	-	44,305	0	0	0	0,27
	-	45,275	0	0,74	0,35	0,89
	-	46,026	0	0	0	0,11

Tabela 6: Principais compostos exsudados por plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, BPCV (*H. seropedicae*) e AH + BPCV (*H. seropedicae*) identificados por CG-EM aos 14 dias de coleta.

14 dias						
Classe	Nome	TR (min)	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
Carboidratos						
	3,4,6-tri-O-metil-D-glicose	17,688	0	0,54	0,83	0
	Metil 4-metil- α -manose	18,128; 18,890	0	0	0,55	0
	1,6-Anidro D-glucose, trimetil éter	18,339	0	0	0,77	0
	Ácido 2,4,5,6,7-pentametoxi heptanoico, ME	21,355	0	0,33	0	0
	1,2,3,4-tetrametil manose	28,814	0	1,85	1,75	0,58
	Fenil, 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-glicopirranose.	37,425; 46,564; 47,216; 47,998	0	41,61	22,57	5,62
Nitrogenados						
	3-ácido butenoico 3-metoxi-4-nitro, ME	9,575	0	3,82	0	0
	1-isocianato,4-metoxi benzeno	14,754	0	0,82	0,83	0
	3,4-dimetoxi-6-amino tolueno	20,756	2,75	4,78	5,00	5,43
	5- Metil- formil-1-(metoxi metil)-1H-pirrol-3-carboxilato, ME	21,934	0	1,21	0	0
	3,4,5-Trimetoxi benzilamina	21,938	0	0	1,18	1,21
	2,5-Dimetoxi fenil isocianato	25,066	7,41	13,18	10,64	24,19
	2,4-Dimetoxi fenilamina, N-etoxi carbonila	26,137	0	0	0,26	0,70
	3,4,5-Trimetoxi fenil cianato	28,703	0	2,23	0	0
	Tris (2,4,6-dimetilamino) pirimidina	28,709	0	0	1,75	3,34
	1,3-Benzenodiamina, N,N'-dietil	29,537	0	0,41	0	0
	4- metoximetil- 6- metil-2-propoxi- pirimidina carboxiamida	29,543	0	0	0,89	0
	2-ácido carboxílico-3-(2-etoxi carbonila-etil)-4-metil-1H-pirrol, etil éster	30,774	0	12,62	0	0
	Ácido carbônico, N-(2,4-dimetoxi fenil), monoamida, butil éster	30,775	0	0	0	6,93
	3-amino-N-(2,5-dimetoxi fenil)-3-(hidroximino), propamida	30,801	0	0	14,99	0
	N-acetil-2,3,4,5-tetrametoxi-N-acetil- Benzenoetanamina	31,834	0	0	2,83	0

Tabela 6 cont.

Classe	Nome	TR (min)	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
Ácidos graxos						
	Ácido tridecanoico, 12-metil, ME	26,506	0	0	1,26	1,62
	6-Ácido octadecenoico, ME	30,327	0	0	0	0,82
	Ácido hexadecanoico, ME	30,823	2,26	0	0	3,31
	9-Ácido octadecenoico, ME	34,261	0	0	0,73	0,84
	Ácido octadecanoico, ME	34,757	1,11	0,57	1,61	1,60
	Octadecil trietoxisilano	38,907	24,56	0,57	3,41	5,65
	Ácido ciclopropano carboxílico, 2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propenil), 2-metil-4-oxo-3-(2-propenil)-2-ciclopenteno, éster	43,743	0	0	0,70	0
Ácidos orgânicos						
	Ácido benzoico, 4,5-dimetoxi-2-(4-metoxi amino-benzeno-sulfonil)	26,507	0	1,31	0	0
Aromáticos						
	2,6-dimetoxi-4-(2-propenil) fenol	21,512	0	0,25	0	0
	2-metoxi-4-(amino metil) fenol	26,134	0	0,33	0	0
	1,5-bis [[[3,4-dimetoxi fenil)-metil amino]-metil] naftaleno-2,6-diol	30,741	1,25	0	0	0
	2,3,4-trimetoxi-5-metoxi fenol	35,007	0	0,22	0	0
	1-Metil-nonadecil, benzeno	37,803	0,78	0	1,15	1,36
Esteroides						
	Dihidro-isosteviol, ME	42,582	2,04	0	0	0
	Dihidroxi-isosteviol	42,592; 43,675	0	0	3,95	0,73
	Metil dihidro-isosteviol	43,332	0	1,47	0	0
	Patcholeno	43,430	0	0,36	0	0
	Isosteviol, ME	43,665	2,88	4,81	4,90	4,68
	3-Etil-3-hidroxi-androstan-17-ona	45,538	0,78	2,89	1,03	2,30
Álcools						
	1-Hexanol, 2-etil	6,841	0	0,39	0	0
	9-t-Butil- triciclo [4.2.1.1(2,5)] decano-9,10-diol	42,010	0	0	0	1,03
Derivados de lignina						
	Ácido benzoico, 4- hidroxi-3,5-dimetoxi	22,015	0	0,21	0	0
	1,2,3,4-Tetrametoxi benzeno	22,016	0	0	0	0,27
	Ácido benzoico, 3,4-dimetoxi,ME	23,399	0	0,72	0	0
	2- ácido propenoico, 3-(4-metoxi fenil), ME	25,316	0	1,03	0,65	0,66
	2- ácido propenoico, 3-(3,4-dimetoxi fenil), ME	29,933	0	2,61	0,75	1,24

tabela 6 cont.

Classe	Nome	TR (min)	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
Artefatos						
	Dimetil sulfona	3,610	0	0,47	0,37	0,43
	3-Etoxi-1,1,1,5,5,5-hexametil-3- (siloxitrimetil) trisiloxano	11,258	0,41	0	0	0
	Dodecametil, pentasiloxano,	12,278	4,55	0	0	0
Não identificados						
	-	31,825	0	1,63	0	0
	-	32,184	0	0,79	0	0
	-	35,248	0	0,77	0	0
	-	40,033	0	0	0	0,43
	-	42,157	0	0	0	0,24
	-	43,746	0	0	0,43	0

Tabela 7: Principais compostos exsudados por plântulas de milho tratadas com: controle (solução nutritiva), AH, BPCV (*H. seropedicae*) e AH + BPCV (*H. seropedicae*) identificados por CG-EM aos 21 dias de coleta.

21 dias

Classe	Nome	TR (min)	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
Carboidratos						
	1,6- anidro, β -D-glicopirranose	20,206	0	0	1,02	0
	2,3,4,6- tetra-O-metil, α - D- Manopirranose	28,631	3,33	0	0	0,53
	2,3,4,6-tetra-O-metil, fenil, α -D-glicopirranose	46,294	0	31,93	0	0
Nitrogenados						
	3,4-dimetoxi-6-amino tolueno	20,618	0	6,08	9,70	3,35
	5- Metil- formil-1-(metoxi metil)-1H-pirrol-3-carboxilato, ME	21,811	0	0	2,65	0
	3,4,5-Trimetoxi benzilamina	21,842	0	0	1,18	0
	2,5-Dimetoxi fenil isocianato	24,873	0	24,30	48,74	16,91
	4- dietilamino-2-hidroxibenzaldeído	26,982	0	0	2,87	0
	2,3,4-Trimetoxi fenilacetoneitrila	27,134	0	0	0,94	0
	Biciclo [2.2.1] heptano-2-acetamida, N-(1,3-dihidro-5,6-dimetoxi-3-oxo-4-isobenzofuranila	28,515	0	5,30	13,17	3,32
	N- [2-(3,4-Dimetoxi fenil) etil] acetamida	29,340	0	0	4,06	0
	4- metoximetil- 6- metil-2-propoxi-pirimidina	29,346	0	0,53	0	1,49
	Ácido carbônico, N-(2,4-dimetoxi fenil), monoamida, butil éster	30,534	9,55	0	0	0
	2,4-Dimetoxi fenilamina, N-etoxicarbonila	30,879	0	0	0,57	0
	N- (3,4,5- trimetoxi fenetilamina, acetamida	32,132	0	0	0,91	0,40

tabela 7 cont.

Classe	Nome	TR (min)	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
Ácidos graxos						
	Ácido hexadecanoico, ME	30,626	0	0	1,04	1,96
	Ácido octadecanoico, ME	34,552	0	0	0,28	0,67
	Octadecil trietóxisilano	38,706	0	0	0,26	0
Ácidos orgânicos						
	-	-	-	-	-	-
Aromáticos						
	2-Metoxi-4-vinilfenol	15,817	0	0	0,3	0
	3,4,5-Trimetoxi benzilamina	21,796	0	0	4,30	0
	5 (1-propenil)-1,2,3-trimetóxi, benzeno	24,653	0	0	0,49	0
	1,2-ácido benzeno dicarboxílico, mono (2-etilhexil) éster	41,790	0	2,37	0	7,49
	1,2-ácido benzeno dicarboxílico, diisocetil éster	41,801	69,71	0	0	0
Esteroides						
	3-etil-3-hidroxi, androstan-17-one	42,226	0	0	0,50	0
	Isosteviol, ME	43,099	0	0	17,18	0
	5 α ,6 α -Epoxi-17-oxo-6 β pentil-3,5-secoandrostan, ME	42,354	0	0	0	0,31
	5 β Pregnan-17 α , 21-diol-3,20-dione	43,091	0	0	0	25,88
	Dihidroxi isosteviol	43,425	0	9,42	0	17,03
	Pregnan-20-one, (5 α , 17 α)	43,434	2,48	0	0	0
Álcools						
	2-etil, 1-Hexanol	6,06	7,48	1,13	0	1,19
	2- fenoxi, Etanol	12,925	0	0	0,63	0
	2-(2-fenoxietoxi), etanol	21,172	0	0	1,18	0
Derivados de lignina						
	Ácido benzoico, 3,4-dimetoxi, ME	23,242	0	1,41	0	1,65
	Ácido benzoico, 3,4,5-trimetoxi, ME	26,328	0	0	2,70	0
	Ácido benzenopropanoico, 3,4-dimetoxi, ME	26,277	0	5,14	0	3,27
	2-ácido propenoico, 3-(3,4-dimetoxifenil), ME	29,738	0	5,02	4,24	3,21

tabela 7 cont.

