

BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS: PROMOÇÃO DO
DESENVOLVIMENTO RADICULAR E ATIVIDADE DAS BOMBAS DE
 H^+

DANIEL BASÍLIO ZANDONADI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2006

BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS: PROMOÇÃO DO
DESENVOLVIMENTO RADICULAR E ATIVIDADE DAS BOMBAS DE
H⁺

DANIEL BASÍLIO ZANDONADI

Tese 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
FEVEREIRO - 2006

BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS: PROMOÇÃO DO
DESENVOLVIMENTO RADICULAR E ATIVIDADE DAS BOMBAS DE
H⁺

DANIEL BASÍLIO ZANDONADI

Tese 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 17 de fevereiro de 2006.

Comissão Examinadora:

Prof. Lázaro Eustáquio Pereira Peres (D.Sc., Ciências Biológicas) - ESALQ

Prof. Leonardo O. Medici (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UFRRJ

Prof. Anna Okorokova-Façanha (D.Sc., Química Biológica) - UENF

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

“Quando alguém deseja algo ardentemente, já se encontra a caminho da realização. Contudo, a realização nobre exige três requisitos fundamentais, a saber: primeiro, desejar; segundo, saber desejar; e terceiro, merecer, ou, por outros termos, vontade ativa, trabalho persistente e merecimento justo.”

Lísias, 1944

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Domingos e Regina, por todo o apoio e dedicação, e aos meus irmãos, Sávio e Laura, pelo companheirismo e momentos de descontração em Niterói. À Ana pela dedicação e conselhos durante o início dessa jornada.

À vovó Helena, que, com sua firmeza e amor à vida, possa inspirar-nos, sempre, a seguir no caminho do bem.

À Fabiane, por todo amor e carinho.

A todos os amigos que compartilharam essa jornada. Obrigado Roberto e Leonardo pelo companheirismo fundamental.

A todos que contribuíram para que eu não me afastasse dos objetivos nobres da Ciência, principalmente aqueles que me mostraram sua importância e beleza. Agradeço especialmente ao meu orientador, Luciano Canellas, meu co-orientador, Arnoldo Façanha, e ao professor Fábio Olivares.

Ao Chefe do Laboratório de Solos, Cláudio Marciano.

Aos professores Lázaro Peres e Leonardo Medici pela colaboração e ensinamentos durante diferentes fases deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT..... | xi |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1. A agricultura moderna..... | 4 |
| 2.2. A matéria orgânica do solo..... | 6 |
| 2.2.1. O manejo da matéria orgânica do solo..... | 6 |
| 2.2.2. As substâncias húmicas..... | 7 |
| 2.2.2.1. Bioatividade das substâncias húmicas..... | 12 |
| 2.3. As auxinas..... | 14 |
| 2.4. Plantas mutantes em respostas hormonais..... | 18 |
| 2.5. A H ⁺ -ATPase do tipo P..... | 20 |
| 2.5.1. A ação das auxinas e a H ⁺ -ATPase do tipo P..... | 22 |
| 2.6. As Bombas de H ⁺ do tonoplasto..... | 24 |
| 2.6.1. Ácidos húmicos e as bombas de H ⁺ do tonoplasto..... | 29 |
| 2.7. As alquilamidas: uma nova classe de substâncias promotoras do crescimento..... | 30 |
| 3. TRABALHOS..... | 32 |

| | |
|--|----|
| ÁCIDOS HÚMICOS E AUXINAS INDUZEM AO DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES LATERAIS E ATIVAM AS BOMBAS DE H ⁺ DA PLASMALEMA E DO TONOPLASTO..... | 32 |
| Resumo..... | 32 |
| Abstract..... | 33 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 34 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 36 |
| 2.1. Obtenção, isolamento e purificação dos ácidos húmicos..... | 36 |
| 2.2. Características estruturais dos ácidos húmicos..... | 37 |
| 2.3. Crescimento de plântulas e tratamento com ácidos húmicos e auxina..... | 38 |
| 2.4. Análises estatísticas..... | 38 |
| 2.5. Avaliação do crescimento radicular..... | 39 |
| 2.6. Frequência de sítios de mitose e raízes laterais emergidas..... | 39 |
| 2.7. Purificação das vesículas de tonoplasto e de membrana plasmática..... | 39 |
| 2.7.1. Determinação da atividade ATPásica de membrana plasmática..... | 41 |
| 2.7.2. Bombeamento de H ⁺ da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática..... | 41 |
| 2.7.3. Determinação da atividade da V-ATPase e H ⁺ -PPase..... | 42 |
| 2.7.4. Bombeamento de H ⁺ da V-ATPase e H ⁺ -PPase..... | 42 |
| 3. RESULTADOS..... | 43 |
| 3.1. Características estruturais dos ácidos húmicos..... | 43 |
| 3.2. Área superficial e massa das raízes frescas..... | 46 |
| 3.3. Indução de sítios de mitose e emergência de raízes laterais..... | 47 |
| 3.4. Efeitos dos ácidos húmicos e auxinas sobre as bombas de H ⁺ | 48 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 51 |
| 5. RESUMO E CONCLUSÕES..... | 56 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 57 |
| INIBIDORES DE AUXINA ALTERAM A AÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS SOBRE PLÂNTULAS DE MILHO..... | 69 |
| Resumo..... | 69 |

| | |
|--|----|
| Abstract..... | 70 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 70 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 72 |
| 2.1. Obtenção, isolamento e purificação dos ácidos húmicos..... | 72 |
| 2.2. Crescimento e tratamento das plântulas de milho..... | 73 |
| 2.3. Análises estatísticas..... | 73 |
| 2.4. Avaliação do crescimento radicular..... | 73 |
| 2.5. Purificação das vesículas de membrana plasmática..... | 74 |
| 2.5.1. Determinação da atividade ATPásica de membrana plasmática..... | 75 |
| 2.5.2. Bombeamento de H ⁺ da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática..... | 75 |
| 3. RESULTADOS..... | 76 |
| 3.1. Comprimento total, área superficial e massa das raízes secas..... | 76 |
| 3.2. Frequência de sítios de mitose e emergência de raízes laterais... | 79 |
| 3.3. Efeitos dos ácidos húmicos e auxina sobre H ⁺ -ATPase de membrana plasmática..... | 80 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 82 |
| 5. RESUMO E CONCLUSÕES..... | 84 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 85 |
| ÁCIDOS HÚMICOS ESTIMULAM O DESENVOLVIMENTO RADICULAR ATRAVÉS DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DE AUXINA..... | 91 |
| Resumo..... | 91 |
| Abstract..... | 92 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 92 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 95 |
| 2.1. Obtenção, isolamento e purificação dos ácidos húmicos..... | 95 |
| 2.2. Crescimento das plântulas e tratamento com ácidos húmicos..... | 95 |
| 2.3. Cultivo das <i>hairy roots</i> e tratamento com ácidos húmicos..... | 96 |
| 2.4. Análises estatísticas..... | 96 |
| 2.5. Avaliação da sensibilidade a ácidos húmicos e à auxina..... | 96 |
| 2.6. Contagem do número de raízes e raízes laterais emergidas..... | 97 |
| 2.7. Purificação das vesículas de membrana plasmática..... | 97 |

| | |
|--|-----|
| 2.7.1. Determinação da atividade ATPásica de membrana plasmática..... | 98 |
| 2.7.2. Bombeamento de H ⁺ da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática..... | 98 |
| 2.7.3. Determinação da atividade da V-ATPase e H ⁺ -PPase..... | 98 |
| 2.7.4. Bombeamento de H ⁺ da V-ATPase e H ⁺ -PPase..... | 99 |
| 3. RESULTADOS..... | 100 |
| 3.1. Sensibilidade ao ácido húmico em genótipos MT e <i>dgt</i> | 100 |
| 3.2. Atividade e transporte de H ⁺ das bombas da membrana plasmática e do tonoplasto..... | 102 |
| 3.3. Diferenciação: raízes emergidas..... | 104 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 106 |
| 5. RESUMO E CONCLUSÕES..... | 108 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 108 |
| BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS HÚMICOS: SIMILARIDADES COM A AÇÃO DAS ALQUILAMIDAS, UMA NOVA CLASSE DE HORMÔNIOS VEGETAIS | 115 |
| Resumo..... | 115 |
| Abstract..... | 116 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 117 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 119 |
| 2.1. Síntese da N-isopropil-decanamida e confirmação da estrutura... | 119 |
| 2.1.1. Experimentos de RMN e CG-EM..... | 120 |
| 2.2. Detecção de afininas em uma solução de ácido húmico..... | 122 |
| 2.3. Crescimento das plântulas e tratamento com ácidos húmicos e afininas..... | 125 |
| 2.3.1. Experimento 1..... | 125 |
| 2.3.1. Experimento 2..... | 125 |
| 2.4. Análises estatísticas..... | 125 |
| 2.5. Avaliação do crescimento radicular..... | 126 |
| 2.6. Purificação das vesículas de membrana plasmática..... | 126 |
| 2.6.1. Determinação da atividade ATPásica de membrana plasmática..... | 128 |

| | |
|--|-----|
| 2.6.2. Bombeamento de H ⁺ da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática..... | 128 |
| 3. RESULTADOS..... | 129 |
| 3.1. Massa seca, comprimento e área superficial da raiz..... | 129 |
| 3.2. Sítios de mitose e raízes laterais emergidas..... | 132 |
| 3.3. Bombeamento de H ⁺ e hidrólise de ATP..... | 133 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 136 |
| 5. RESUMO E CONCLUSÕES..... | 138 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 139 |
| 4. RESUMO E CONCLUSÕES..... | 144 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 145 |

RESUMO

ZANDONADI, Daniel B. MS.- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Fevereiro de 2006. BIOATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS: PROMOÇÃO DO DESENVOLVIMENTO RADICULAR E ATIVIDADE DAS BOMBAS DE H⁺. Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas; Co-orientador: Arnaldo Rocha Façanha.

A “Revolução Verde” levada a cabo no Brasil a partir dos anos 1960-1970 resultou em contínua degradação ambiental, particularmente, dos solos, matas e recursos hídricos. A crise gerada por esse modelo requer a retomada da produção em bases sustentadas e a geração de alternativas tecnológicas baseadas em processos ecológicos. A maioria dos solos tropicais possui baixo conteúdo de matéria orgânica (MO); mesmo assim, exercem um papel-chave na produtividade das lavouras. As substâncias húmicas (SH) compõem a maior parte da MO e apresentam efeitos diretos sobre o crescimento das plantas. Os ácidos húmicos (AH) compreendem uma das principais frações das SH e, já em 1917, foi atribuída para essas substâncias uma atividade do tipo auxínica. Desde então, as mais diferentes propriedades hormonais dos AH vêm sendo estudadas. Nos quatro capítulos que compõem o presente trabalho, são apresentadas evidências morfológicas, bioquímicas e celulares do efeito direto dos AH sobre o desenvolvimento das plantas. Os resultados apresentados na primeira parte sugerem que a ação do tipo auxínica de AH isolados de diferentes fontes está

relacionada à regulação das bombas de H^+ , tanto da membrana plasmática (MP) quanto do tonoplasto, ambas envolvidas no processo de expansão celular e desenvolvimento de raízes laterais. Portanto, os AH podem regular a ação de enzimas localizadas no interior da célula. No segundo capítulo, o estudo da ação de inibidores de auxina [*p*-Ácido Clorofenoxi-isobutírico (PCIB) e ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA)] permitiu sugerir que o efeito estimulatório dos AH sobre as raízes de milho está associado às vias de transporte e sinalização de auxina. No terceiro capítulo, foi conduzido um experimento com genótipos de tomateiro mutantes de porte micro com sensibilidade normal (MT), pouco sensível (*diageotropica*, *dgt*) e supersensível (MT8196) à auxina. Os AH não foram capazes de estimular a atividade da H^+ -ATPase de MP nem das bombas de H^+ do tonoplasto (V-ATPase e H^+ -PPase) do genótipo *dgt*, resultando na ausência de emissão de raízes laterais. Por outro lado, nos genótipos MT e MT8196, os AH estimularam a atividade das bombas de H^+ e promoveram um aumento nítido da emissão dessas raízes. Tais evidências, comprovaram, inequivocamente que o efeito dos AH, tanto no crescimento quanto na diferenciação celular, é dependente da via de transdução de sinal da auxina. Devido à heterogeneidade e a complexidade estrutural dos AH, a rede formada pelo arranjo de suas unidades pode conter, além das auxinas, uma série de substâncias capazes de estimular o desenvolvimento vegetal. No quarto capítulo, foi comparada a ação fisiológica dos AH com a das afininas, alquilamidas recentemente descritas como promotoras do crescimento vegetal que atuam de forma independente da via auxínica. Este é o primeiro relato da ativação da H^+ -ATPase de MP por uma afinina, a N-isopropil-decanamida. O conjunto dos dados apresentados nesse trabalho fundamenta a tese da existência de um mecanismo para a bioatividade de AH, em que moléculas com atividade hormonal presentes no seu arranjo supra-estrutural podem interagir com o receptor de auxina da célula vegetal, ativando os sistemas de transporte primários de H^+ e promovendo, assim, o desenvolvimento radicular.

Auxílio: CAPES, CNPq, IFS (*International Foudation of Science*) e UENF

ABSTRACT

ZANDONADI, Daniel B. MS.- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February 2006. HUMIC SUBSTANCES BIOACTIVITY: ROOT DEVELOPMENT PROMOTION AND H⁺ PUMPS ACTIVITY. Advisor: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas; Co-advisor: Arnaldo Rocha Façanha.