Classe	Nome	TR (min)	Controle	AH	BPCV	AH + BPCV
Artefatos						
	Dimetil sulfona	3,518	0	0,44	1,30	0
	Ciclotetrasiloxano, octametil	5,801	0	0,98	0	0
	Ácido fitálico, metil octil éster	32,775	7,45	0	0	2,86
	Trisiloxano, octametil	39,641	0	0	0,57	0
Não identificados						
	-	30,542	0	0	0	3,14
	-	31,625	0	0	0	0,74
	-	40,833	0	0	0	0,18
	-	44,532	0	0	0	0,45
	-	46,277	0	0	0	1,72
	-	46,606	0	0,53	0	0

A lista dos compostos individuais exsudados pelas plantas é longa e inclui açúcares, aminoácidos e amidas, ácidos alifáticos e aromáticos, compostos fenólicos, ácidos graxos e esteróis que afetam de forma relevante a população microbiana na rizosfera (Neumann & Römheld, 2007). Neste trabalho foi utilizada a espectroscopia de RMN ^1H (figuras 2, 3 e 4), para fornecer as diferenças entre os perfis de exsudação induzidas por *H. seropedicae* e AH com apoio na análise de principais componentes (figura 5) que revelou que após 14 dias de tratamento começam a existir diferenças significativas entre os tratamentos. Roncato - Maccari et al. (2003), observaram que após três dias de inoculação com *H. seropedicae*, as raízes de milho tiveram colonização composta principalmente por células isoladas dessas BPCV e que somente depois de doze dias de inoculação, observou-se células bacterianas conectadas, formando um halo. Mesmo sendo considerada rápida a sinalização entre plantas e bactérias, só foram observadas alterações nos espectros de RMN ^1H após 14 dias de tratamento, quando a colonização foi bem estabelecida. A ativação de quórum sensing (QS) tem sido atribuída a uma série de compostos que atuam como agentes indutores, como

alguns oligopeptídeos, ácido 3-hidroxi-palmitico metil éster, 3,4-diidroxi-2-heptilquinolina e furanosil borato diéster (Uroz et al, 2003). Nas tabelas de CG-MS (tabelas 5, 6 e 7), observa-se que o ácido palmítico ocorre em todos os tratamentos aos 7 e 14 dias, porém aos 21 dias, este composto só ocorre no tratamento com *H. seropedicae*. Os compostos nitrogenados apresentaram notáveis diferenças entre os tratamentos com o decorrer do tempo. No tratamento controle houve diminuição desses compostos no final dos 21 dias de coleta, enquanto que os outros tratamentos apresentaram aumento na quantidade e diversidade desses compostos com o tempo. Alguns compostos nitrogenados como a bezenamina ($C_6H_5CONH_2$), o 2,4-dimetoxi, 3,4-Dimetoxi-6-amino-tolueno e 2,5-dimetoxi fenil isocianato, foram encontrados nos exsudados e provavelmente, são formas derivadas de compostos aromáticos / fenólicos que reagiram com o TMAH (utilizado na derivatização das amostras), já os compostos fenólicos são os principais metabólitos secundários sintetizados por plantas de milho e estes reagem prontamente com o NH_2 . A pirimidina é a classe de compostos químicos caracterizados por um anel de piridina substituído por duas carbonilas. O 2,4 (1H, 3H)- piridina, 1,3,5-trimetil é típico de derivados de uracila e pode fazer parte das nucleobases do ácido nucleico de RNA. O pirrol derivado de ácido carboxílico pode ter sido originado a partir da via do L-triptofano, que já foram descritos como agentes antibacterianos. Verificou-se uma poliamina derivada de espermina. Este composto tem sido associado a uma grande variedade de processos metabólicos em plantas que vão desde a divisão celular e organogênese a proteção contra o estresse (Uroz et al., 2003).

Os compostos nitrogenados e os ácidos graxos como os ésteres metílicos (devido a alquilação química e processo de metilação para a diminuição da polaridade da amostra) foram os principais produtos liberados pelas raízes de plântulas de milho.

Os ácidos esteárico e palmítico foram os principais ácidos graxos exsudados por raízes de plântulas de milho. Estes ácidos graxos em plantas são predominantemente sintetizados pela acetil-CoA carboxilase e pelo ácido graxo sintetase. Terpenoides derivados do ácido caurenico envolvidos na via de produção de ácido giberélico foram encontrados em todos os tratamentos, ocorrendo maior diversidade nos tratamentos com *H. seropedicae* e AH + *H. seropedicae*. Amaral et al. (2013), verificaram que a inoculação de *H.*

seropediae em plântulas de milho provocaram aumento significativo na transcrição de genes oxidase ent-caurenos, que estão associados à síntese de giberelina.

Para que ocorra a colonização de bactérias nas raízes das plantas é necessário que ocorra movimentação dos microrganismos para a superfície da raiz, adsorção e de ancoragem . A adsorção pode ser facilitada pela presença de AH, devido principalmente a suas estruturas heterogêneas, irregulares e anfifílicas com alta densidade de carga e núcleos hidrofóbicos (Piccolo , 2002). A movimentação flagelar de microrganismos pode ser ativada por compostos liberados pelas raízes de plantas (quimiotaxia), como *H. seropedicae* possui flagelo em sua estrutura, pode ter ocorrido estímulo para aproximação da BPCV à rizosfera como já visto com outros microrganismos (Weert et al. 2002).

6. Conclusões

- 1- Exsudados de plântulas de milho são compostos principalmente por ácidos graxos e compostos nitrogenados;
- 2- Plântulas tratadas com ácidos húmicos e com *H. seropedicae* mudam o perfil de exsudação de raízes de plântulas de milho;
- 3- Mudanças no perfil de exsudação induzidas pelos tratamentos foram mais evidentes aos 14 e 21 dias após a aplicação e resultaram em maior exsudação de ácidos graxos em tratamentos com ácidos húmicos e compostos nitrogenados e terpenos pelos tratamentos com *H. seropedicae*. O entendimento da influência dos inoculantes bacterianos e tratamentos com substâncias húmicas nos exsudados de plantas pode ser uma importante ferramenta para a compreensão do metabolismo das plantas em resposta ao bioinoculante e melhorar o resultado das culturas de campo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, F.P., Bueno, J.C.F., Hermes, V.S., Arisi, A.C.M. (2013) Gene expression analysis of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *Symbiosis*, 62:41-50.
- Andersen, J.R., Zein, I., Wenzel, G., Krützfeldt, B., Eder, J., Ouzunova, M., Lübberstedt, T. (2007) High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a phenylalanine ammonia-lyase locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Theor. Appl. Genet.*, 114:307–319.
- Aulakh, M.S., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J., Rennenberg, H. (2001) Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant biol.*, 3:139-148.
- Awad, A.A., Sato, D., Kusumoto, D., Kamioka, H., Takeuchi, Y., Yoneyama, K. (2006) Characterization of strigolactones, germination stimulants for the root parasitic plants *Striga* and *Orobanche*, produced by maize, millet and sorghum. *Plant Growth Regulation*, 48:221–227.
- Azaizeh, H.A., Marschner, H., Römheld, V., Wittenmayer, L. (1995) Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and other soil microorganisms on growth, mineral nutrient acquisition and root exudation of soil-grown maize plants. *Mycorrhiza*, 5:321-327.
- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez- Campos, E., Bouquelet, S., Zenteno, E. (2003) Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effect on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil*, 249:271–277.
- Badri, D.V., Vivanco, J.M. (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*, 32:666–681.
- Badri, D.V., Loyola-Vargas, V.M., Du, J., Stermitz, F.R., Broeckling, C.D., Iglesias-Andreu, L., Vivanco, J.M. (2008) Transcriptome analysis of Arabidopsis roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytologist*, 179:209-223.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. (2006) The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:233–66.
- Bais H.P., Walker T.S., Schweizer H.P., Vivanco J.M. (2002) Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of sweet basil (*ocimum basilicum* l.). *Plant physiol. Biochem.*, 40:983-995.
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 30:485-491.