The "Green Revolution" carried out in Brazil starting from the years 1960-1970 resulted in continuous environmental degradation, particularly of the soils, forests and water resources. The crisis generated by this agricultural model requests the production in sustained basis and the generation of technological alternatives based on ecological events. Most of the tropical soils has low organic matter content, which even though play a key role in the crop yield. The humic substances (HS) compose the major component of organic matter and they display direct effects on plant growth. The humic acids (HA) comprise one of the main fractions of HS and already in 1917 it was attributed for these substances an auxin-like activity. Ever since, the different hormonal properties of HA have been studied. In the four chapters composing the present work, morphological, biochemical and cellular evidences of the direct effect of HA on plant development are shown. The results presented in the first part suggest that the auxin-like activity of HA isolated from different sources is related to the regulation of both plasma membrane (PM) H⁺ pumps and tonoplast H⁺ pumps. These ones are involved in the cellular expansion and lateral roots development. Therefore, HA

can regulate the enzyme activation into the cell compartments. In the second chapter, the study of auxin inhibitors [PCIB (*p*-Chlorophenoxyisobutyric acid) and TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid)] suggest that the HA stimulation effect on the maize roots is associated to the auxin signaling pathways. In the third chapter, the auxin-like effect of HA was evaluated in different micro tomato genotypes due to their auxin sensibility: sensitive (MT) and insensitive *diageotropica* (*dgt*), and hairy roots oversensitive (MT8196). On the one hand, HA were not able to enhance neither PM H⁺-ATPase nor tonoplast H⁺ pumps activity resulting in absence of lateral roots emergence in *dgt* genotype. On the other hand, HA enhanced H⁺ pumps activity and promoted a stimulation of lateral root emergence in MT and MT8196 genotypes. These results provided compelling evidences that the HA effect in both growth and cell differentiation is dependent of auxin signaling pathway. Due to HA heterogeneity and structural complexity, units of their net arrangement could have a series of substances capable to stimulate the plant development, besides auxins. In the forth chapter, the hormone-like activity of HA was compared to afinins, alkamides recently described as new group of plant growth promoting substances which effects are independent of auxin signaling. This is the first report of the PM H⁺-ATPase activation by afinin (*N*-isopropyl-decenamide). All data presented here suport the hypothesis of a HA bioactivity mechanism, which hormonal molecules present in HA supramolecular structure interact with the cell, activating the H⁺ primary transport and resulting in the root development.

Supported by: CAPES, CNPq, IFS (International Foudation of Science) and UENF

1. INTRODUÇÃO

Em meados da década de 1960, foi delineada uma nova estratégia para o aumento da produção mundial de alimentos. Baseada na intensificação de técnicas modernas, tais como novas variedades de cultivo, fertilizantes químicos solúveis, medidas de proteção da lavoura (inseticidas, fungicidas, herbicidas) e mecanização intensiva, a “Revolução Verde” elevou a produção e a produtividade das lavouras (Singh, 2000). Essa modernização, no entanto, contribuiu para aumento da exclusão social no campo, além de intensificar a degradação ambiental (Kageyama e Graziano, 1983). Nos países economicamente periféricos e de clima tropical, esse processo foi ainda mais intenso, provocando perdas da matéria orgânica do solo (MOS) por oxidação e erosão, além da redução da biomassa microbiana (Santos e Camargo, 1999). Estudos da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), por exemplo, mostram que, de 1964 a 1979, a produtividade dos 15 principais cultivos do Brasil cresceu apenas 16,8%; no mesmo período, o consumo de fertilizantes químicos cresceu 124,3%; de inseticidas, 233,6%; de fungicidas, 584,5%; de herbicidas, 5.414,2%; e de tratores, 389,1% (Caporal e Costabeber, 1994). A degradação dos solos – acelerada principalmente pela excessiva mecanização e pela prática da monocultura – continua em ritmo assustador em várias regiões produtoras do País. Em algumas situações, as perdas de solos por erosão já atingem 150 t/ha

por ano. Nesse aspecto, existe o exemplo clássico de que o decréscimo da MOS de 3,8% para 1,8% reduziu a produtividade agrícola em 25% (Pimentel, 1995).

As desigualdades e injustiças sociais de hoje derivam da persistente concentração de poder político e econômico ao longo de quatro séculos, bem como da destruição do ambiente agrícola, com a degradação do solo e da água, pelo uso intensivo de adubos químicos e pesticidas. Os agrotóxicos podem persistir no ambiente, alterando as cadeias ecológicas e os ciclos biogeoquímicos, contaminando a atmosfera, a água e o solo (Grisolia, 2005). Apesar da proibição do uso de agrotóxicos de alta toxicidade, como os inseticidas organoclorados [eg. dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e dicloro-difenil-etilcloro (DDE)], nos Estados Unidos, esses produtos continuam sendo produzidos, exclusivamente para exportação. Outro exemplo dessa política nefasta é a exportação, inclusive para o Brasil, do herbicida *alaclor*, agente cancerígeno amplamente reconhecido (Grisolia, 2005). Diante dessa situação, é urgente uma reavaliação do modo de se fazer agricultura nos trópicos, através da adoção de novas estratégias para promover o desenvolvimento rural.

A Ecologia estuda as relações entre os seres vivos e o ambiente em que vivem, bem como suas recíprocas influências (Odum, 1988). A Agroecologia surge, então, como uma proposta de superação do modelo de desenvolvimento agrícola atual, constituindo um campo de estudos que visa ao manejo ecológico dos recursos naturais com enfoque no desenvolvimento de técnicas próprias a cada sistema. O padrão de ciclagem de nutrientes nos trópicos, por exemplo, é diferente do padrão da zona temperada. Enquanto nas regiões frias, grande parte da matéria orgânica e nutriente permanece nos solos e sedimentos o tempo todo, nos trópicos, uma parcela muito maior está na biomassa, sendo reciclada numa estrutura biótica evoluída e bem-organizada, que, quando perturbada, leva à perda mais rápida deles (Odum, 1988). Considerando o manejo ecológico do solo, duas alternativas são postas diretamente pela Agroecologia: (i) a acumulação de matéria orgânica e a reciclagem dos nutrientes e (ii) as ações de favorecimento da atividade biológica do solo.

A prática da adubação de plantas com a matéria orgânica é milenar e se confunde com a própria história da civilização. A maior parte da matéria orgânica encontra-se nas substâncias húmicas (SH), compreendidas como um conjunto de substâncias heterogêneas e de massa molecular relativamente elevada que

englobam compostos aromáticos e alifáticos (Moreno, 1996). Skjemstad *et al.* (1998) relataram as seguintes características da matéria orgânica que influenciam as propriedades do solo: (i) fonte de nutrientes com lenta liberação; (ii) elevada capacidade de adsorver e trocar íons metálicos; (iii) melhora as propriedades físicas através do aumento da coesão, da estabilidade estrutural e conseqüentemente da permeabilidade e retenção de água; (iv) tamponamento das reações químicas e (v) redução da toxicidade de compostos sintéticos e naturais. Além disso, tem sido relatado que a matéria orgânica humificada pode estimular o crescimento vegetal, através da liberação de moléculas bioativas com atividade do tipo hormonal (Canellas *et al.*, 2002; Façanha *et al.*, 2002) e afetar diretamente a atividade enzimática, em diversas vias metabólicas (Vaughan *et al.*, 1985; Vaughan e Malcolm, 1985; Muscolo *et al.*, 2005; Nardi *et al.*, 2005). A otimização do uso da matéria orgânica como fertilizante é uma estratégia-chave para o sucesso das práticas em Agroecologia. O conhecimento da natureza da interação entre plantas e matéria orgânica humificada, em base molecular e celular, é fundamental para o redesenho da pesquisa e do desenvolvimento da fertilização de plantas em sistemas Agroecológicos.

Existem vários autores que relacionam os efeitos das SH com a ação de fitormônios, descrevendo, principalmente, a atividade semelhante à das auxinas (Guminski, 1968; O'Donnell, 1973; Dell'Agnola e Nardi, 1987; Muscolo *et al.*, 1999; Canellas *et al.*, 2002a; Quaggiotti *et al.*, 2004; Nardi *et al.*, 2005). No presente trabalho, é estudada a interação entre plantas e ácidos húmicos (AH), isolados de diversas fontes, sobre o metabolismo vegetal e sua relação com outros promotores do desenvolvimento, como as auxinas e as afininas. Os AH têm uma atividade fisiológica que pode estar relacionada com o efeito produzido sobre os principais sistemas de bombeamento de H⁺.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A agricultura moderna

A chave para o desenvolvimento agrícola moderno tem sido a promoção das lavouras de exportação e a utilização de insumos modernos: adubos, agrotóxicos, sementes melhoradas e mecanização agrícola (Sesmou, 1992). Essa foi a linha adotada pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) a partir da década de 1960, através do processo conhecido como “Revolução Verde”. De acordo com a FAO, os sistemas agrícolas que utilizam poucos insumos externos não conseguem alcançar os níveis necessários de produção ou obter retornos comparáveis aos sistemas de alto uso de insumos característicos do sistema extensivo. No entanto, dados de vários países indicam que as unidades de produção onde se utilizam poucos insumos de fora da propriedade são superiores econômica e ecologicamente aos sistemas convencionais baseados no latifúndio (Toledo, 2002). Os resultados do censo agropecuário brasileiro (1995/1996) realizado pelo IBGE referentes à participação na produção das lavouras temporárias podem ser verificados na Tabela a seguir:

Tabela 1. Distribuição da lavoura por tamanho da propriedade. Dados em porcentagem.

| Produtos | Pequena (< 200 ha) | Média (200 - 2000 ha) | Grande (> 2000 ha) |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Algodão (herbáceo) | 55,1 | 29,9 | 15,0 |
| Arroz (em casca) | 38,9 | 42,7 | 18,4 |
| Batata-inglesa (1ª safra) | 74,0 | 20,7 | 5,3 |
| Batata-inglesa (2ª safra) | 76,7 | 20,9 | 2,4 |
| Cana-de-açúcar | 19,8 | 47,1 | 33,1 |
| Feijão (1ª, 2ª e 3ª safras) | 78,5 | 16,9 | 4,6 |
| Fumo em folha | 99,5 | 0,5 | 0,0 |
| Mandioca | 91,9 | 7,3 | 0,8 |
| Milho em grão | 54,4 | 34,8 | 10,8 |
| Soja em grão | 34,4 | 43,7 | 21,9 |
| Tomate | 76,4 | 18,5 | 5,1 |
| Trigo em grão | 60,6 | 35,2 | 4,2 |

Fonte: IBGE censo agropecuário (1995/1996)

É possível verificar que mais de 60% da participação da produção das lavouras temporárias deve-se às pequenas propriedades (de tamanho menor que 200 ha). Sua participação também é majoritária nas lavouras permanentes (Tabela 1). Esses fatos vão de encontro à construção ideológica de que as principais e mais importantes unidades de produção no campo são as grandes propriedades. O censo do IBGE revela, ainda, que as pequenas propriedades geram mais renda no campo quando comparadas às grandes propriedades.

O esgotamento dos recursos naturais provocados pelo atual sistema produtivo agrícola mostra cada vez mais as barreiras do modelo de crescimento econômico ilimitado na agricultura (Costabeber e Caporal, 2001). Esse modelo de desenvolvimento rural promove a degradação do ambiente através da sua lógica de explorar o máximo dos recursos naturais e energéticos por um curto período de tempo, em vez de otimizá-los (Vivan, 1998), originando sérios problemas econômicos, sociais e ecológicos (Fernández e Garcia, 2001). Além de ser

incapaz de resolver o problema da segurança alimentar, são gerados impactos grandes e difusos sobre o ambiente, resumidos por Singh (2000) em (i) desertificação, (ii) queda na fertilidade, (iii) elevação da salinidade (iv) erosão dos solos, (v) resíduos de pesticidas e (vi) redução dos lençóis freáticos. Faz-se necessário, portanto, uma discussão sobre novos rumos para o desenvolvimento rural em termos sustentáveis, economicamente viáveis e socialmente aceitáveis.

Para tanto, é mister o redesenho das práticas agrônômicas adotadas até hoje. Isso passa por uma nova perspectiva de ensino da agronomia, que deve ser independente da premissa pregada pelas organizações com influência mundial, como a FAO, onde existe o claro favorecimento de interesses das grandes corporações. A formação de profissionais com uma nova visão do processo de desenvolvimento rural, independentemente da aplicação da cartilha pregada pelos países ricos, é fundamental para o sucesso da agricultura brasileira nos próximos anos. Nesse sentido, a Agroecologia surge como uma alternativa para a sustentabilidade dos sistemas de produção. A Agroecologia é definida, de forma mais ampla, como uma abordagem agrícola que incorpora cuidados especiais não só com o ambiente mas também com os problemas sociais, através de um ponto de vista que vai além da produção somente. A Agroecologia enfoca as relações ecológicas no campo, com o objetivo de compreender a forma, a dinâmica e a função dessas relações (Altieri, 2002).

2.2. A matéria orgânica do solo

2.2.1. O manejo da matéria orgânica do solo

Desde suas origens, o sucesso da atividade agrícola está ligado à utilização de materiais orgânicos como fertilizantes. A matéria orgânica do solo (MOS) é um sistema complexo integrado por diversos componentes, cujo dinamismo está ligado à incorporação de resíduos vegetais, animais e microbianos ao solo e à transformação e evolução destes, mediada pela interação de vários processos (Moreno, 1996). O conteúdo da MOS influencia várias características que contribuem para melhorar a qualidade do solo como, por exemplo, capacidade de retenção de água, disponibilidade de nutrientes e atividade microbiana. O tipo de manejo agrícola adotado altera o conteúdo da

MOS e, conseqüentemente, as características físicas, químicas e biológicas ligadas à qualidade produtiva do solo. O uso de técnicas convencionais de preparo do solo, baseadas no intenso revolvimento e lavouras com baixa adição de resíduos vegetais, resulta em diminuição do conteúdo da MOS ao longo do tempo (Bayer e Mielniczuk, 1999). Os sistemas agrícolas tropicais são extremamente dependentes do conteúdo da MOS para a manutenção da produtividade das lavouras. Embora o uso intensivo de fertilizantes industrializados, aliado a outras técnicas modernas, tenha sido responsável pelo aumento da produção mundial de alimentos, o resultado desse tipo de desenvolvimento agrícola foram diversos prejuízos ambientais, tais como salinidade dos solos, contaminação dos lençóis freáticos e desertificação (Singh, 2000).

A preocupação com a melhoria da qualidade do ambiente tem mudado o foco das discussões em torno dos sistemas agrícolas e da importância da MOS (Lal e Pierce, 1991; Piccolo, 1996a; Nardi *et al.*, 2004). Devido a sua sensibilidade em relação às diferentes práticas de manejo adotadas, a MOS é um importante indicador da qualidade do solo. Sua manutenção é produto do balanço entre as perdas decorrentes do uso e das adições provenientes do manejo (Mielniczuck *et al.*, 2003). Para assegurar a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, o manejo dos solos necessita de um guia de referência e da identificação das relações entre as avaliações do uso da terra e suas funções, as quais podem validar comparações através de variações de clima, solos, tipo de uso da terra, topografia e sistemas de manejo (Nardi *et al.*, 2004).

2.2.2. As substâncias húmicas

A maior parte do carbono orgânico da superfície terrestre, entre 85 e 95%, de acordo com Hayes e Malcolm (2001), encontra-se nas substâncias húmicas (SH). O restante da MOS se encontra nos compostos pouco alterados da degradação de resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano (10-15 %) e, em menor proporção, nos organismos vivos, tais como raízes e microorganismos. As SH são produto da transformação e ressíntese microbiana dos resíduos orgânicos. No solo, essas substâncias existem com um contínuo de compostos humificados em diferentes estádios de transformação. No laboratório, é possível

separar estes compostos de acordo com sua solubilidade em: ácidos fúlvicos (solúveis em meio aquoso ácido ou básico), ácidos húmicos (solúveis em meio alcalino e coagulam quando o meio alcalino é acidificado) e huminas (fração insolúvel ou residual).

A definição de um modelo estrutural para as SH ainda não é clara. Os ácidos húmicos (AH) foram inicialmente descritos como macromoléculas orgânicas de massa relativamente elevada e maior grau de condensação molecular provenientes da transformação de biopolímeros incorporados ao solo (e.g. lignina, celulose) (Schnitzer, 1991). Tradicionalmente, as SH têm sido consideradas como um polieletrólito de ácido fraco com massa molecular relativamente elevada, ou seja, grandes polímeros orgânicos com várias funções químicas e carga predominantemente negativa que teriam sua conformação em função do pH e da força iônica da solução (Kononova, 1966). Por exemplo, em pH mais baixo, é observado um colapso da estrutura e formação de um denso aglomerado húmico. Com o pH elevado, há a dispersão do macropolímero e estendimento de suas unidades moleculares para a solução, como mostrado na Figura abaixo:

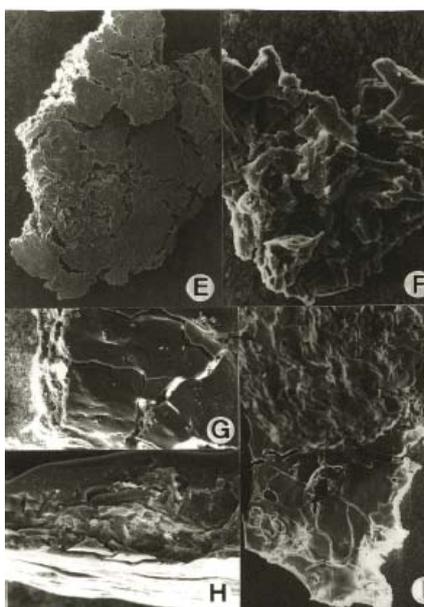


Figura 1. Eletromicrografia de ácidos húmicos (AH) estabilizados a pH 5,0 e 4,0 seguidos de liofilização. Note-se a variação da conformação de AH de acordo com a mudança do pH; E e F pH 4,0. G,H e I pH 5,0 (adaptado de Canellas *et al.*, 2002b).

A dificuldade de estabelecer um procedimento universal para avaliar a distribuição de massa nas SH sempre forneceu argumentos para a crítica do modelo de macroestrutura dessas substâncias. Por exemplo, o uso de métodos de ultracentrifugação, viscosimetria e cromatografia por exclusão de tamanho fornece, para o mesmo material húmico, frações que vão desde poucas centenas de unidade de massa até centenas de milhares de unidade de massa. Wershaw (1993) postulou que resíduos orgânicos de caráter anfifílico (por exemplo, resíduos de polissacarídeos como a hemicelulose e ligninas) em contato com a fração mineral do solo poderiam se reorganizar em estruturas do tipo micelas com a parte hidrofílica voltada para fora e a parte hidrofóbica voltada para dentro. Esse domínio hidrofóbico seria responsável pela captura através do fenômeno de partição de uma série de compostos orgânicos transformados ou produtos do metabolismo microbiano que incluiriam desde hormônios até pequenas unidades protéicas que seriam “guardadas” nesse “armário” estrutural formado pelas SH. A Figura a seguir ilustra a concepção de Wershaw:

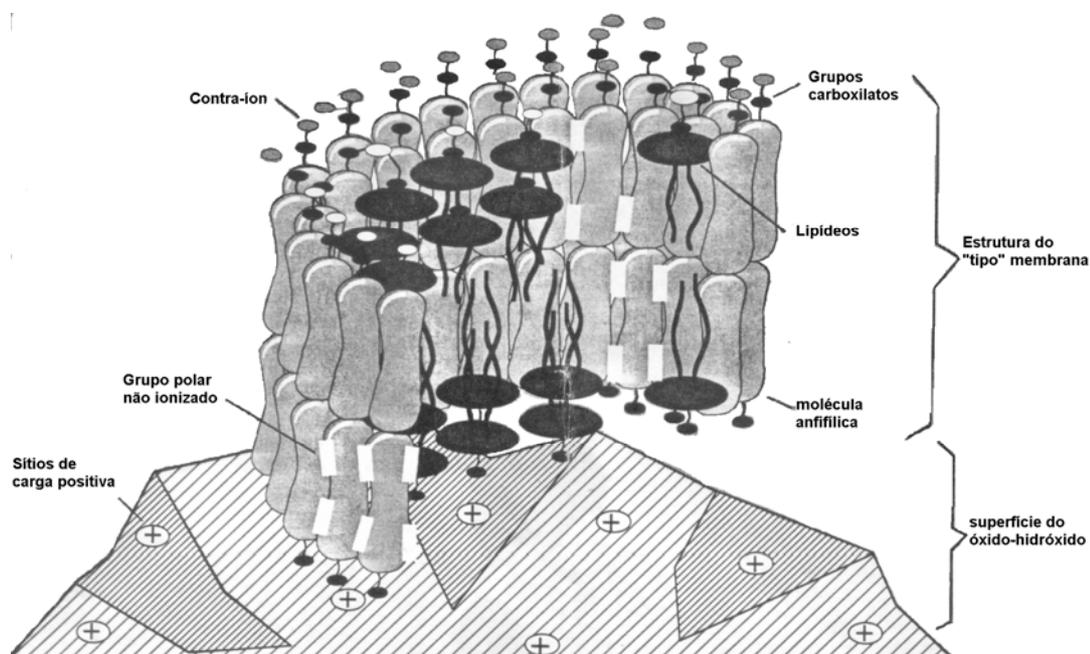


Figura 2. Modelo estrutural “tipo micelar” proposto por Wershaw (1993) e adaptado por Canellas *et al.* (2005).

A concepção de estruturas micelares ou pseudomicelares para as substâncias húmicas foi defendida por Engebretson e von Wandruszka (1994), que, em solução contendo AH, observaram a supressão da fluorescência de uma sonda. A diminuição da fluorescência da sonda foi relacionada à presença de um domínio hidrofóbico nas SH que é particularmente aumentado na presença de cátions divalentes adicionados à solução. Esse fenômeno foi atribuído à formação de pseudomicelas a partir de pontes metálicas nos domínios hidrofílicos da molécula húmica. A concepção do modelo de estrutura em pseudomicelas foi duramente criticada uma vez que, para a formação delas, é necessária uma concentração de SH em solução acima da concentração micelar crítica, o que é praticamente inatingível em sistemas naturais, ainda mais os altamente intemperizados (Tanford, 1980). Orlov (1975) define as SH como resultado de associações de compostos predominantemente hidrofóbicos, os quais são estabilizados por forças dispersivas fracas e hidrofóbicas formando um arranjo supra-estrutural de compostos orgânicos com massa molecular aparentemente elevada. Esse conceito estrutural alternativo tem sido confirmado pelo método de cromatografia por exclusão de tamanho (Piccolo *et al.*, 1996b, 1999; Conte and Piccolo, 1999) e RMN (Simpson, 2002).

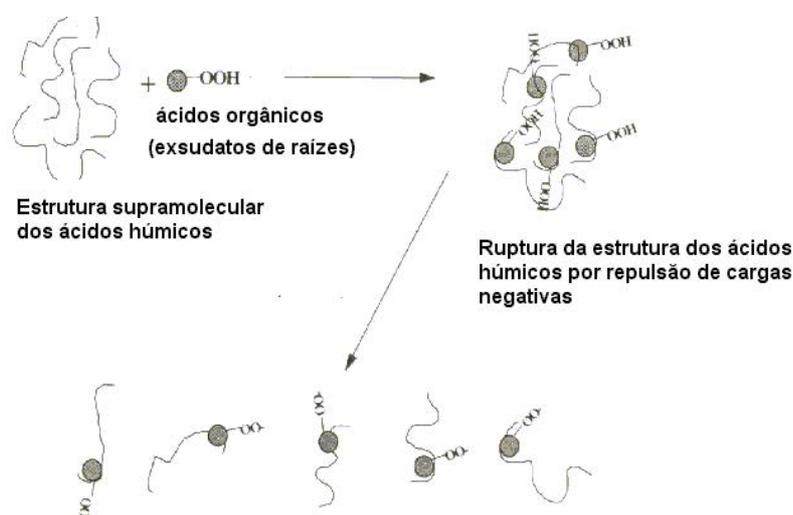


Figura 3. Modelo estrutural baseado no arranjo supra-molecular proposto por Piccolo (1997) e adaptado por Canellas *et al.* (2005).

Independentemente do modelo estrutural, tem-se observado que pequenas doses de SH têm proporcionado efeitos de estímulos no crescimento vegetal através de uma ação adicional ao fornecimento de nutrientes.

Os AH são produtos intermediários da humificação e podem ser indicadores da qualidade da matéria orgânica do solo (Kögel-Knaber *et al.*, 1988). Govindasmy e Chandrasekaran (1992) observaram que a aplicação de 6 g/m² de AH extraídos de lignita aumentou a concentração de nutrientes nas folhas e o rendimento de cana-de-açúcar em experimento de campo. Em casa de vegetação, Atiyeh *et al.* (2002) avaliaram o efeito de AH derivados de vermicomposto sobre o crescimento de plantas de tomate e pepino, e relataram estímulos no crescimento das plantas observados na altura, área foliar, massa seca da parte aérea e, principalmente, na massa seca da raiz, nas concentrações de 50-500 mg/kg. Já concentrações acima de 500 mg/kg e até 1.000 mg/kg resultaram em inibição do crescimento das plantas. Segundo esses autores, provavelmente parte dos estímulos observados deveu-se à ação de substâncias reguladores do crescimento vegetal associadas aos AH.

Masciandaro *et al.* (1999) avaliaram o efeito da adição de dois tipos de materiais orgânicos ao solo: (i) incorporação direta de vermicomposto proveniente de lodo de esgoto e (ii) fertirrigação com SH extraídas de vermicomposto e solubilizada em água residual de esgoto tratado. Foi observado um aumento na atividade de enzimas relacionadas com a atividade biológica e nutrição vegetal extraídas de aveia (*Avena sativa*) cultivada nos solos tratados com matéria orgânica. Houve uma correlação positiva entre o índice de crescimento e as características químicas e bioquímicas dos solos após os tratamentos. Os materiais orgânicos incorporados contribuíram para a recomposição da fertilidade dos solos áridos e semi-áridos avaliados.

Recentemente, foi relatado que vermicompostos produzidos a partir de diferentes materiais (esterco bovino, resíduos de alimentos e resíduos de papel) aplicados em condições de campo, dois anos consecutivos (10 ou 20 t/ha no primeiro ano e 5 ou 10 t/ha no segundo ano), podem aumentar significativamente o crescimento e a produtividade de pimenta (*Capsicum annuum*) (Arancon *et al.*, 2005). Os autores sugeriram que substâncias promotoras do crescimento vegetal, como os AH e fitormônios adsorvidos nestes, por exemplo, poderiam ser

responsáveis pelos estímulos observados, como descrito previamente por Canellas *et al.* (2002).

2.2.2.1. Bioatividade das substâncias húmicas

Além de fornecer nutrientes para as plantas através da mineralização, as SH podem estimular diretamente o crescimento e a produtividade das plantas. Os efeitos das SH sobre o desenvolvimento vegetal são dependentes da fonte de obtenção, das doses utilizadas e da espécie da planta estudada (Vaughan e Malcolm, 1985). Nannipieri *et al.* (1993) resumiram os efeitos fisiológicos das SH como resultado: (i) da influência positiva sobre o transporte de íons facilitando a absorção; (ii) do aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs resultando em maior produção de ATP; (iii) do aumento no conteúdo de clorofila; (iv) do aumento na velocidade e síntese de ácidos nucléicos; (v) do efeito seletivo sobre a síntese protéica e (vi) do aumento ou inibição da atividade de diversas enzimas.

Não é recente proposição da existência de hormônios nas SH (Bottomley, 1917) e de que estas podem apresentar outros compostos fisiologicamente ativos (Guminski, 1968). Diversos trabalhos confirmam essa proposição, relacionando os efeitos das SH com fitormônios, principalmente a auxina (O'Donell, 1973; Dell'Agnola e Nardi, 1987; Muscolo *et al.*, 1999; Canellas *et al.*, 2002a; Quaggiotti *et al.*, 2004, Nardi *et al.*, 2005).