- Balzi, E., Goffeau, A. (1994) Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1187:152-162
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. (2005) Microbial cooperation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 56:1761-1778.
- Batley, N.H., Blackbourn, H.D. (1993) The control of exocytosis in plant cells. *New Phytol.*, 125:307–308.
- Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A. (2003) Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 35:1183–1192.
- Bertin, C., Yang, X., Weston, L.A. (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256:67–83.
- Bonkowski, M. (2004) Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytol.*, 162:617–631.
- Cakmak, I., Marschner, H. (1988) Increase in membrane permeability and exudation in root of zinc deficient plants. *J. Plant Physiol.*, 132:356–361.
- Cakmak, I., Erenoglu, B., Gülüt, K.Y., Derici, R., Römheld, V. (1998) Light-mediated release of phytosiderophores in wheat and barley under iron or zinc deficiency. *Plant and Soil*, 202:309–315.
- Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2004) Chemical nature of soil humified fractions and their activity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 39(3):233-240.
- Canellas, L.P., Dobbss, L.B., Oliveira, A.L., Chagas, J.G., Aguiar, N.O., Rumjanek, V.M., Novotny, E.H., Olivares, F.L., Spaccini, R., Piccolo, A. (2012) Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *European Journal of Soil Science*, 63:315–324.
- Canellas, L.P., Teixeira Junior, L.R.L., Dobbss, L.B., Silva, C.A., Medici, L.O., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R. (2008) Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Ann. Appl. Biol.*, 153:157–166.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Facanha, A.L., Facanha, 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*, 130:1951–1957.
- Canellas, L.P., Balmori, D.M., Medice, L.O., Aguiar, N.O., Campostrini, E., Rosa, R.R.C., Façanha, A.R., Olivares, F.L. (2013) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*, 366:119-132.
- Cesco, S., Mimmo, T., Tonon, G., Tomasi, N., Pinton, R., Terzano, R., Neumann, G., Weisskopf, L., Renella, G., Landi, L., Nannipieri, P. (2012) Plant-borne

flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biol Fertil Soils*, 48:123–149.

Chrispeels, M., Raikhel, N.V. (1992) Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell*, 68:613–616.

Chrispeels, M. (1991) Sorting of proteins in the secretory system. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41:21-53.

Cozzolino, A., Conte, P., Piccolo, A. (2001) Conformational changes of humic substances induced by some hydroxy-, keto-, and sulfonic acids. *Soil Biol Biochem*, 33:563–571.

Curl, E.A., Truelove, B. (1986) In: Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (eds) *The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Marcel. Dekker, New York, NY, USA, p. 23–57.

Cruz, C.D., Regazzi, A.J. (2001) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 2.ed., Rev. Viçosa, MG: UFV, 390p.

Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F. (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment*, 32:1682–1694.

Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7:1085–1097.

Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, Embrapa-SPI: Itaguaí, Embrapa- CNPAB, 60p.

El-Baz, F.K., Mohamad, A.A., Aboul-Enein, A.M., Salama, Z.A. (2004) Alteration in root exudates level during Fe-deficiency in two cucumber cultivars. *Int. J. Agr. Biol.* 6:45–48.

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.

Fan, T.W.M., Lane, A.N., Pedler, J., Crowley, D., Higashi, R.M. (1997) Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 251:57-68.

Ferretti, M., Ghisi, R., Nardi, S., Passera, C., (1991) Effect of humic substances on photosynthetic sulphate assimilation in maize seedlings. *Canadian Journal of Soil Science* 71:239–242.

- Gagnon, H., Seguin, J., Bleichert, E., Tahara, S., Ibrahim, R.K. (1992) Biosynthesis of white lupin isoflavonoids from [U-14C] Lphenylalanine and their release into the culture medium. *Plant Physiol.*, 100:76–79.
- Gray, E.J., Smith, D.L. (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry*, 37:395–412.
- Hale, M.G., Moore, L.D., Griffin, G.J. (1978) Root exudate and exudation. In Domergues V.R., Krupa, S.V. (eds.), *Interactions Between Non-pathogenic Soil Microorganisms and Plants*, Elsevier, Amsterdam, p. 163.
- Hayes, J.E., Zhu, Y.-G., Mimura, T., Reid, R.J. (2004). An assessment of the usefulness of solution culture in screening for phosphorus efficiency in wheat. *Plant and Soil*, 261:91–97.
- Hodge, A., Grayston, S.J., Ord, B.G. (1996) A novel method for characterization and quantification of plant root exudates. *Plant and soil*, 184:97-104.
- Hoffland, E., Findenegg, G.R., Nelemans, J.A. (1989) Solubilization of rock phosphate by rape. II. Local root exudation of organic acids as a response to P starvation. *Plant and Soil*, 113:161–165.
- Hoffland, E., Wei, C., Wissuwa, M. (2006) Organic anion exudation by lowland rice (*Oryza sativa* L.) at zinc and phosphorus deficiency. *Plant and Soil*, 283:155–162.
- Ishikawa, S., Adu-Gyamfi, J.J., Nakamura, T., Yoshihara, T., Watanabe, T., Wagatsuma, T. (2002) Genotypic variability in phosphorus solubilizing activity of root exudates by pigeonpea grown in low-nutrient environments. *Plant Soil*, 245:71–81.
- Jackson, M.B., Armstrong, W. (1999) Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology*, 274-287.
- Jones, D.L., Hodge, A., Kuzyakov (2004) Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist*, 163:450-480.
- Jones, D.L. (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil*, 205:25–44.
- Jones, D. L., Darrah, P. R. (1995) Influx and efflux of organic acids across the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in rhizosphere C flow. *Plant Soil*, 173:103–109.
- Jones, D.L., Edwards, A.C., Donachie, K., Darrah, P.R. (1994) Role of proteinaceous amino acids released in root exudates in nutrient acquisition from the rhizosphere. *Plant Soil*, 158:183–192.

- Kamilova, F., Kravchenko, I.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T., Makarova, N., Lugtenberg, B. (2006) Organic acids, sugars and Ltryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 19:250-256.
- Keith, H., Oade, J.M. (1986) Input of carbon to soil from wheat plants. *Soil biology and biochemistry*, 18:445-449.
- Kidd, P.S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B., Barceló, J. (2001) The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of experimental Botany*, 52:1339-1352.
- Kobae, Y., Sekino, T., Yoshioka, H., Nakagawa, T., Martinoia, E., Maeshima, M. (2006) Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant Cell Physiology*, 47:309–318.
- Kumar, R., Bhatia, R., Kukreja, K., Behl, R.K., Dudeja, S. S., Narula, N. (2007) Establishment of *Azotobacter* on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*G. hirsutum* L.) and wheat (*T. aestivum* L.). *J. Basic Microbiology*, 47:436- 439.
- Lesuffleur, F., Paynel, F., Bataille, M., Deunff, E.L., Cliquet, J.B. (2007) Root amino acid exudation: measurement of high efflux rates of glycine and serine from six different plant species. *Plant Soil*, 294:235–246.
- Liao, H., Wan, H., Shaff, J., Wang, X., Yan, X., Kochian, L.V. (2006) Phosphorus and aluminium interactions in Soybean in relation to aluminium tolerance exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. *Plant Physiology*, 141:674–684.
- Liu, Y., Mi, G., Chen, F., Zhang, J., Zhang, F. (2004) Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea Mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P availability. *Plant Science*, 167:217-223.
- Lu, Y., Wassmann, R., Neue, H.U, Huang, C. (1999) Impact of phosphorus supply on root exudation, aerenchyma formation and methane emission of rice plants. *Biogeochemistry*, 47:203–218.
- Lu, Y., Wassmann, R., Neue, H.U, Huang, C. & Bueno, C.S. (2000) Methanogenic responses to exogenous substrates in anaerobic rice soils. *Soil Biol. Biochem.*, 32:1683-1690.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E. (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trend in Plant Science*, 6:273-278.
- Maathuis, F.J.M., Filatov, V., Herzyz, P., Krijger, G.C., Axelso, K.B., Chen, S., Green, B.J., Li, Y., Madagan, K.L., Sanchez-Fernandez, R. (2003) Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Plant J.*, 35:675–692.

- Marques Junior, R.; Canellas, L.P.; Silva, L.G., Olivares, F.L.(2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 32:1121-1128.
- Marschener, H. (1998) Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. *Field Crops Research*, 56:203-207.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolulisaoglu, U., Muller-Rober, B., Schluz, B. (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters: more than just detoxifiers. *Planta*, 214:345–355.
- Merlo, L., Ghisi, R., Rascio, N., Passera, C., (1991) Effects of humic substances on carbohydrate metabolism of maize leaves. *Canadian Journal of Plant Science*, 71:419–425.
- Musco, A., Siari, M., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2007) The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures. *J. Chem. Ecol.*, 33:115–129.
- Nardi, S., Arnoldi, G., Dell’Agnola, G. (1988) Release of the hormone-like activities from *Allolobophora rosea* and *A. caliginosa* faeces. *Canadian Journal of Soil Science*, 68:563–567.
- Nardi, S., Concheri, G., Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G. (2000) Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere*, 41:653–658.
- Nardi, S., Pizzeghello, C., Ferrarese, L., Trainotti, L., Casadoro, G. (2000) A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(3):415-419.
- 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., Tosoni, M., Pizzeghello, D., Provenzano, M.R., Cilenti, A., Sturaro, A., Rella, R., Vianello, A. (2005) Chemical characteristics and biological activity of organic substances extracted from soils by root exudates. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 69:2012–2019.
- 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 Biol. Biochem.*, 39:3138–3146.
- Narula, N., Kothe, E., Behl, R. K. (2009) Role of root exudates in plant-microbe interactions. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 82:122-130.

- Neumann, G., Romheld, V. (1999) Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil*, 211:121-130.
- Neumann, G., Romheld, V. (2007) The release of root exudates as affected by the plants physiological status. In: Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (eds) *The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Marcel. Dekker, New York, NY, USA, p. 23–57.
- Nguyen, C. (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, 23:375–396.
- Nishizawa, N.K., Mori, S. (1987) The particular vesicles appearing in barley root cells and its relation to mugenic acid secretion. *J. Plant Nutr.*, 10:1013–1020.
- Oburger, E., Dell'maour, M., Hann, S., Wieshammer, G., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W. (2012). Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. *Environmental and Experimental Botany*, 87:235-247.
- Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* In roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, 21:197-200.
- Paterson, E. (2003) Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity. *European Journal of Soil Science*, 54:741-750.
- Paynel, F., Murray, P.J., Cliquet, J.B. (2001) Root exudates: a pathway for short term N transfer from clover and ryegrass. *Plant and Soil*, 229:235–243.
- Personeni, E., Nguyen, C., Marchal, P., Pagès, L. (2007) Experimental evaluation of an efflux-influx model of C exudation by individual apical root segments. *J. Exp. Bot.*, 58:2091–2099.
- Petersen, W., Böttger (1991) Contribution of organic acids to the acidification of the rhizosphere of maize seedlings. *Plant and Soil*, 132:159-163.
- Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agronomy*, 75:57–134.
- Piccolo, A., Conte, P., Cozzolino, A. (2001) Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances compared with macromolecular polymers. *Soil Science*, 16603:174-185.
- Piccolo, A., Conte, P., Cozzolino, A. (1999) Conformational association of dissolved humic substances as affected by interactions with mineral and monocarboxylic acids. *European journal of soil science*, 50:687-694.

- Pinton, R., Nannipieri, P., Varanini, Z. (2007). *The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. 2. ed London, CRC 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 soil*, 215:155-161.
- Puglisi, E., Fragoulis, G., Ricciuti, P., Cappa, F., Spaccini, R., Piccolo, A., Trevisan, M., Crecchio, C. (2009) Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea mays* L.). *Chemosphere*, 77:829–837.
- Puglisi, E., Fragoulis, G., Del Re, A.A.M., Spaccini, R., Piccolo, A., Gigliotti, G., Said-Pullicino, D., Trevisan, M. (2008) Carbon deposition in soil rhizosphere following amendments with compost and its soluble fractions, as evaluated by combined soil–plant rhizobox and reporter gene systems. *Chemosphere*, 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.). *Journal of Experimental Botany*, 55:803-813.
- Ratnayale, M., Leonard, R.T., Menge, A. (1978) Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal infection. *New Phytol.*, 81:543-552.
- Rima, J.A.H., Martim, S.A., Dobbss, L.B., Evaristo, J.A.M., Retamal, C.A., Façanha, A.R., Canellas, L.P. (2011) Adição de ácido cítrico potencializa a ação de ácidos húmicos e altera o perfil protéico da membrana plasmática em raízes de milho. *Ciência rural- Scielo Brasil*, 41:614-620.
- Roncato-Maccari, L.D.B., Ramos, H.J.O., Alquini, Y., Chubatsu, L.S., Yates, M. G., Rigo, L.U., Steffens, M.B., Souza, E.M. (2003) Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *Microbiology Ecology*, 45:39-47.
- Rougier, M. (1981) Secretory activity of the root. Plant Carbohydrates II. In: Tanner, W., Leowus. *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer, Berlin.
- Rovira, A.D. (1969) Plant root exudates. *Botanical Reviews*, 35:35–57.
- Rovira, A.D. (1959) Root excretions in relation to the rhizosphere effect. *Plant and Soil*, 11:55-64.
- Rovira, A. D. (1956) Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. *Plant and Soil*, VII, n °2.
- Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Paré, P.W., Bais, H.P. (2008) Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology*, 148:1547-1556.

- Ryan, P.R., Delhaize, E., Randall, P.J. (1995) Characterization of Al stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Plant*, 196:103-110.
- Sakaguchi, T., Nishizawa, N.K., Nakanishi, H., Yoshimura, E. (1999) The role of potassium in the secretion of megineic acids family phytosiderophores from iron-deficient barley roots. *Plant Soil*, 215:221–227.
- Sandnes, A., Eldhuset, T.D., Wollebaek, G. (2005) Organic acids in root exudates and soil solution of Norway spruce and silver birch. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:259-269.
- 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.). *J Chem. Ecol.*, 36:662-669.
- Shahbaz, A.M., Oki, Y., Adachi, T., Murata, Y., Khan, Md.H.R. (2006). Phosphorus starvation induced root-mediated pH changes in solubilization and acquisition of sparingly soluble P sources and organic acids exudation by Brassica cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition*, 52:623-633.
- Sladky, Z., (1959) The effect of extracted humus substances on growth of tomato plants. *Biologia Plantarum* 1:142-150.
- Steenhoudt, O., Vanderleyden, J. (2000) Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:487-506.
- Stein, M., Dittgen, J., Sanchez-Rodriguez, C., Hou, B.H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V., Somerville, S. (2006) Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell*, 18:731-746.
- Stevenson, F.J., (1994). *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*, 2. ed., Wiley, New York, 496 p.
- Ström, L., Olsson, T., Tyler, G., (1994) Differences between calcifuges and acidifuge plants in root exudation of low molecular weight organic acids. *Plant and Soil*, 167:239-245.
- Szczyepka, M.S., Wemmie, J.A., Moye-Rowley, W.S., Thiele, D.S., (1994) A yeast metal resistance protein similar to human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol. Chem.*, 269:22853-22857.
- Tan, K.H. (1998) Colloidal chemistry of organic soil constituents. *In*: Tan, K.H., (ed). *Principles of soil chemistry*, Marcel Dekker, New York. 177-258 p.
- Tang, C.-S., Young, C.-C. (1982) Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of Bigalga Limpograss (*Hemarthria altissima*). *Plant physiology*, 59:155-160.

- Theodoulou, F.L. (2000) Plant ABC transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1465:79-103.
- Tu, S., Ma, L., Luongo, T. (2004) Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyper accumulating *Nephrolepis exaltata*. *Plant Soil*, 258:9-19.
- Uren, N.C., Reisenauer, H.M. (1988) The role of root exudates in nutrient acquisition. *Advances in plant nutrition*, 3:79.
- Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasmri, M., Sicot, C., Petit, Oger, P., Faure, D., Dessaux, Y. (2003) Novel bacteria degrading N-acylhomoserin lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology*, 149:1981-1989.
- Vaughan, D., Malcom, R.E., Ord, B.G., (1985) Influence of humic substances on biochemical processes in plants. In: Vaughan, D., Malcom, R.E. (eds.). *Soil organic matter and biological activit*. The Netherlands, 77–108 p.
- Visser, S.A., (1986) Effetto delle sostanze umiche sulla crescita delle piante. In: Burns, R.G., Dell'Agnola, G., Miele, S., Nardi, S., Savoini, G., Schnitzer, M., Sequi, P., Vaughan, D., Visser, S.A. (Eds.). *Sostanze Umiche. Effetti sul Terreno e sulle Piante*, Ramo Editoriale degli Agricoltori, Roma, 96-143 p.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Halligan, K.M., Stermitz, F.R., Vivanco, J. M. (2003) Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *J. Agric. Food Chem.*,51:2548-2554.
- Watt, M., Evans, J.R. (1999) Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiology*, 121:317-323.
- Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I. H. M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G.N., Vanderleyden, J., Mot, R., Lugtenberg, B.J.J. (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular plant*,11:1173-1180.
- Whipps, J.M. (1990) Carbon economy. In: Lynch, J.M. (ed.). *The Rhizosphere*. JohnWiley & Sons Ltd, Essex, UK, 59-97 p.
- Wouterlood, M., Cawthray, G.R., Scanlon, T.T., Lambers, H., Veneklaas, E.J., (2004) Carboxylate concentrations in the rhizosphere of lateral roots of chickpea (*Cicer arietinum*) increase during plant development, but are not correlated with phosphorous status of soil or plants. *New Phytologist*, 745-753.
- Yang, C.C., Crowley, D. E. (2000) Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl Environ Microbiol.*, 66:345-351.

- 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*, 225:1583-1595.
- Zhu, Y., Yan, F., Zorb, C., Schubert, S. (2005) A link between citrate and proton release by proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) grown under phosphorus-deficient conditions. *Plants Cell Physiol.*, 46:892-901.

APÊNDICES

Apêndice A

Figura 1A: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho controle (solução nutritiva) aos 7 dias de coleta.