O estudo da ação direta das SH sobre o metabolismo e o crescimento das plantas tem-se concentrado na fração húmica considerada de menor massa molecular (Vaughan e Malcolm, 1985), em função do modelo de concepção estrutural das SH (Canellas *et al.*, 2005). O fato de uma substância do tamanho dos AH (na ordem de micrômetros) (Cameron *et al.*, 1972) atravessarem poros ou espaços aparentes no apoplasto (na ordem de nanômetros) não era concebido. No entanto, baseando-se na concepção emergente do arranjo supra-estrutural das SH, compostos de reconhecida capacidade de regulação e estimulação do crescimento vegetal, tais como os hormônios vegetais, podem estar fracamente unidos à supra-estrutura das SH e serem liberados para a solução do solo e para a absorção das plantas por uma simples variação de pH

na interface das raízes decorrente, por exemplo, da exsudação de ácidos orgânicos como experimentado por Façanha *et al.* (2002). Nardi *et al.* (2005) utilizaram exsudatos radiculares na extração de SH e observaram um aumento na atividade hormonal dessas substâncias, confirmando que a rizosfera pode alterar o arranjo supra-estrutural das SH. Varanini *et al.* (1993) verificaram, por meio de ensaios *in vitro*, o estímulo na atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP) por SH de baixo peso molecular. Sabe-se, no entanto, que AH podem promover o desenvolvimento vegetal na mesma proporção, quando não superior aos ácidos fúlvicos (Vaughan e Malcolm, 1985). Zandonadi *et al.* (2003) fracionaram AH isolados de vermicomposto em faixas de tamanho moleculares através de cromatografia por exclusão de tamanho em gel de sephadex (G-200) e demonstraram que o estímulo sobre a H⁺-ATPase de MP foi menor nas frações separadamente do que nas plantas tratadas com AH, sugerindo que, mais do que o tamanho molecular, a conformação e a mobilização de sub-unidades funcionais parecem estar relacionadas com o aumento observado na atividade dessa enzima. Muscolo *et al.* (1998) verificaram que SH de baixo peso molecular apresentaram atividade típica e equivalente à do ácido indol-3-acético (AIA), podendo operar estimulando a produção endógena desse fitormônio ou inibir as oxidases responsáveis pela sua degradação (Mato *et al.*, 1972).

Façanha *et al.* (2002) verificaram o estímulo na síntese da H⁺-ATPase de MP promovida por AH e indicaram as bombas de H⁺ como importantes marcadores bioquímicos da bioatividade das SH. Esses autores postularam que sub-unidades estruturais de AH poderiam acessar receptores na superfície ou no interior da MP das células das raízes, resultando no estímulo do desenvolvimento. Canellas *et al.* (2002a) identificaram a indução de síntese de H⁺-ATPase de MP isoladas de raízes de milho, correlacionada com a presença de AIA nos AH e com uma alteração no padrão de desenvolvimento radicular de plântulas de milho. Confirmando essas constatações, Quaggiotti *et al.* (2004) ratificaram a presença de AIA na estrutura de SH, através de um ensaio imunológico. Foi demonstrado que frações húmicas de baixo peso molecular estimulam a absorção de nitrato, possivelmente mediante o aumento da isoforma *Mha1* e *Mha2* da H⁺-ATPase de MP.

2.3. As Auxinas

A auxina está envolvida potencialmente em todos os aspectos do desenvolvimento e crescimento vegetal (Went, 1928; Davies, 1995). Dentre os efeitos fisiológicos promovidos pela auxina, citam-se: (i) a expansão celular; (ii) o fototropismo e o gravitropismo; (iii) a regulação da dominância apical e (iv) a formação de raízes laterais e adventícias (Taiz e Zeiger, 2002). A forma mais comum de auxina presente nas plantas é o ácido indol-3-acético (AIA). Além do AIA, existem mais de 50 compostos diferentes que podem expressar a atividade biológica da auxina (Tomic *et al.*, 1998; Bertosa *et al.*, 2003 e referências citadas). O ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) e o ácido *p*-Clorofenoxisobutírico (PCIB) são compostos relacionados estruturalmente com a auxina que promovem inibição do seu efeito sobre as plantas. A ação do TIBA está relacionada com o impedimento do efluxo da auxina bloqueando o seu transporte polar (Lomax *et al.*, 1995). O PCIB afeta a via de sinalização de auxina, regulando a estabilidade das proteínas Aux/AIA (Oono *et al.*, 2003).

A biossíntese da auxina ocorre principalmente em tecidos com intensa divisão celular e crescimento, principalmente na parte aérea da planta (ápices caulinares e folhas jovens) (Taiz e Zeiger, 2002). O AIA é estruturalmente semelhante ao triptofano, seu precursor na maioria das espécies vegetais (Zazimalova e Napier, 2003) (Figura 4).

Embora as auxinas tenham sido a primeira classe de hormônios vegetais a ser identificada, o mecanismo molecular envolvido na sua ação ainda não está totalmente elucidado (Tomic *et al.*, 1998; Leyser, 2002). Entretanto, sabe-se que a sinalização da auxina começa a partir da percepção deste hormônio por meio da interação com algum tipo de receptor (Leyser, 2002). Evidências sugerem a existência de vários sítios para a percepção da auxina e, nesse sentido, o sinal parece ser transduzido através de diferentes vias de sinalização (Leyser, 2002).

Existem várias evidências da existência de uma proteína receptora para AIA no lado externo da membrana plasmática conhecida como ABP1 (*auxin binding protein*) (Ruck *et al.*, 1993; Hertel *et al.*, 1995; Steffens *et al.*, 2001; Napier *et al.*, 2002). Por outro lado, foi também descrito um receptor intracelular sensível à presença de auxina (Vesper e Kuss, 1990; Claussen *et al.*, 1996). Yamagami *et al.* (2004) indicam a via independente de ABP1 como a mais provavelmente

envolvida no controle do crescimento em casos de concentrações endógenas de AIA. Além disso, estudos com tomate mutante *diageotropica* (*dgt*) sugerem ser bastante plausível a funcionalidade de receptores tanto intra como extracelulares (Christian *et al.*, 2003). De qualquer forma, o papel exato do ABP1 na via de sinalização da auxina não foi determinado.

Existem alguns aspectos da transcrição relacionados com a auxina mais bem compreendidos. O fator de resposta à auxina (*ARF*) e as proteínas Aux/AIA estão envolvidos nesse processo (Guilfoyle, 1998). Gray *et al.* (2001) relataram que a auxina poderia promover a degradação das Aux/AIA através da proteína ubiquitina ligase SCF^{TIR1}. Na ausência de auxina, ocorre a acumulação de proteínas Aux/AIA, que se ligam aos *ARFs*, prevenindo-os de ativar a transcrição de genes induzidos por auxina (Figura 5). Estudos recentes indicam que o *TIR1* (*Transport Inhibitor Response-1*) é um receptor de auxina que media a degradação de Aux/AIA e a transcrição regulada por auxina (Dharmasiri *et al.*, 2005).

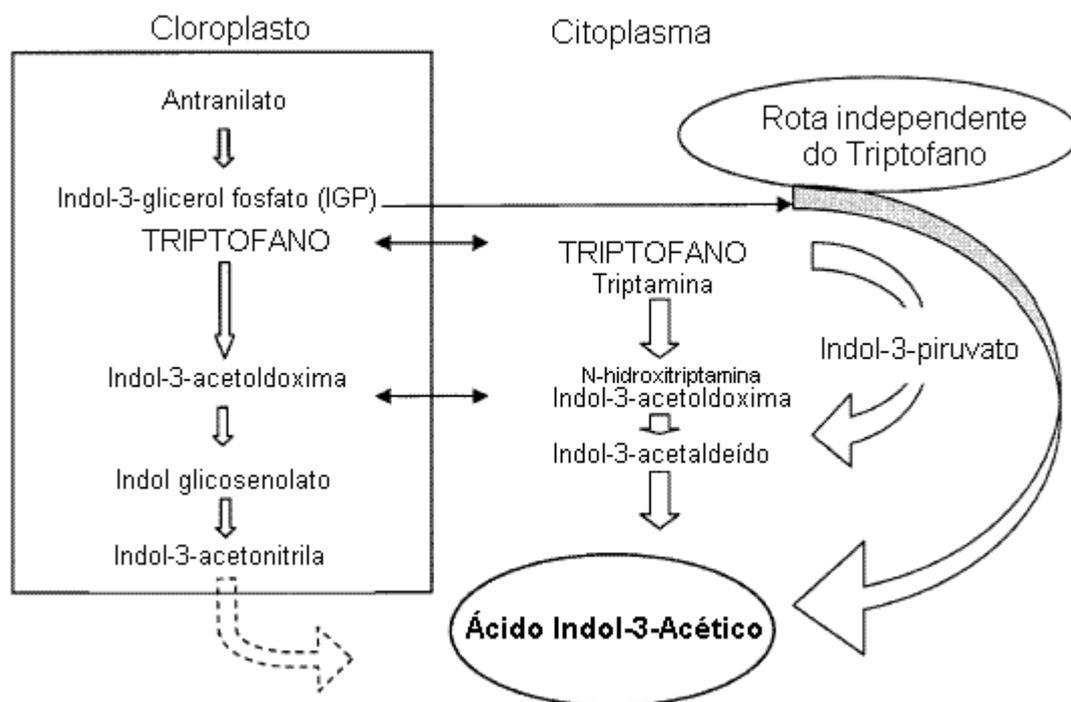


Figura 4. Rotas paralelas para a biossíntese de auxina. Dois compartimentos estão representados, o cloroplasto e o citoplasma. A seta pontilhada demonstra a rota do glicosenoato, restrita a poucas famílias vegetais. A seta longa mais à direita indica a rota ainda não elucidada independente do triptofano. Adaptado de Zazimalova e Napier (2002).

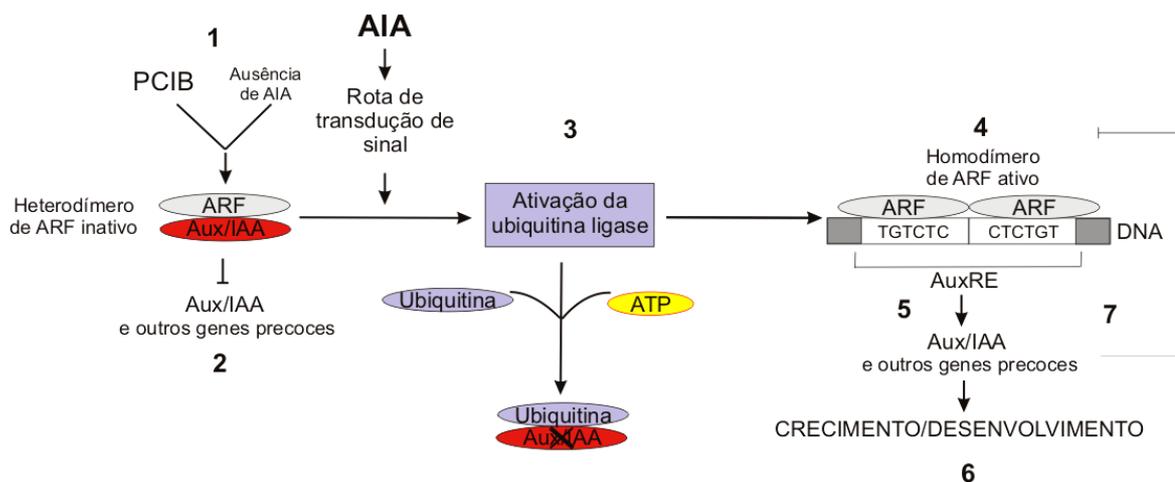


Figura 5. Modelo para resposta à auxina (AIA) proposto por Gray *et al.* (2001) e ação do inibidor de AIA, ácido *p*-Clorofenoxisobutírico (PCIB) sugerida por Oono *et al.* (2003). Na ausência de AIA, proteínas Aux/IAA reprimem a via de resposta à auxina através da regulação negativa dos Fatores de Transcrição de Auxina (ARF) (1); Bloqueio na transcrição de genes de resposta à auxina (2); Na presença de AIA, as proteínas Aux/IAA são destruídas por uma ubiquitina ligase. O PCIB impede essa destruição (3); A degradação das proteínas Aux/IAA resulta na ativação dos ARFs e desrepressão da via de resposta a AIA (4); Os ARFs ligam-se ao AuxRE (elemento de resposta à auxina) nos promotores dos genes precoces, ativando a transcrição (5); A transcrição dos genes inicia a resposta a AIA (6); Devido aos próprios genes Aux/IAA serem rapidamente induzidos por AIA, um *feedback* negativo existe entre as novas proteínas Aux/IAA sintetizadas restaurando a repressão no passo anterior da via (7). Embora o mecanismo de ação das Aux/IAA ainda seja pouco claro, um mecanismo provável é a prevenção da formação do dímero ARF-ARF.

2.4. Plantas mutantes em respostas hormonais

A via de sinalização celular envolvida na ação do tipo auxínica das SH é ainda controversa. Parte desse impasse pode ser atribuída aos problemas relacionados a possíveis alterações dos inibidores sintéticos, como PCIB e TIBA, quando em contato com soluções de SH. Uma alternativa para o estudo criterioso dos efeitos hormonais de SH é o uso de plantas mutantes ou geneticamente modificadas.

Plantas mutantes insensíveis ou supersensíveis à ação hormonal são bastante úteis para entender as vias de sinalização envolvidas no controle de uma determinada resposta fisiológica (Coenen *et al.*, 2002). O tomateiro mutante *diageotropica* (*dgt*) foi bem caracterizado quanto a sua resistência à auxina (Zobel 1972; Kelly e Bradford, 1986; Muday *et al.*, 1995; Pinno-Nunes, 2005). Kelly e Bradford (1986) demonstraram a redução da síntese de etileno e do alongamento de hipocótilos de tomate *dgt*. Esse mutante é caracterizado como uma planta anã, com crescimento diageotrópico dos caules e raízes, e raízes sem ramificação, sendo defectivo na via de transdução de sinal de auxina (Hicks *et al.*, 1989; Christian *et al.*, 2003) (Figura 6). Muday *et al.* (1995) relataram que o tomate *dgt* é menos sensível a inibição do crescimento desencadeada pela aplicação exógena de IAA. A auxina altera a expressão do gene *MHA2*, responsável pela expressão da principal isoforma da H⁺-ATPase de MP, aumentando a extrusão de H⁺ e conseqüentemente a extensibilidade da parede celular (Frías *et al.*, 1996), condição fundamental para a expansão da célula. Coenen *et al.* (2002) verificaram que a via de sinalização de auxina dependente do gene DGT altera a extrusão de H⁺ mediante uma regulação negativa desse processo. Christian *et al.* (2003) atribuíram o defeito do mutante *dgt* mais a percepção ou resposta à auxina do que ao transporte ou metabolismo, e confirmaram que a via dependente do gene DGT altera a resposta de crescimento estimulado por auxina. Recentemente foi obtida uma linhagem de tomateiro contendo a mutação *dgt* em plantas de porte micro (Micro-Tom - MT) (Pinno-Nunes, 2005), conhecidas como um modelo genético de tamanho reduzido e ciclo de vida curto (Meissner, 1997).