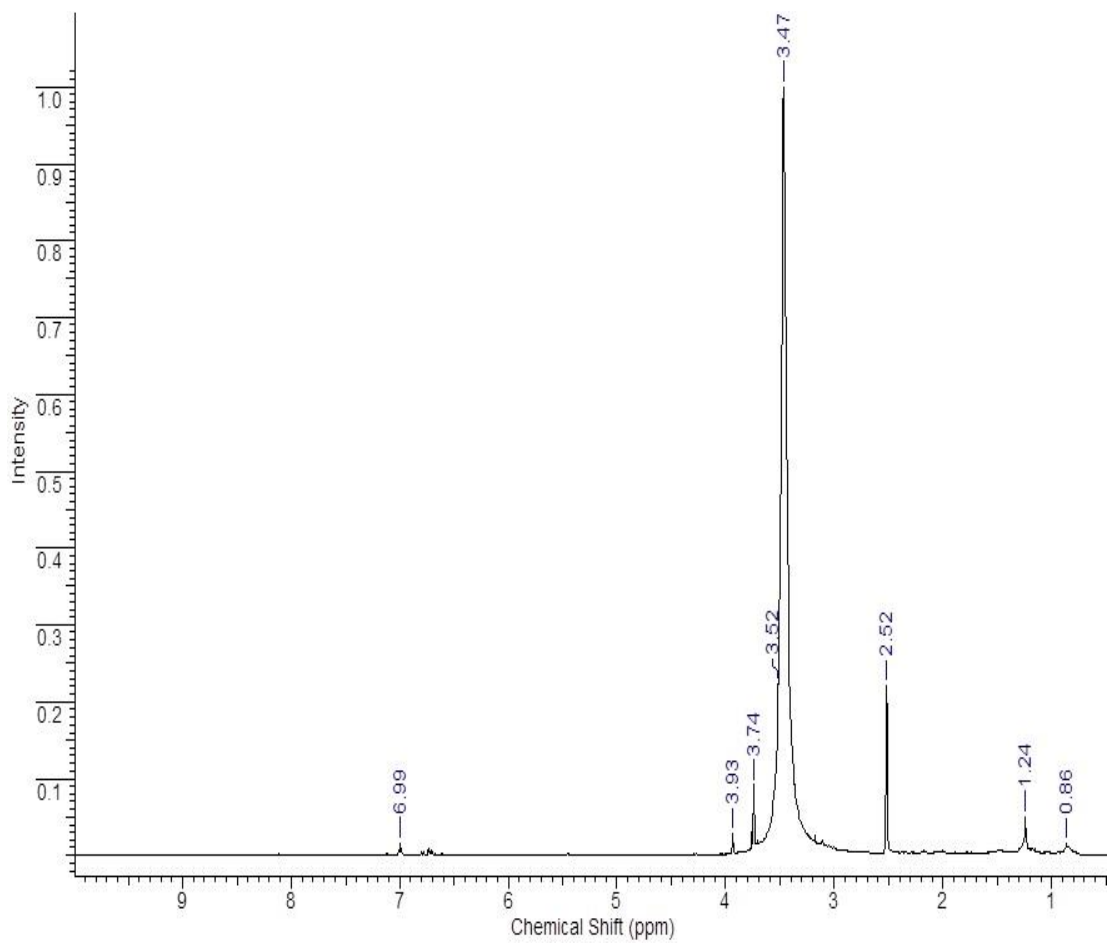


Figura 2A: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com AH aos 7 dias de coleta.

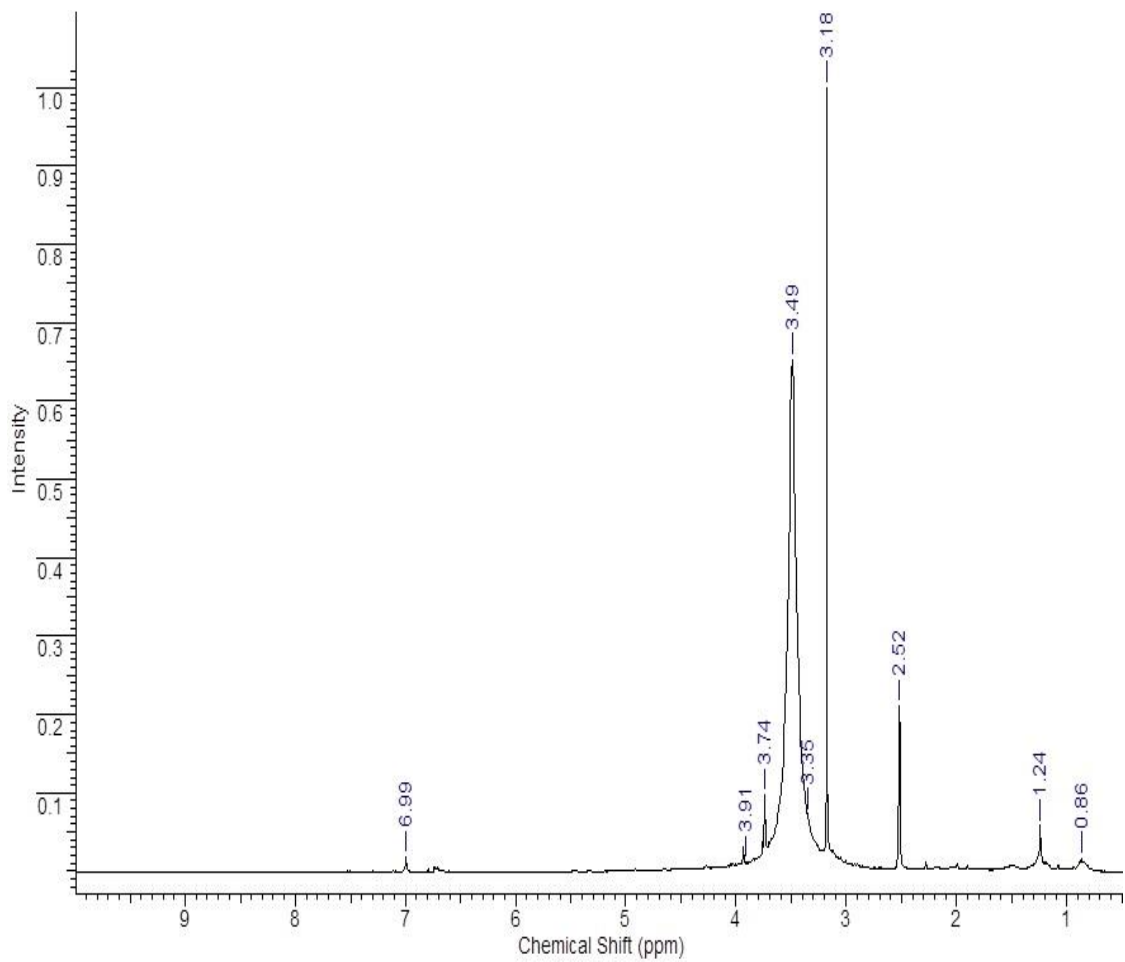


Figura 3A: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com *H. seropedicae* aos 7 dias de coleta.

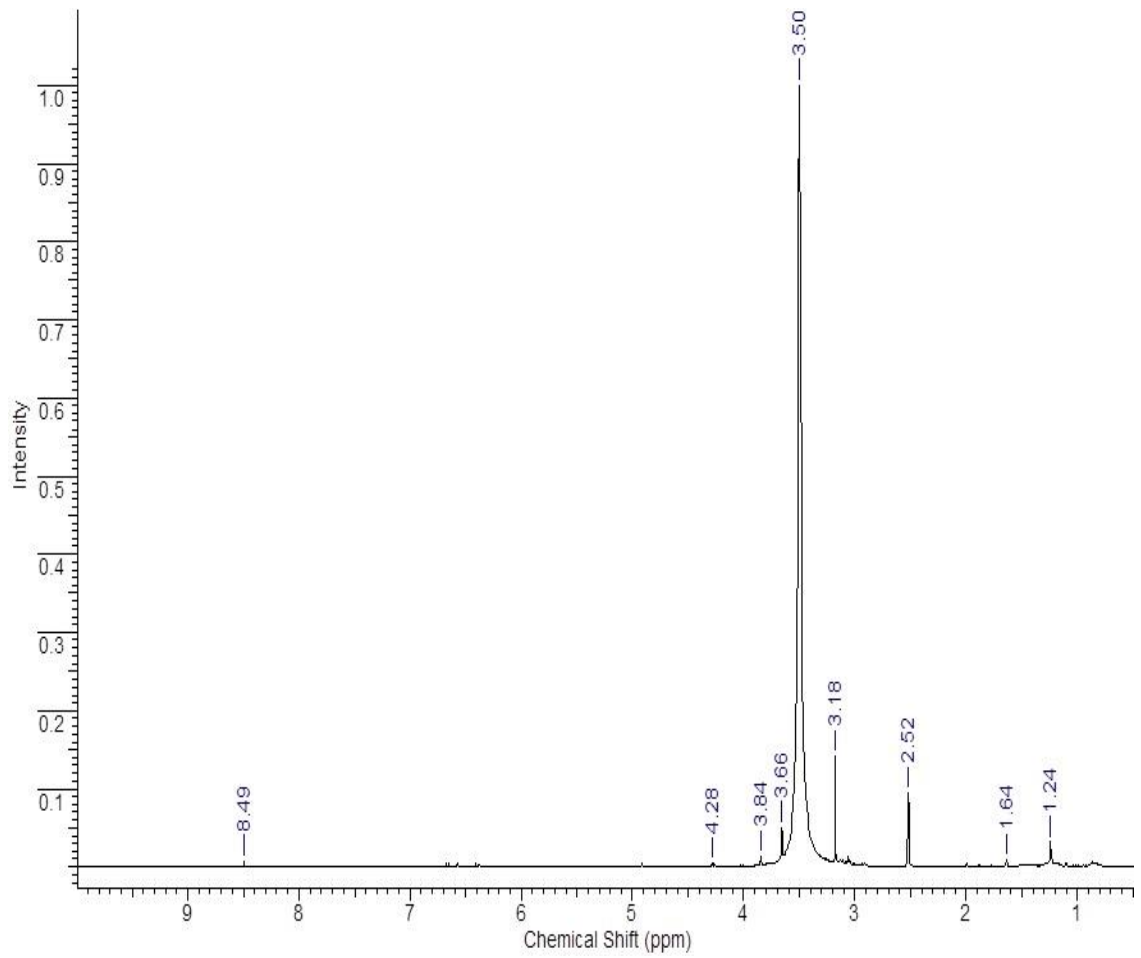
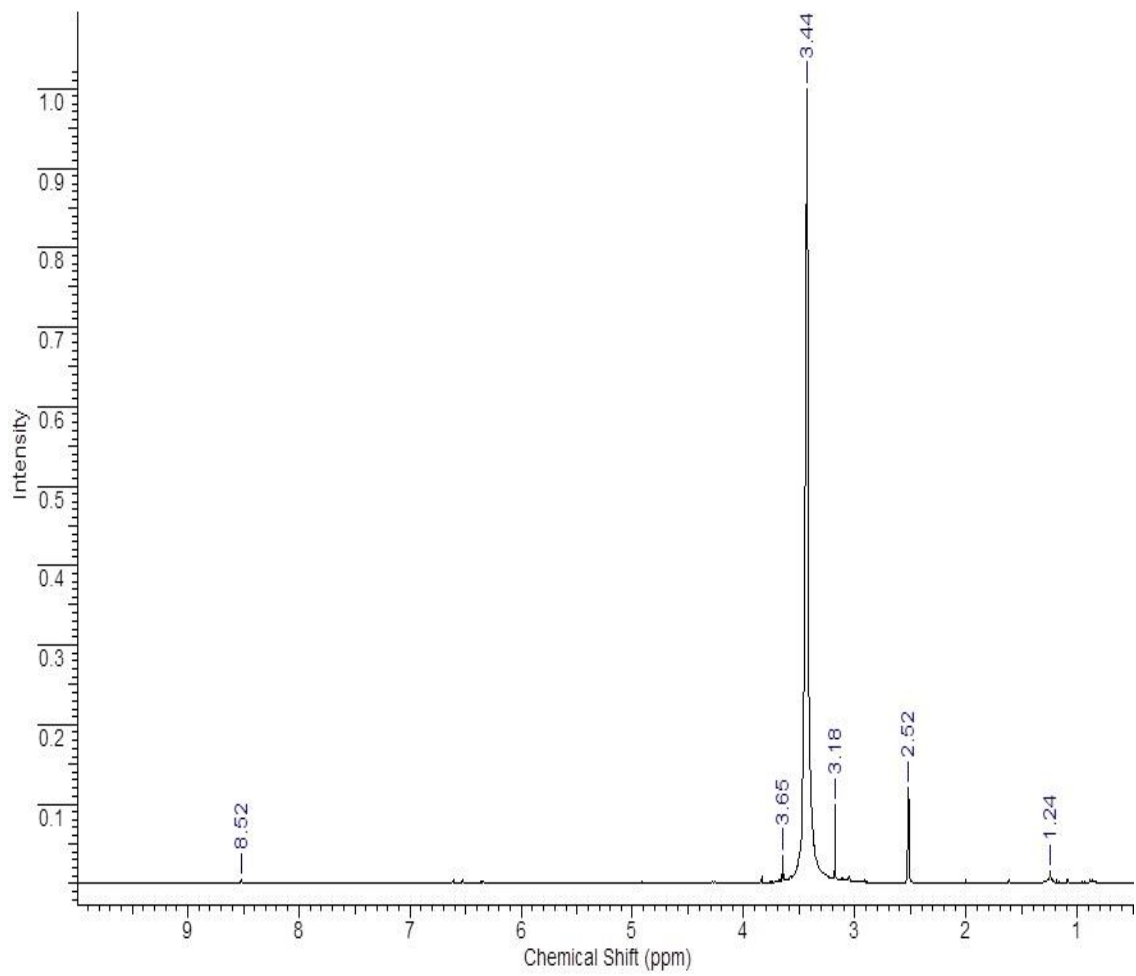


Figura 4A: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com AH+ *H. seropedicae* aos 7 dias de coleta.



Apêndice B

Figura 1B: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho controle (solução nutritiva) aos 14 dias de coleta.

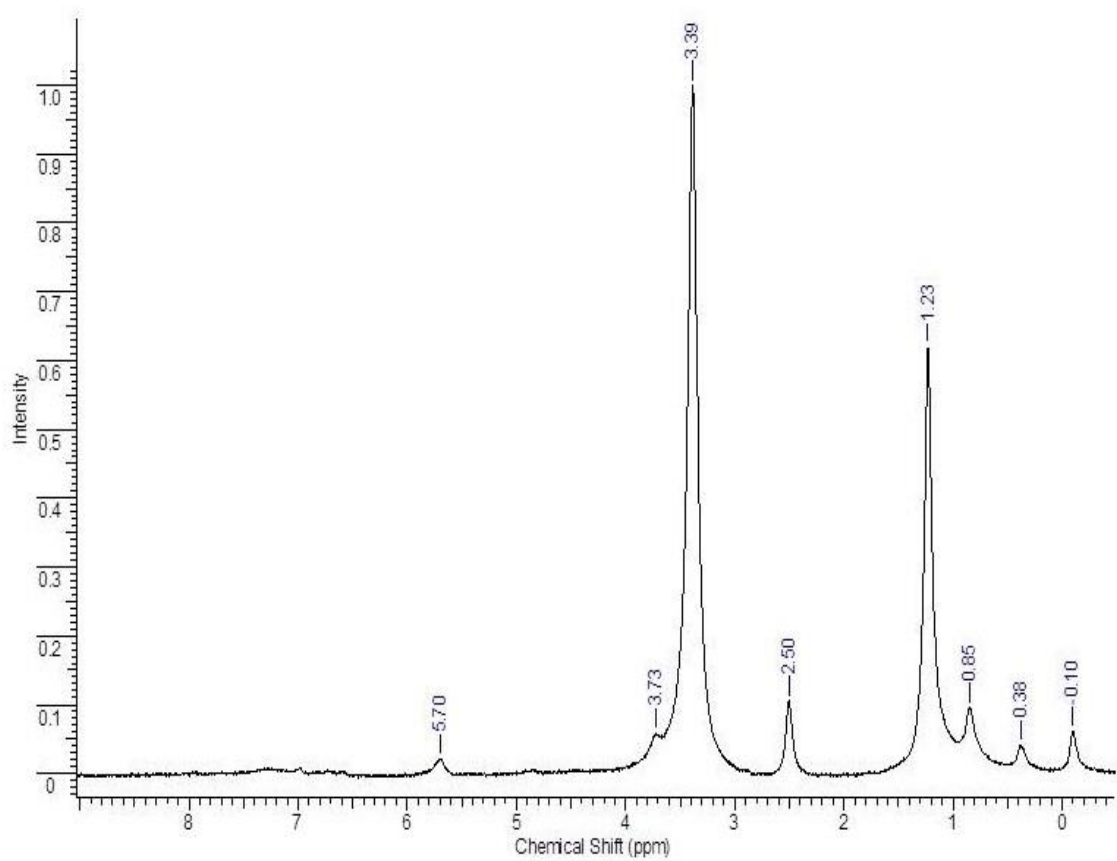


Figura 2B: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com AH aos 14 dias de coleta.

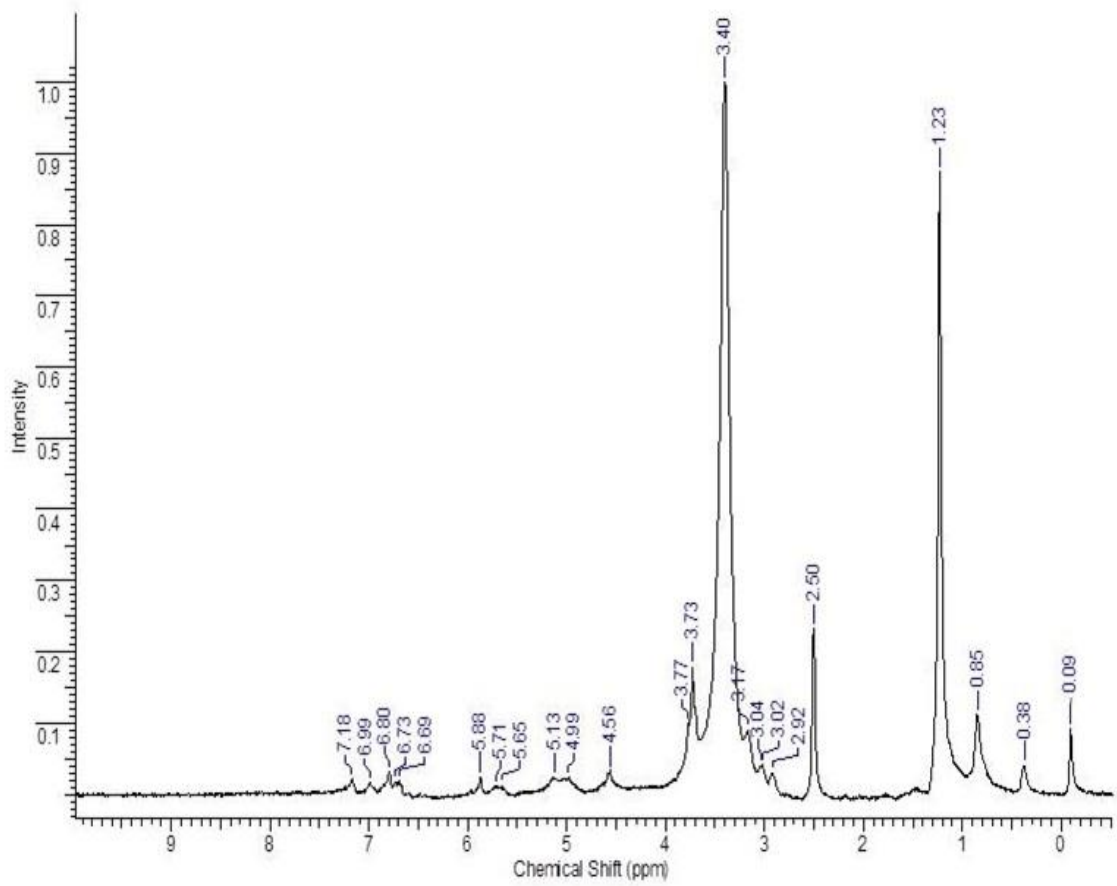


Figura 3B: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com *H. seropedicae* aos 14 dias de coleta.