Existem ferramentas poderosas para o desenvolvimento de plantas mutantes com maior sensibilidade aos fitormônios. As bactérias *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes* podem transferir genes para plantas infectadas

induzindo à formação de tumores por meio da transferência da região-T ou T-DNA (DNA de transferência) de seu plasmídeo indutor de tumor (Ti) para o DNA nuclear da planta-alvo (Tepfer, 1984). A formação de *hairy roots* no local da infecção pode ser originada por *A. rhizogenes* (Ricker, 1930). Através de análise genética do T-DNA, foram identificados os genes *rol* (*root loci*), que estão intimamente associados com as alterações na resposta hormonal dos tecidos vegetais infectados por *A. rhizogenes* e que podem culminar na formação de *hairy roots* (Gaudin *et al.*, 1994). A ausência de mutantes em tomateiro com alta sensibilidade de auxina faz com que a obtenção de plantas transgênicas com os genes *rol* seja uma alternativa de variação genética no metabolismo/sensibilidade em auxina (Peres, LEP - comunicação pessoal). O mutante de tomateiro MT8196 (transformado no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz) produz *hairy roots* que são bastante úteis para essa abordagem.

Não existe nenhum relato da utilização de mutantes *dgt* ou de raízes transformadas geneticamente supersensíveis a auxinas (eg. MT8196) para avaliação da bioatividade de AH.



Figura 6. Fenótipo do micromutante *dgt* e o parenteal MT. (Pinno-Nunes, 2005).

2.5. A H⁺-ATPase do tipo P

A H⁺-ATPase é a bomba de H⁺ da MP mais importante nas células vegetais e fúngicas (Palmgren, 1991). A característica comum das ATPase do tipo P é a formação de um intermediário fosforilado (daí a classificação “Tipo P” - PO₄²⁻) (Briskin e Poole, 1983) identificável durante o ciclo catalítico da enzima, no qual o fosfato terminal do ATP está ligado a um resíduo aspartato na proteína (Pedersen e Carafoli, 1987) (Figura 7C). O ortovanadato (HVO₄²⁻) é um análogo do fosfato que inibe fortemente esse tipo de ATPase por competição pelo sítio catalítico (Sze, 1985). A H⁺-ATPase do tipo P presente na MP de células vegetais e fúngicas é composta por uma única subunidade, cuja parte catalítica possui aproximadamente 100 kDa (Briskin e Poole, 1983). A redução do pH do apoplasto é dependente da atividade das H⁺-ATPases que acoplam o transporte de H⁺ através da MP à hidrólise de ATP (Giannini e Briskin, 1987). A energização de transportadores para a absorção de íons e a acidificação do apoplasto são eventos centrais no metabolismo vegetal originados da atividade da H⁺-ATPase do tipo P de MP (Morsomme e Boutry, 2000). O processo de energização da MP é um passo fundamental para a absorção de nutrientes, pois, como as células tendem a acumulá-los, o transporte de nutrientes é freqüentemente contra o seu gradiente de concentração e/ou elétrico (Palmgren, 2001; Sondergaard *et al.*, 2004) (Figura 7A e 7B). Os cátions são atraídos para a célula devido ao potencial da membrana, internamente negativa, entrando através de proteínas canais. Os cátions, ânions e solutos sem carga elétrica podem atravessar a membrana via diversos carreadores, onde o transporte é energizado pela absorção concomitante de H⁺ (Palmgren, 2001). Além de gerar o gradiente eletroquímico necessário para o transporte de íons e outros metabólitos através das membranas, essa enzima participa de outras funções essenciais ao crescimento da planta, tais como tolerância à salinidade e regulação do pH intracelular (Palmgren, 1991; Morsomme e Boutry, 2000; Sondergaard *et al.*, 2004).

Para ocorrer o crescimento vegetal, é preciso, também, que as células se expandam fisicamente e, ao mesmo tempo, mantenham sua integridade mecânica devido à alta pressão de turgor. Nesse sentido, a ação combinada do vacúolo com a parede celular gera o turgor, a força motriz para a manutenção hidráulica e crescimento (Marty, 1999). A expansão celular é favorecida

concomitantemente aos processos citados pela ação de algumas proteínas específicas, dentre as quais, as expansinas assumem um importante papel, uma vez que em pH menor ou igual a 4,5, promovem o aumento da plasticidade da parede celular através da liberação momentânea de segmentos pequenos da matriz de glucanos ligados às microfibrilas de celulose (Cosgrove, 1998; 2000).

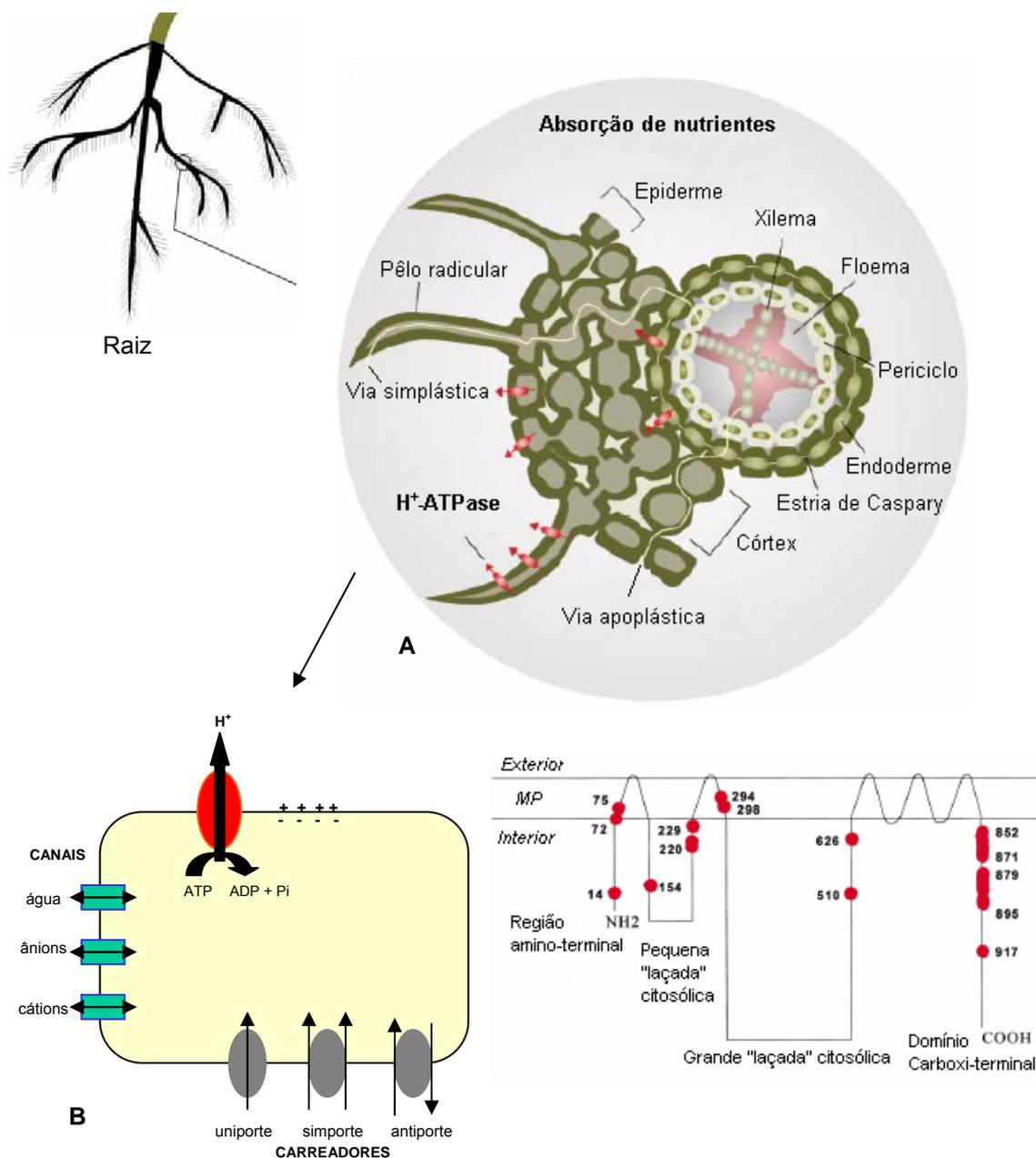


Figura 7. Transporte de nutrientes na raiz; a H^+ -ATPase está sempre ativa nas interfaces entre a via simplasto e apoplasto (Sondergaard *et al.*, 2004) (A). Os nutrientes podem ser transportados tanto por proteínas canais quanto por carreadoras; transporte primário e secundário através da membrana plasmática (B); topologia predita para a H^+ -ATPase (Morssome e Boutry, 2000) (C).

2.5.1. A ação da auxina e a H⁺-ATPase do tipo P

Segundo Rayle e Cleland (1972), a expansão da célula pode ser induzida pela ação das auxinas. Foi observado que as auxinas também podem levar ao aumento da síntese de H⁺-ATPases de MP através de um mecanismo ainda pouco conhecido (Hager *et al.*, 1991; Frías *et al.*, 1996). Postula-se que as auxinas possam aumentar a taxa de extrusão de H⁺ pela estimulação dos processos de: (1) Ativação de H⁺-ATPases preexistentes na membrana plasmática; e/ou (2) síntese de novas H⁺-ATPases (Cleland, 1995) (Figura 8). Os dois mecanismos não são exclusivos e existem evidências de que possam existir conjuntamente (Cleland, 1995). Segundo Hager (2003), a síntese de novas H⁺-ATPases induzida por auxina resulta não somente no aumento da extrusão de H⁺ mas também numa eventual restituição do número de H⁺-ATPases numa certa área de membrana. Devido à intensa expansão da MP durante o crescimento, o aumento do número de H⁺-ATPases garante a manutenção do potencial da membrana, do transporte ativo de solutos e do turgor celular. A relação entre a auxina, ativação das H⁺-ATPases e expansão celular é a base da teoria do crescimento ácido, cujos postulados foram redefinidos por Hager (2003) como: (i) a H⁺-ATPase localizada na MP é responsável pela extrusão de H⁺ para o apoplasto; (ii) o hormônio de crescimento auxina, num estado ativado, aumenta a atividade desta enzima, resultando em decréscimo do pH apoplástico; (iii) a queda do pH na parede celular é dependente da energia de oxidação que fornece ATP para a extrusão de H⁺; (iv) o pH reduzido da parede celular ativa enzimas que hidrolisam ligações inter e intramoleculares na parede celular, favorecendo a expansão celular; (v) a extrusão de H⁺ via ATPases é compensada por transportadores antiportes e canais de cátions (*e.g.*, K⁺). Essa absorção secundária de íons (K⁺) mantém a pressão de turgor num valor constante durante a expansão da célula.

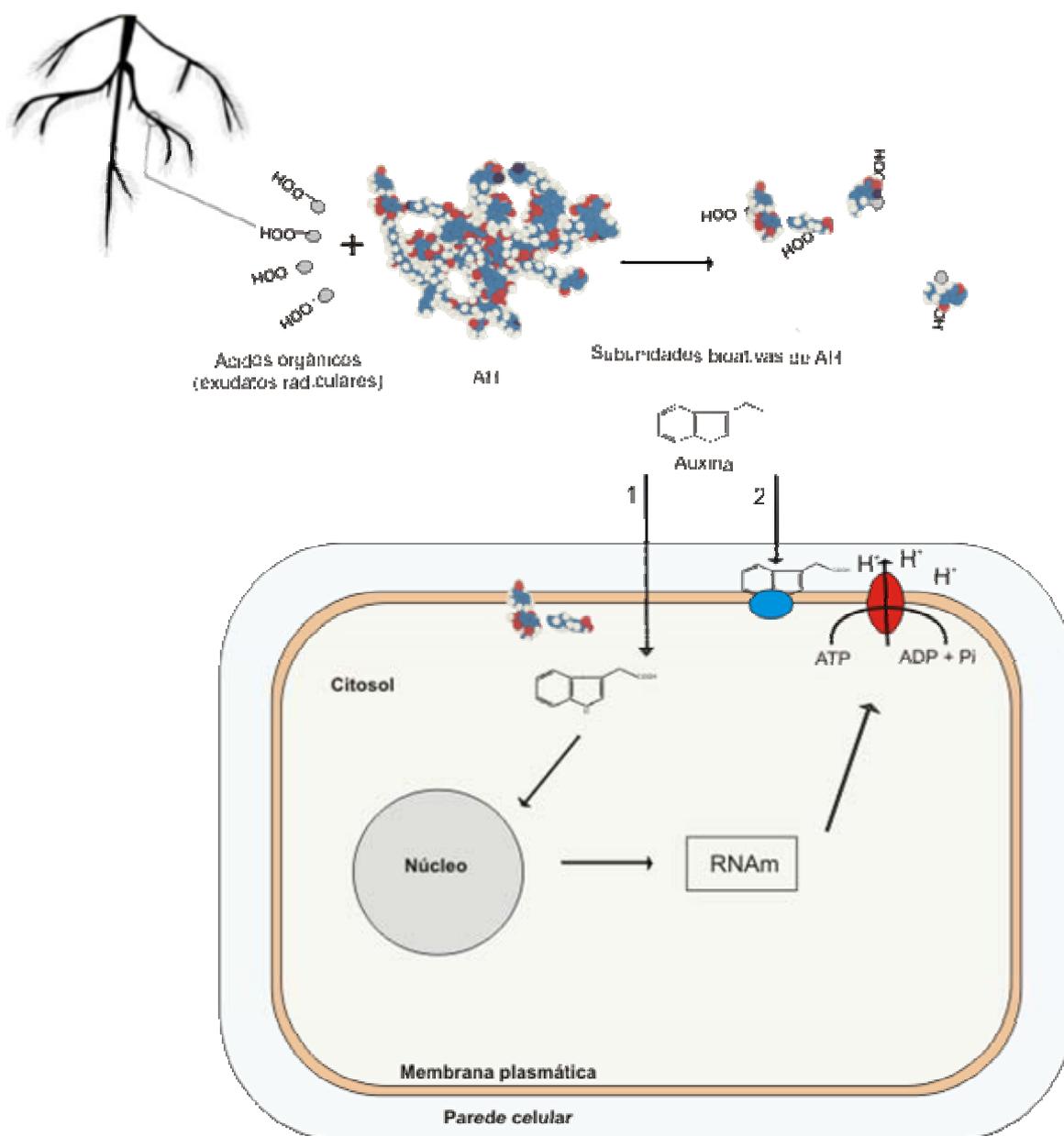


Figura 8. Modelos de ativação e síntese de H^+ -ATPases para a extrusão de H^+ induzidos por AIA e AH. A hipótese de síntese envolve mensageiros secundários induzidos por AIA que induzem a expressão de genes (1) que codificam a síntese de H^+ -ATPase. A hipótese de ativação envolve a interação da proteína ABP1 com a H^+ -ATPase (2). Neste modelo, ácidos orgânicos exsudatos das plantas interagem com a estrutura supramolecular do AH liberando moléculas bioativas (com grupos auxínicos) menores capazes de atravessar a membrana celular, ativando diretamente a H^+ -ATPase ou induzindo à sua expressão.

2.5.2. As bombas de H⁺ do tonoplasto

Os vacúolos das células vegetais são organelas multifuncionais que possuem um papel central nas estratégias do desenvolvimento celular. São compartimentos líticos que funcionam como reservatórios de íons e metabólitos imprescindíveis ao processo de detoxificação e homeostase celular, pois estão envolvidos nas respostas da célula ao ambiente e aos fatores bióticos que provocam os mais diferentes tipos de estresses (Marty, 1999). Provavelmente, o papel mais importante do vacúolo central seja o de aumentar o tamanho da célula (Taiz, 1992). Segundo esse autor, de maneira geral, as células vegetais sofrem um aumento de 10 a 20 vezes no volume durante a expansão celular. A maior parte desse aumento é promovida pela absorção de água. As funções que o vacúolo desempenha são dependentes das proteínas presentes na membrana vacuolar (também chamada de tonoplasto) (Figura 9). O movimento de água a favor do potencial eletroquímico é alcançado em virtude da presença de canais específicos (aquaporinas) (Maurel, 1997). Os fluxos de íons, água e metabólitos através do tonoplasto são cruciais para a expansão da célula e o crescimento da planta, transdução de sinais, homeostase e regulação das vias metabólicas (Sze *et al.*, 1992).

O tonoplasto regula o trânsito de íons e metabólitos entre o citosol e vacúolo de maneira semelhante à regulação realizada pela MP durante a absorção da célula, e possui duas enzimas que fornecem energia para os processos de transporte: a H⁺-ATPase vacuolar (V-ATPase ou ATPases do “tipo V”) e a H⁺-pirofosfatase vacuolar (H⁺-PPase ou V-PPase) (Rea e Sanders, 1987). De acordo com o modelo quimiosmótico de transporte de soluto dependente de energia, a força próton-motora, gerada tanto pela H⁺-ATPase quanto pela H⁺-PPase, pode ser usada para conduzir o transporte secundário de solutos (Rea e Sanders, 1987; Taiz, 1992; Maeshima, 2000). A presença das duas bombas (V-ATPase e H⁺-PPase) na mesma membrana tem sido considerada como necessária para o desempenho de funções fisiológicas específicas, ondem que o papel principal da V-ATPase seria a manutenção do gradiente eletroquímico de H⁺, enquanto a H⁺-PPase atuaria como um sistema auxiliar de bombeamento de H⁺ (Taiz, 1992; Façanha e De Meis, 1998) (Figuras 9 e 11). A H⁺-PPase é a

principal bomba de H^+ do vacúolo em tecidos mais jovens, enquanto a V-ATPase é a principal responsável pelo bombeamento de H^+ em tecidos mais maduros (Façanha e De Meis, 1998; Maeshima, 2000). A V-ATPase pertence a uma família de bombas de H^+ dependentes de ATP, responsável pela acidificação de compartimentos intracelulares nas células eucarióticas (Wang *et al.*, 1986; Sze *et al.*, 1992; Nelson, 1992; Kawasaki-Nishi *et al.*, 2003). As V-ATPases são enzimas heteromultiméricas constituídas de um complexo periférico catalítico (V_1) e de um complexo integral transmembrana responsável pela translocação de íons (V_0) (Sze *et al.*, 1992; Huss *et al.*, 2002) (Figura 10). As V-ATPases são inibidas por diferentes substâncias: os íons nitrato parecem interagir com o domínio protogênico, levando-o a ser menos sensível a hidrólise de ATP no sítio catalítico (Tu *et al.*, 1987); os antibióticos bafilomicina A_1 (White, 1994) e concanamicina A – este mais efetivo – (Huss *et al.*, 2002) inibem de maneira específica a V-ATPase. A bafilomicina interage com a parte hidrofóbica (V_0) da V-ATPase (White, 1994) e a concanamicina liga-se à subunidade c (Huss *et al.*, 2002). As V-ATPases possuem outras funções além da acidificação do vacúolo, e são consideradas as bombas de H^+ mais versáteis existentes na natureza (Nishi e Forgac, 2003). A H^+ -PPase também promove redução do pH e torna o potencial no interior das vesículas positivo (Wang *et al.*, 1987). Segundo Maeshima (2000), essa enzima possui três características peculiares: (i) consiste num polipeptídeo com massa molecular de cerca de 80 kDa; (ii) utiliza o pirofosfato inorgânico (PP_i) como substrato de baixo custo energético; e (iii) coexiste com a H^+ -ATPase numa mesma membrana vacuolar nas células vegetais (Rea e Sanders, 1987; Maeshima 2000) (Figuras 11 e 12). A atividade da H^+ -PPase é inibida por fluoreto de potássio (KF) (Maeshima e Yoshida, 1989). Apesar da importância da V-ATPase e da H^+ -PPase no processo de turgor celular, poucos trabalhos têm sido realizados a fim de relacionar essas bombas à expansão das células.

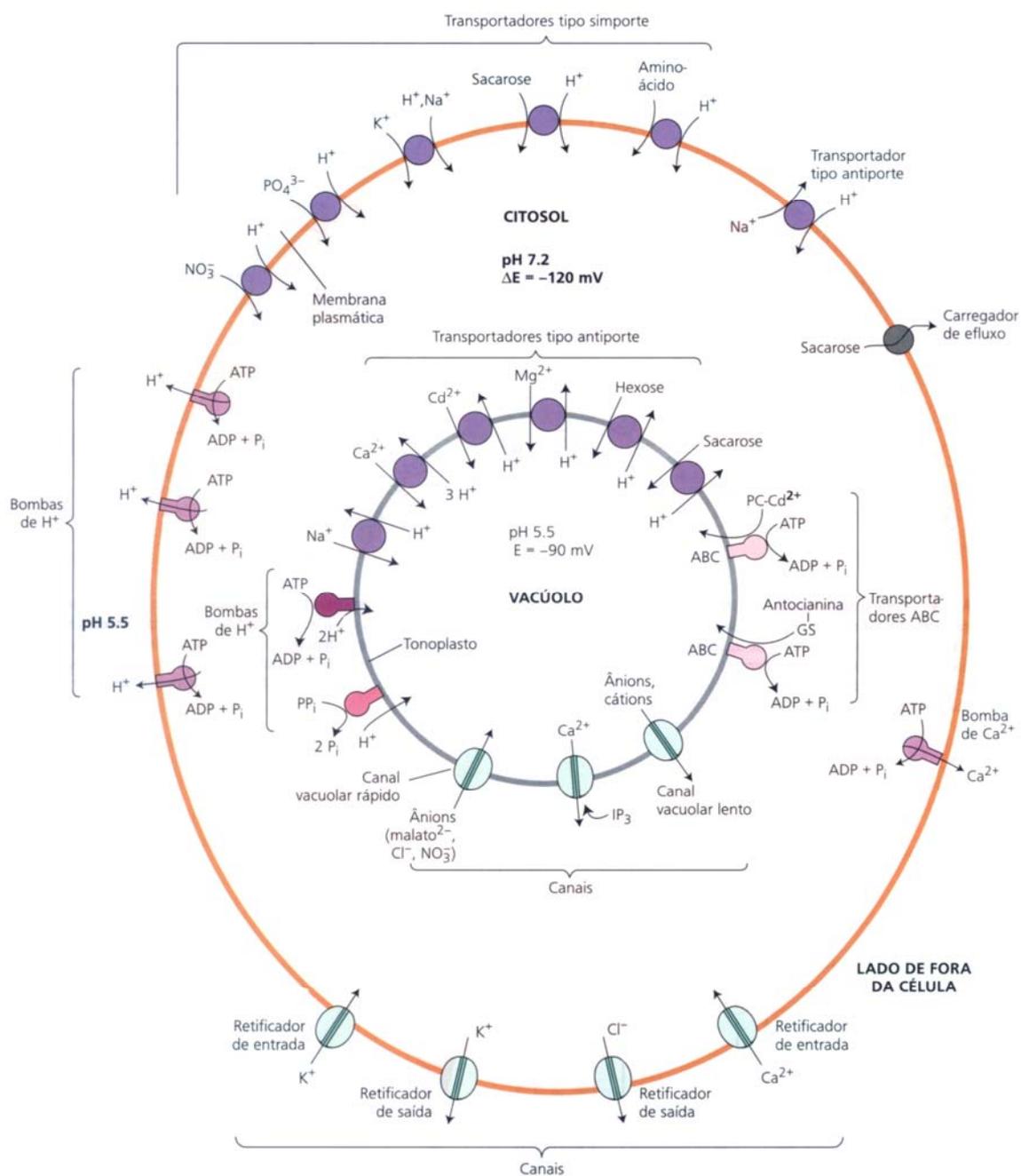


Figura 9. Cenário geral dos processos de transporte nas membranas das células vegetais (adaptado de Taiz e Zeiger, 2002).

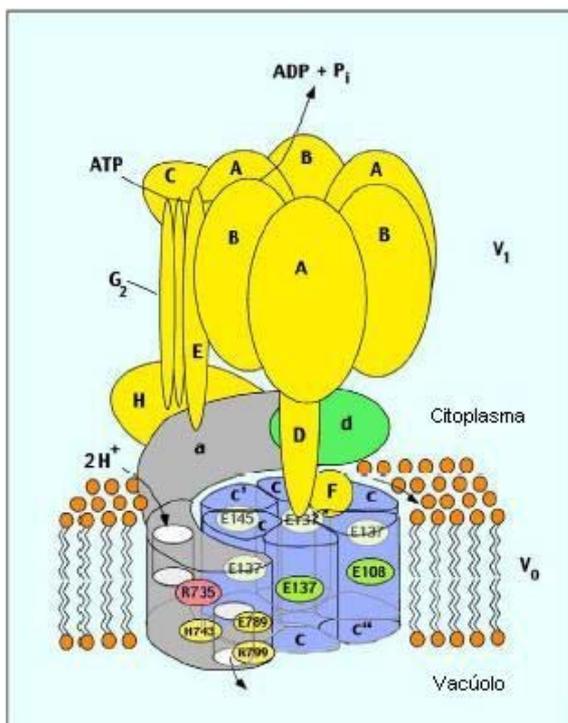


Figura 10. Mecanismo de rotação proposto para o transporte de prótons dependente de ATP promovido pela V-ATPase: a hidrólise de ATP no domínio V_1 parece levar a rotação do eixo central (composto pelas subunidades D e F), o qual, em resposta, leva à rotação do anel proteolipídico composto pelas subunidades c, c' e c'' localizadas na subunidade V_0 (Adaptado de Kawasaki-Nish *et al.*, 2003).

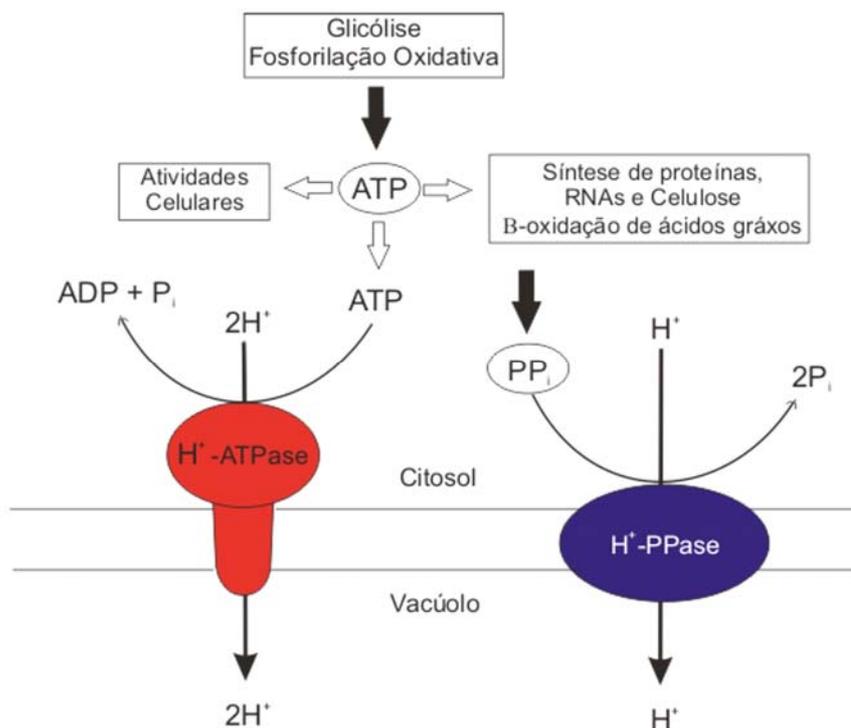


Figura 11. Produção de PP_i e as bombas H^+ -ATPase e H^+ -PPase da membrana vacuolar. O PP_i é fornecido com um subproduto da biossíntese de macromoléculas, tais como RNAs, proteínas, celulose e β -oxidação de ácidos graxos (adaptado de Maeshima, 2000).