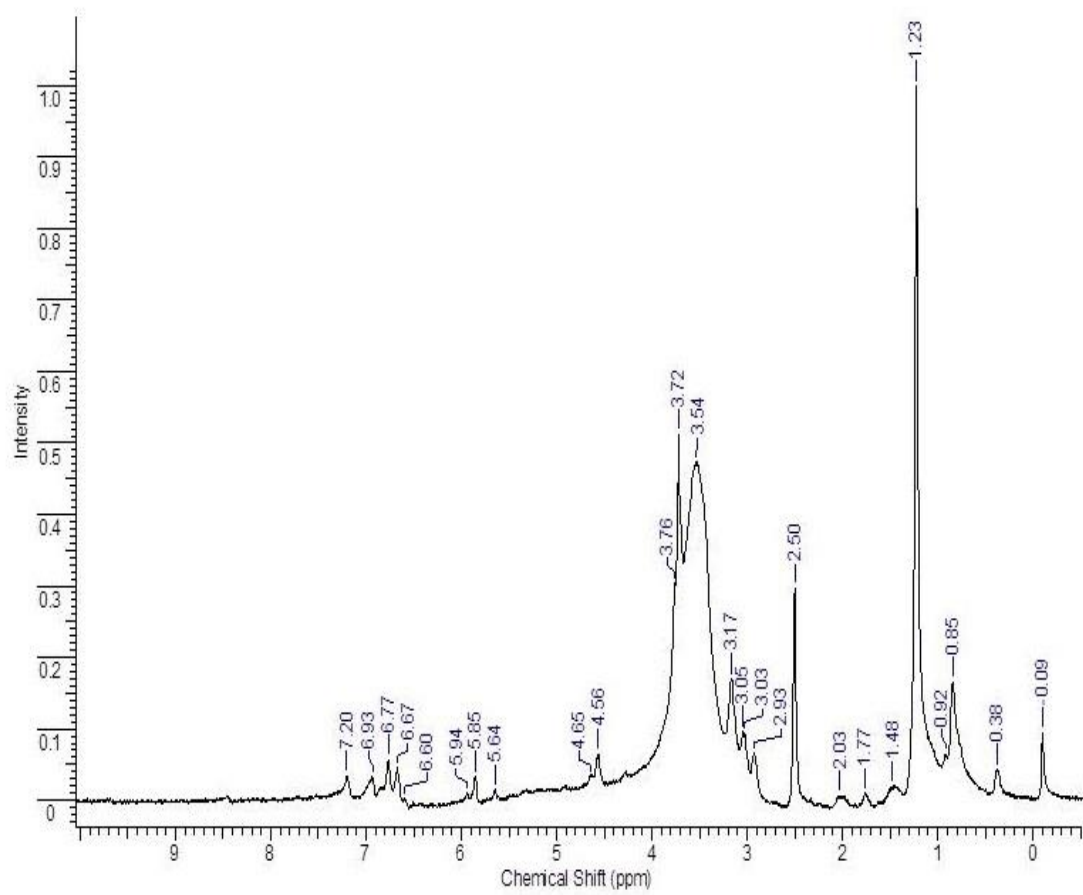
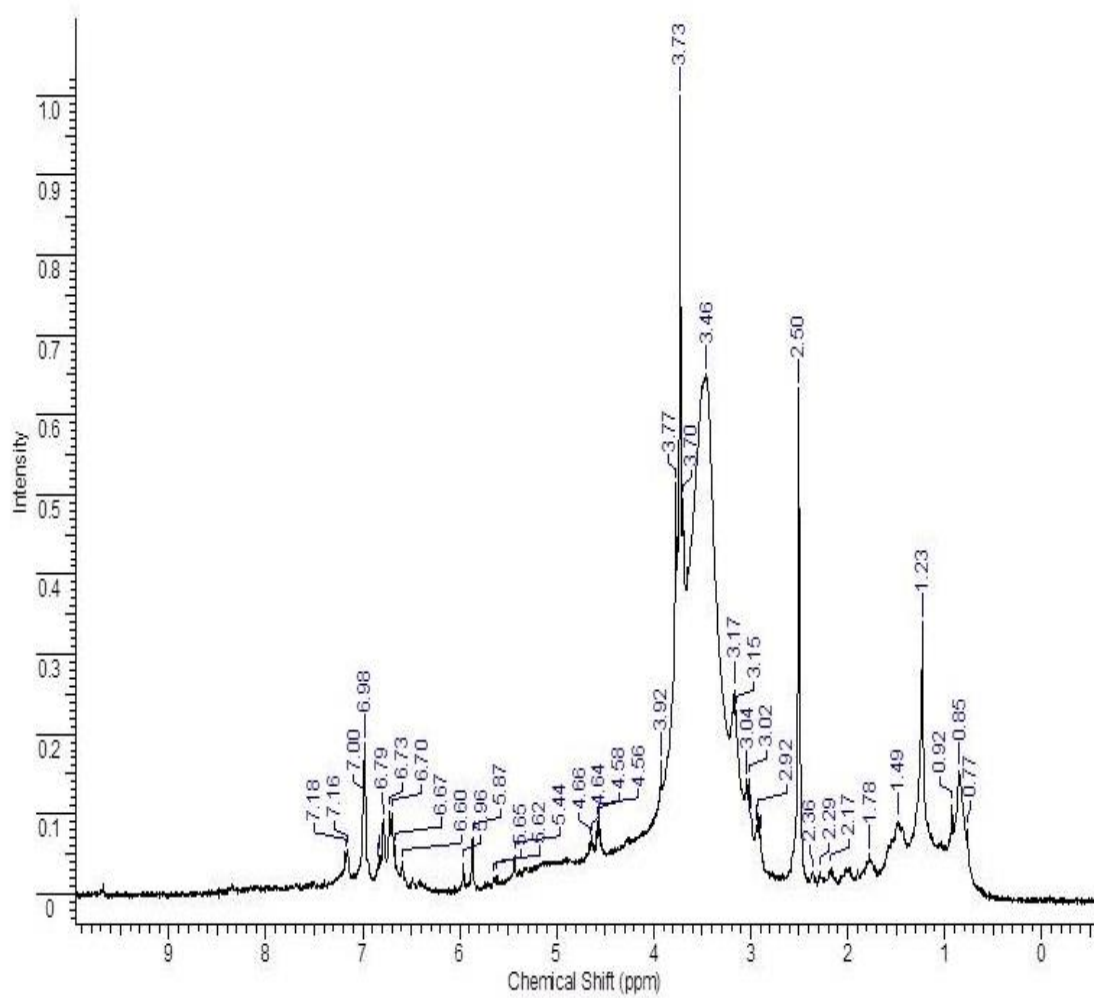


Figura 4B: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com AH + *H. seropedicae* aos 14 dias de coleta.



Apêndice C

Figura 1C: Espectro de RMN ¹H dos exsudados radiculares de plântulas de milho controle (solução nutritiva) aos 21 dias de coleta.