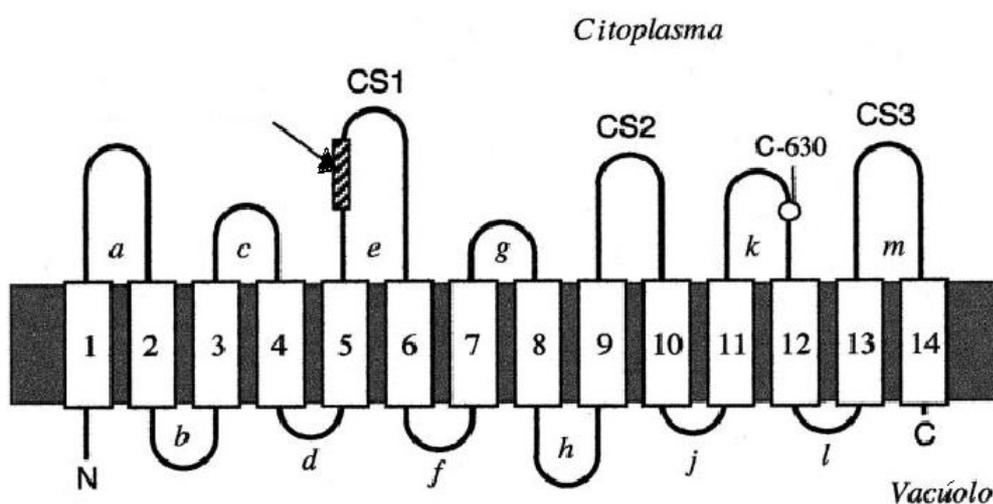


Figura 12. Modelo topológico da H^+ -PPase. Quatorze domínios transmembrana foram preditos. A seta indica o local da ligação do PP_i . Adaptado de Maeshima *et al.* (2000).

2.6.1. Ácidos húmicos e as bombas de H⁺ do tonoplasto

Durante o ciclo de crescimento da célula vegetal, a manutenção do turgor sustentada pelo vacúolo (*vacuolation*) fornece o aumento de volume necessário para a expansão celular (Cosgrove, 2000). O gradiente eletroquímico mantido pelas duas bombas de H⁺ do vacúolo gera o potencial necessário não só à expansão deste mas também ao crescimento da célula (Maeshima *et al.*, 1996). A inibição da V-ATPase pode reduzir o crescimento celular, sendo uma evidência direta da participação das bombas vacuolares nesse processo (Gogarten *et al.* 1992). A importância desta enzima foi confirmada através da utilização do mutante *Arabidopsis* (*det3*), onde a atividade reduzida da V-ATPase resultou em menor expansão de hipocótilos (Schumacher *et al.*, 1999). Tanto a V-ATPase quanto a H⁺-PPase estão envolvidas na expansão de hipocótilos (Katou e Okamoto, 1992; Maeshima *et al.*, 1996). Entretanto, a ação de AH sobre as bombas de H⁺ localizadas no tonoplasto não foi estudada, uma vez que a aparente elevada massa molecular dessas SH restringiria seu acesso ao interior da célula. Porém, como exsudatos orgânicos provenientes das raízes podem desmontar a supra-estrutura húmica em unidades menores (Cozzolino *et al.*, 2001; Façanha *et al.* 2002), algumas dessas subunidades dotadas de atividade hormonal atravessariam tanto a MP quanto o tonoplasto, afetando o funcionamento das bombas de H⁺ (Canellas *et al.*, 2005). Pinton *et al.* (1992) estudaram o efeito de SH de massa molecular pequena (< 5 Kda) em vesículas de tonoplasto *in vitro* e demonstraram uma ativação da V-ATPase em concentrações até 5 mg C L⁻¹. Esses autores sugeriram que as SH afetam as vesículas por um modo de ação que envolve a alteração da permeabilidade do tonoplasto em conjunto à mudança do gradiente elétrico, os quais poderiam, em troca, afetar a atividade da V-ATPase.

2.7. As alquilamidas: uma nova classe de substâncias promotoras do crescimento

As alquilamidas são metabólitos secundários que compreendem mais de 200 compostos relacionados, largamente distribuídos nas plantas (Ramirez-Chávez *et al.*, 2004). A estrutura geral das alquilamidas é resultado da condensação de um ácido graxo insaturado e uma amina (Hofer *et al.*, 1986). As principais afininas (alquilamidas naturais que estão presentes nos vegetais) já descritas e que promovem o desenvolvimento vegetal são: *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida e *N*-isobutil-2*E*,-decanamida e *N*-isobutil-decanamida) (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004). As afininas apresentam uma atividade bastante diferente em relação aos outros fitormônios que promovem a indução do enraizamento, provocando a formação de raízes laterais e o alongamento de pêlos radiculares de maneira bastante semelhante aos produzidos por auxinas sem, no entanto, causar o encurtamento do eixo radicular principal, efeito típico da auxina. Além disso, a forma pela qual o sistema radicular responde à afinina é independente da sinalização auxínica. Esses autores abriram a possibilidade da utilização dessa classe de compostos para o uso na estimulação do crescimento radicular. Entretanto, o modo como as alquilamidas podem afetar a cascata de produção de sinais que modifica o crescimento e a diferenciação nas células radiculares ainda é desconhecido.

Pequenas concentrações de substâncias húmicas (SH) podem aumentar o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Kononova, 1982). O aumento no sistema radicular geralmente é mais notado do que na parte aérea (Vaughan e Malcolm, 1985; Nardi *et al.*, 2002). A inibição do crescimento do eixo principal de raízes tratadas com doses elevadas de auxina (1-10 mg L⁻¹) não é observada em raízes tratadas com SH na mesma faixa de concentração (1-10 mg C L⁻¹). No entanto, em concentrações menores (0,1-0,5 mg C L⁻¹), essas SH chegam à taxa de inibição semelhante à que se observa para auxina em alta concentração (Muscolo *et al.*, 1999). Embora exista uma relação estabelecida entre o desenvolvimento radicular promovido por SH e auxina (O'Donnell, 1973; Cacco e Dell'Agnola, 1984; Muscolo *et al.*, 1999; Canellas *et al.*, 2002a; Quaggiotti *et al.*, 2004), uma parte do estímulo no crescimento da raiz pode ser devido a algum mecanismo que não é controlado por vias dependentes de auxina. A relação entre

a bioatividade e a química das SH é bastante difícil devido a sua complexidade, heterogeneidade e aspectos estruturais indeterminados, que resultam em resultados conflitantes (Vaughan *et al.*, 1985). Os AH foram descritos como substâncias de elevada massa molecular originados da transformação de biopolímeros do solo (Schnitzer, 1991). No entanto, foi sugerido que os AH decorrem da associação hidrofóbica de pequenos agregados, formando um arranjo supra-estrutural com aparente elevada massa molecular (Orlov, 1975). A idéia de que grupos carboxílicos e hidroxilas acoólicas e fenólicas presentes em SH seriam responsáveis pelo estímulo sobre as raízes das plantas foi proposta por Schnitzer e Poapst (1967). Esses autores observaram que o bloqueio dos grupamentos hidroxílicos por acetilação reduziu a iniciação de raízes, ao passo que o bloqueio dos grupamentos COOH por esterificação não causou efeito algum. Outros autores relacionaram a acidez carboxílica e à pequena massa molecular das SH com o efeito estimulatório observado no enraizamento de folhas de *Nicotiana plumbaginifolia* (Nardi *et al.*, 1994). Entretanto, SH de massa molecular aparentemente elevada (*eg.* AH) também podem estimular o crescimento radicular vegetal (O'Donnell, 1973; Canellas *et al.*, 2002a). Além disso, foi demonstrado por Canellas *et al.* (2005) que não existe relação entre o conteúdo de H⁺ livre na estrutura dos AH e a atividade biológica dessas substâncias. Canellas e Façanha (2004) verificaram que SH mais humificadas apresentam maior bioatividade do que as SH com menor grau de humificação. É possível que a evolução estrutural e a bioatividade estejam relacionadas também à presença de outros bioestimuladores do desenvolvimento vegetal, como as alquilamidas.

3. TRABALHOS

ÁCIDOS HÚMICOS E AUXINAS INDUZEM O DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES LATERAIS E ATIVAM AS BOMBAS DE H⁺ DA PLASMALEMA E DO TONOPLASTO

RESUMO

As substâncias húmicas (SH) podem induzir ao crescimento e à produtividade das plantas por meio de mecanismos ainda não completamente elucidados. Trabalhos anteriores demonstraram que ácidos húmicos (AH) isolados de vermicomposto podem estimular os estádios iniciais do desenvolvimento de raízes laterais e a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática, através de um mecanismo similar ao promovido por auxinas (ácido indol-3-acético, AIA). Neste estudo, foi avaliado o efeito de AH isolados de diferentes fontes e de três concentrações distintas de AIA sobre a atividade da H⁺-ATPase e H⁺-PPase de tonoplasto e o desenvolvimento radicular. Foi realizada uma comparação entre a ação dos AH e a do tipo auxínica. Os resultados demonstraram que os AH de diferentes solos e resíduos orgânicos na

concentração de 20 mg C L⁻¹, bem como as menores concentrações de AIA (10⁻¹⁰ e 10⁻¹⁵ M), levaram ao crescimento de plântulas de milho e proporcionaram uma marcante proliferação de sítios de mitose e de raízes laterais emergidas. A possibilidade de AH e AIA ativarem as bombas de prótons do tonoplasto e sua relação com o crescimento e morfologia das raízes foi discutida.

ABSTRACT

Humic substances (HS) can induce plant growth and productivity by yet unclear mechanisms. Previous reports showed that humic acids (HA) from earthworm compost can stimulate the earliest stages of lateral root development and the plasma membrane H⁺-ATPase activity, through a putative auxin-like mechanism (Canellas *et al.*, 2002a). In the present study we evaluated the effects of HA isolated from different sources and auxin (indole acetic acid, IAA) on activities of the H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase from maize tonoplasts and root development in order to analyse the possible relationships with auxin-like action. The results show that HA from different soils and organic residues at 20 mg C L⁻¹ as well as lowest AA concentrations (10⁻¹⁰ and 10⁻¹⁵ M) can improve root growth of maize seedlings related to a markedly proliferation of sites of lateral root emergence along with a differential activation of the tonoplast proton pumps. A possible role for these pumps activation on the mechanism of these HA and IAA on root growth and morphology was discussed.

1. INTRODUÇÃO

A maior parte do carbono da superfície terrestre se encontra nas substâncias húmicas (SH) (Hayes e Malcolm, 2001). Além de fornecer nutrientes para as plantas, as SH estimulam diretamente o crescimento vegetal. O efeito das SH sobre o desenvolvimento das plantas depende da fonte de onde essas substâncias são isoladas, da concentração e da espécie e idade da planta estudada (Vaughan e Malcolm, 1985). O efeito mais comum das SH é a estimulação do crescimento radicular (Nardi *et al.*, 2002), mas os mecanismos envolvidos nessa promoção continuam obscuros. Os ácidos húmicos (AH) foram descritos inicialmente como substâncias de elevada massa molecular originadas da transformação de biopolímeros das plantas nos solos (Schnitzer, 1991). Entretanto, Orlov *et al.* (1975) sugeriram que os AH eram resultado de pequenos agregados unidos através de associações hidrofóbicas e estabilizados por forças fracas formando um arranjo supra-estrutural com massa molecular aparentemente elevada. Esse modelo teórico alternativo foi confirmado por cromatografia de exclusão por tamanho (Piccolo *et al.*, 1996, 1999; Conte e Piccolo, 1999) e por RMN (Simpson, 2002).

Existem diversos trabalhos relatando os efeitos estimulatórios dos AH originados de diversas fontes de matéria orgânica sobre o desenvolvimento vegetal, tais como: AH de solos (*e.g.*, Govindasmy e Chandrasekaran, 1992; Pizzeghello *et al.*, 2002), de resíduos orgânicos, como o lodo proveniente da estação de esgoto doméstico (Masciandaro *et al.*, 1999; Façanha *et al.*, 2002) e de vermicomposto (Cacco e Dell'Agnola, 1984; Nardi *et al.*, 1994; Muscolo *et al.*, 1999; Masciandaro *et al.*, 1999; Atiyeh *et al.*, 2002; Canellas *et al.*, 2002; Arancon *et al.*, 2003). A hipótese de que as SH apresentam atividade do tipo hormonal não é recente e tem sido demonstrada em diversos trabalhos (Bottomley, 1917; Guminsk, 1968; O'Donell, 1973; Cacco e Dell'Agnola, 1984; Dell'Agnola e Nardi, 1987; Nardi *et al.*, 1994; Muscolo *et al.*, 1999, Canellas *et al.*, 2002, Quaggiotti *et al.*, 2004; Nardi *et al.* 2005).

Substâncias húmicas de massa molecular relativamente baixa (Varanini *et al.*, 1993) ou elevada (*e.g.* AH) (Canellas *et al.*, 2002; Façanha *et al.*, 2002)

podem induzir à atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP). Esses autores propuseram um mecanismo para a bioatividade dos AH baseado na “teoria do crescimento ácido”. Foi relatado um forte estímulo sobre a atividade e expressão da H⁺-ATPase de MP em raízes de plântulas de milho e café tratadas com AH isolado de vermicomposto. Além disso, esses autores identificaram a presença de grupamentos auxínicos na estrutura do AH através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Confirmando essas constatações, Quaggiotti *et al.* (2004) ratificaram a presença de AIA na estrutura de SH através de um ensaio imunológico. Foi demonstrado que frações húmicas de baixa massa molecular estimulam a absorção de nitrato através de um mecanismo associado ao aumento da síntese das isoformas *Mha1* e *Mha2* da H⁺-ATPase de MP.