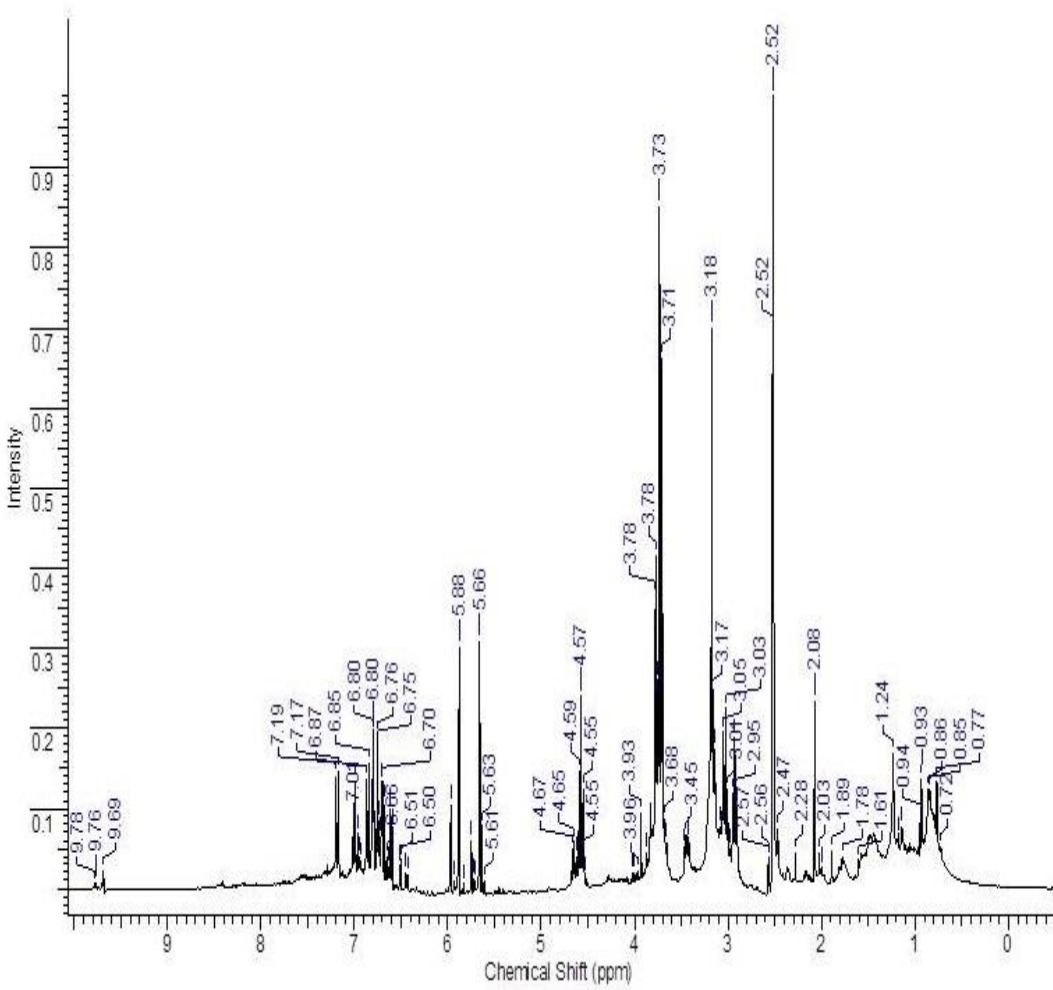


Figura 2C: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com AH aos 21 dias de coleta.

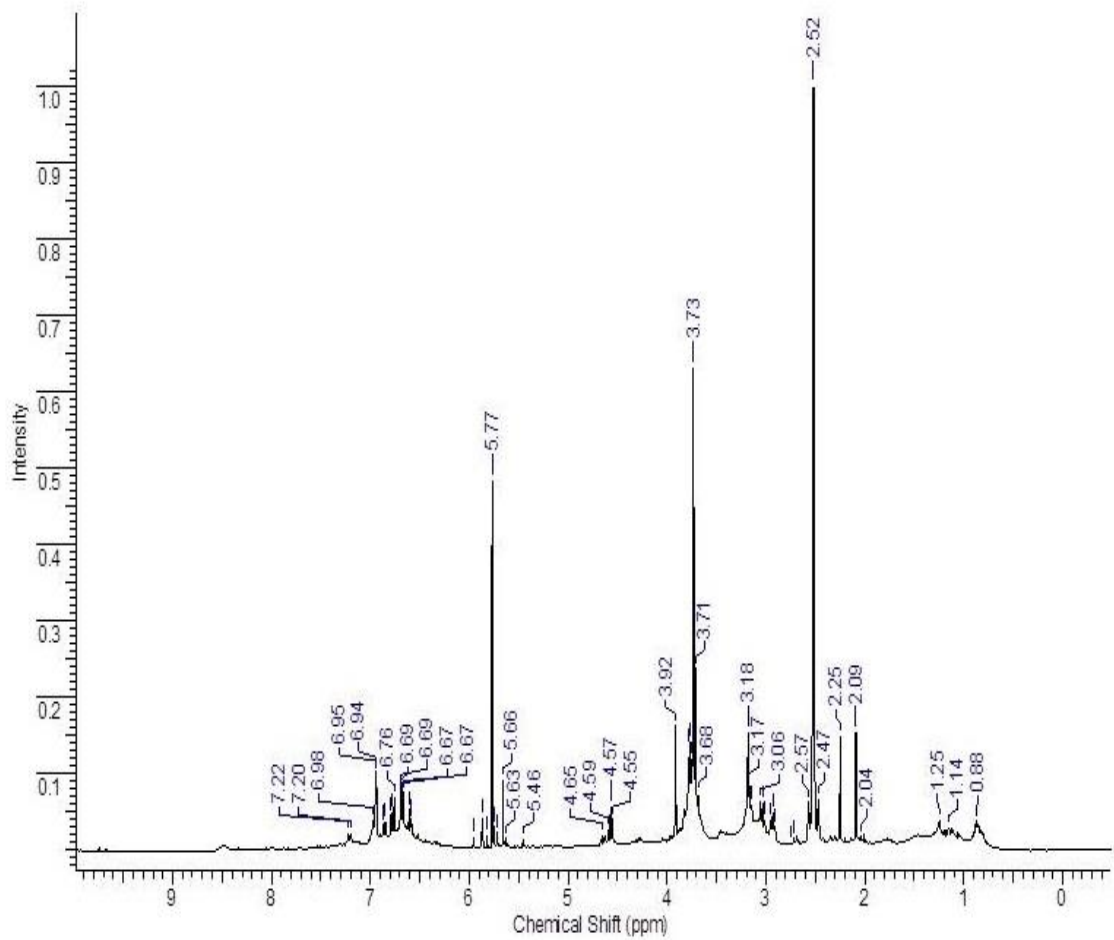


Figura 3C: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com *H. seropedicae* aos 21 dias de coleta.

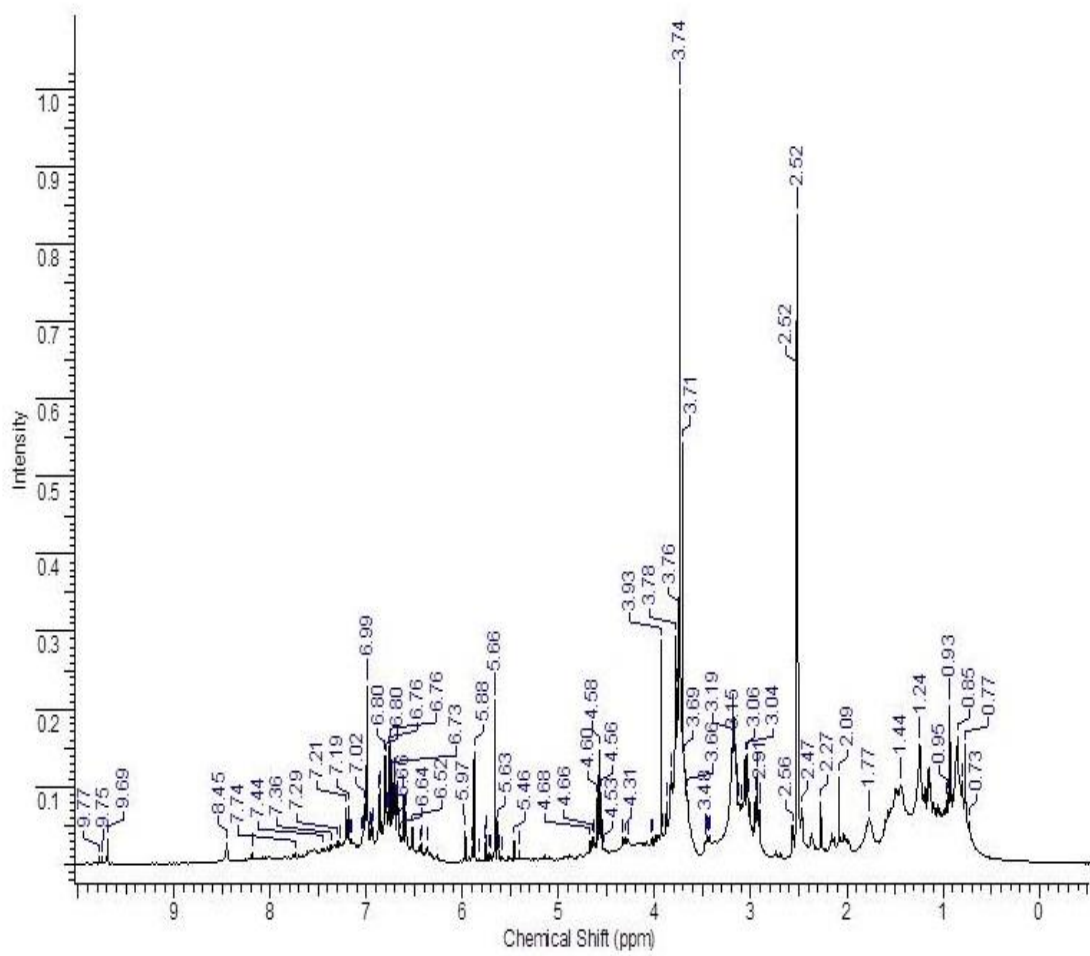


Figura 4C: Espectro de RMN ^1H dos exsudados radiculares de plântulas de milho tratadas com AH + *H. seropedicae* aos 21 dias de coleta.