O pH do citoplasma é regulado, também, pela ação das bombas de H⁺ localizadas no tonoplasto, além das ATPases de MP. Após o aumento da plasticidade da parede das células meristemáticas, o incremento de volume necessário à expansão da célula vegetal é devido à ação do vacúolo (Cosgrove, 2000). O vacúolo das células vegetais é uma organela multifuncional que possui um papel fundamental na estratégia do desenvolvimento (Marty, 1999). Entre suas funções, destacam-se a regulação da homeostase celular, que envolve o controle do volume e turgor, regulação de íons do citoplasma e do pH e, ainda, armazenamento de aminoácidos, açúcares e CO₂ (Sze *et al.*, 1992; Taiz, 1992; Maeshima, 2000). O gradiente eletroquímico gerado no tonoplasto é decorrente, principalmente, da atividade da H⁺-ATPase (V-ATPase) e da pirofosfatase (H⁺-PPase) (Wang *et al.*, 1986; Rea e Sanders, 1987). A V-ATPase realiza o transporte de H⁺ dependente de ATP, acidificando compartimentos intracelulares em células eucarióticas (Tu *et al.*, 1987; Forgac, 1999; Nishi e Forgac, 2002). O gradiente eletroquímico transmembrana gerado pela H⁺-PPase é proveniente da energia da hidrólise de PPI (Wang *et al.*, 1986). Maeshima (2000) descreveu as funções da H⁺-PPase no tonoplasto, que incluem a regulação do potencial osmótico e da acidificação do vacúolo durante a expansão e ativação do sistema secundário de transporte de H⁺ através da força próton-motora. A coexistência das duas bombas no vacúolo das células vegetais permite o desempenho de funções importantes ao funcionamento da célula. O Papel da V-ATPase na manutenção do gradiente eletroquímico transmembrana parece ser predominante sobre a H⁺-PPase, a qual serviria como um sistema de reserva auxiliar (Taiz, 1992).

Pinton *et al.* (1992) verificaram um estímulo sobre a V-ATPase após a pré-incubação de vesículas de tonoplasto isoladas de raízes de aveia com SH de massa molecular baixa (< 5 KDa) em baixa concentração ($< 0,5$ mg C L⁻¹). Foram observadas, ainda, uma inibição da atividade dessa enzima e dissipação do potencial elétrico com o uso de concentrações mais elevadas de SH (0,5-1,0 mg C L⁻¹). Segundo os autores, as SH afetaram as vesículas através de um modo de ação que envolve a alteração da permeabilidade da membrana juntamente com uma modificação do gradiente elétrico transmembrana, que, por sua vez, afetaria a atividade da ATPase. A ação de AH sobre as bombas de H⁺ localizadas no tonoplasto ainda não foi estudada, uma vez que, teoricamente, a aparente elevada massa molecular dessas SH restringiria seu acesso ao interior do citoplasma.

No presente trabalho, as atividades da V-ATPase e H⁺-PPase foram investigadas como um dos mecanismos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento radicular de plântulas de milho promovido por AH isolados de diferentes fontes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção, isolamento e purificação dos ácidos húmicos

Os ácidos húmicos (AH) foram extraídos de lodo da estação de tratamento de Jacarepaguá (AHL) - Rio de Janeiro/RJ, de vermicomposto (AHV), e da camada superficial (0-10 cm) de um Argissolo (AHA) e de um Cambissolo (AHC) da região de Campos dos Goytacazes/RJ (Tabela 1).

Os AHL, AHV e AHA foram extraídos e caracterizados previamente por Canellas *et al.* (1999); Canellas *et al.* (2002a) e Canellas *et al.* (2002b). Os AH do Cambissolo foram isolados e purificados seguindo a mesma metodologia para os demais, isto é, de acordo com o procedimento preconizado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (Schnitzer e Skinner, 1982).

Resumidamente, foi utilizado NaOH 0,5 mol L⁻¹ como solvente na razão solo: solvente de 1:10 (m:v) em atmosfera inerte de N₂. A separação dos AH foi realizada com o abaixamento do pH da solução até 1-1,5 com HCl 6 mol L⁻¹. A redissolução e precipitação foi repetida três vezes. Em seguida, adicionou-se 200 mL de solução aquosa diluída de HF e HCl [5 mL HCl (12 M) + 5 mL HF (48 %) L⁻¹]. Após uma centrifugação (5.000 g) por 15 minutos, os AH foram lavados seguidamente com água, até teste negativo com AgNO₃. Foi realizada a diálise contra água deionizada usando uma membrana 12-14 KDa (*Thomas Scientific Inc.*). As amostras dialisadas foram liofilizadas e caracterizadas quimicamente.

2.2. Características estruturais dos ácidos húmicos

A composição elementar foi determinada com analisador automático CHN Perkin-Elmer. A acidez total (método Ba(OH)₂) e a acidez carboxílica (método Ca(Oac)₂) foram determinadas de acordo com Schnitzer e Gupta (1965). A acidez fenólica foi obtida por diferença. Chegou-se a relação E₄/E₆ através do quociente entre a absorvância em 465 nm e 665 nm, numa solução contendo 4 mg de AH em 100 mL de NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹ com pH ajustado a 8,2. Os diferentes grupos funcionais dos AH foram identificados pela técnica de espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF). Os espectros foram analisados conforme a frequência e a intensidade das bandas de absorção correspondentes às vibrações de estiramento (ν) ou deformação (δ) (Colthup *et al.*, 1964; Stevenson, 1994; Canellas *et al.*, 1999). As medidas foram efetuadas em pastilhas contendo 1,0 mg de cada AH misturados com 100 mg de KBr. A faixa de varredura dos espectros foi de 4.000 até 400 cm⁻¹, utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer 1420.

2.3. Crescimento de plântulas e tratamento com ácidos húmicos e auxina

Sementes de milho (*Zea mays* L., var. UENF 506-6) foram esterilizadas por meio de imersão numa solução de NaClO 1,0% por 30 minutos, e, em seguida, colocadas em água destilada por um período de seis horas após a lavagem. Então, as sementes foram acondicionadas em papel, para germinação no escuro a 28°C. Quatro dias após a germinação das sementes de milho, as plântulas foram transferidas para um meio mínimo contendo CaCl₂ 2 mM e 0 ou 20 mg C L⁻¹ de AH extraído de fontes diferentes (AHA-Argissolo; AHC-Cambissolo; AHL-Lodo; AHV-Vermicomposto) ou auxinas (10⁻⁵, 10⁻¹⁰ e 10⁻¹⁵ M). Experimentos anteriores indicaram que plântulas tratadas por sete dias com AH 20 mg C L⁻¹ exibiram maior desenvolvimento radicular. Neste trabalho, o meio mínimo (CaCl₂ 2 mM) foi utilizado a fim de evitar qualquer influência dos nutrientes, que poderiam funcionar de maneira sinérgica com os AH estimulando o desenvolvimento radicular e o metabolismo das plântulas (e.g. Pinton *et al.*, 1999).

2.4. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições por tratamento, cujo modelo matemático pode ser descrito como: $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$, onde: Y_{ij} = resposta experimental medida na unidade experimental j submetida ao tratamento i; μ = média geral; t_i = efeito relativo ao tratamento i; e_{ij} = erro aleatório.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para a avaliação de todas as características. A diferença entre os tratamentos foi determinada pelo Teste de Média Tukey ($P < 0,05$).

Os dados apresentados na Figura 2 e na Tabela 2 representam a média de quatro experimentos independentes. Os dados foram transformados em porcentagem de estímulo em relação ao controle.

2.5. Avaliação do crescimento radicular

Após cinco dias em solução, as plântulas foram coletadas para avaliação da área radicular, utilizando-se o programa computacional para análise digital de imagens *Delta-T Scan*TM. A massa fresca das raízes foi determinada em balança analítica de precisão, imediatamente após a coleta. Outras amostras de raízes foram coletadas e usadas para avaliações e experimentos seguintes.

2.6. Frequência de sítios de mitose e raízes laterais emergidas

As raízes de plântulas de milho foram coletadas, e analisados individualmente (10 repetições por tratamento) os sítios de mitose e raízes emergidas. O sistema radicular foi coletado e lavado com água e clareado em solução de KOH 0,5 % durante 20 minutos em banho a 75 °C. Após esse clareamento, as amostras de raízes foram lavadas novamente e mantidas no escuro por pelo menos 14 horas tingindo em solução de hematoxilina férrica. Então, as raízes foram enxaguadas com água e clareadas com ácido láctico 80% durante 30 a 90 segundos em banho a 75° C. As raízes inteiras foram transferidas individualmente para placas de petry com água destilada e observadas sob a lupa esterioscópica, para avaliar o número de sítios de mitose. Esses sítios aparecem como pontos vermelho-escuros contra um fundo da cor do tecido da raiz. O estoque de solução de hematoxilina contém 1 g de hematoxilina, 0,5 g de sulfato férrico de amônio e 50 mL de ácido acético a 45%. A tintura estoque (40 vezes concentrada) foi mantida em ambiente protegido da luz, em temperatura ambiente.

2.7. Purificação das vesículas de tonoplasto e de membrana plasmática

As vesículas de tonoplasto e de MP foram isoladas de raízes de plântulas de milho crescidas em meios com ou sem AH (na concentração de 20 mg C L⁻¹) ou AIA (nas concentrações de 10⁻⁵, 10⁻¹⁰ e 10⁻¹⁵ M), utilizando a centrifugação diferencial como descrito por De Michelis e Spanswich (1986), com algumas modificações (Façanha e de Meis, 1995). Resumidamente, 10 g (massa fresca) de raízes de milho foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 20 mL de

meio de extração gelado contendo 250mM de sacarose, 10% de glicerol (m:v), 0,5% de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 0,2% de BSA (Albumina Sérica Bovina) (m:v) e 0,1 M de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano] -HCl, pH 8,0. As soluções-estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso, foram adicionados 150 mM de KCl, 2 mM de DTT (ditiotreitól) e 1 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). Na manipulação das raízes até a obtenção do homogenato, bem como nas centrifugações, a temperatura foi controlada a fim de que não excedesse 4° C. Além disso, o pH do tampão de extração foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,5-8,0. Após a maceração, o homogenato resultante foi filtrado através de quatro camadas de gaze e submetido a centrifugação numa centrífuga himac CP (HITACHI) a 8.000 g durante 15 minutos para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 g por 15 minutos numa ultracentrífuga himac CP 85b (HITACHI), utilizando-se o rotor P70 para o isolamento das mitocôndrias. O precipitado foi coletado e ressuspensão em 1 mL de solução tampão (meio de ressuspensão: glicerol 15 % (v:v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 mM de Tris-HCl pH 7,6 e EDTA 1 mM) e armazenado em freezer a -70°C. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação, agora a 100.000 g por 40 minutos. O precipitado dessa nova centrifugação, denominado "fração microssomal", foi ressolubilizado em meio de ressuspensão, para imediata aplicação sobre o gradiente de sacarose.

A purificação das vesículas de tonoplasto e de membrana plasmática foi realizada conforme procedimento utilizado por Façanha e De Meis (1998). Foi aplicado 1 mL da suspensão contendo a fração microssomal sobre um gradiente descontínuo bifásico de sacarose (cada camada com volume de 1,5 mL) nas concentrações de 25/45 % (m/m), contendo ainda: Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM. O gradiente foi submetido a uma centrifugação de 100.000 g num rotor SW40 (Himac), durante 90 minutos (ultracentrífuga himac CP 85b). Após a centrifugação, duas bandas são visíveis: uma, entre as camadas 25 e 45%, e outra, no topo da camada 25%, correspondendo a vesículas contendo MP e tonoplasto, respectivamente. Essas vesículas foram coletadas e utilizadas imediatamente ou congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -70°C antes do uso. A concentração de proteína total contida na preparação foi dosada

pelo método descrito por Bradford (1976).

2.7.1. Determinação da atividade ATPásica de Membrana Plasmática

A atividade ATPásica foi determinada pela medida da liberação de Pi segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarrow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10% (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H₂SO₄ 2 % + Ácido Ascórbico 1 % (100:1) e, após 15 minutos, efetuou-se a leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Nessa reação, o fosfato é incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul. Composição do meio de reação: 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 6,5, 3 mM de MgCl₂, 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 50 µg de proteína. Cerca de 80-95% da atividade da H⁺-ATPase das vesículas medida foi inibida por 0,2 mM de vanadato, um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (De Michelis e Spanswick, 1986). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase foi medida a 30 °C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída à ATPase do tipo P.

2.7.2. Bombeamento de H⁺ da H⁺-ATPase de membrana plasmática

O gradiente eletroquímico de H⁺ gerado pela H⁺-ATPase de MP foi estimado através do decréscimo de fluorescência da sonda sensível a pH 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA) (415/485 nm excitação/emissão), e expresso em porcentagem. O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, que, quando não protonada, tem a capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica das membranas. A protonação do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Dessa forma, a sonda distribui-se através da membrana, em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. O meio de reação foi composto de 10 mM de Mops-Tris (pH 6,5), 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, ACMA 2 µM e 50 µg de proteína. A

reação foi desencadeada pela adição de ATP (1 mM). A adição, tanto de 3 μ M de carbonil cianeto p(trifluorometoxi)-fenilidrazona (FCCP) quanto de 2 μ M de NH_4Cl aboliu o gradiente de H^+ formado pela hidrólise de ATP.

2.7.3. Determinação da atividade da V-ATPase e H^+ -PPase

A atividade da V-ATPase e da H^+ -PPase de vesículas de tonoplasto foi determinada pela medida da liberação de Pi , segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada pela adição de ácido tricloro acético (TCA gelado) para uma concentração final de 10% (v/v). Cerca de 80-95% da atividade da ATPase das vesículas medidas a pH 7,0 foi inibida ou por 50mM de KNO_3 ou por 10nM de Concanamicina, dois eficientes inibidores da V-ATPase (Tu *et al.*, 1987; Bowman *et al.*, 1988; Sze, 1985). O meio de reação conteve 10 mM de Mops-Tris (pH 7,0), 100 mM de KCl, 3 mM de MgCl_2 e 50 μ g de proteína. Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da V-ATPase foi medida a 30° C, com ou sem Concanamicina, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a V-ATPase. A atividade da H^+ -PPase das vesículas medidas a pH 7,0 foi inibida por KF, um eficiente inibidor da H^+ -PPase (Maeshima e Yoshida, 1989) ou ausência de KCl. O meio de reação conteve 10 mM de Mops-Tris (pH 7,0), 3 mM de MgCl_2 e 50 μ g de proteína com ou sem 100 mM de KCl. A diferença entre as atividades com ou sem 100 mM de KCl foi atribuída à H^+ -PPase.

2.7.4. Bombeamento de H^+ da V-ATPase e H^+ -PPase

Os gradientes eletroquímicos de H^+ gerados pela V-ATPase e H^+ -PPase foram estimados por meio de decréscimo de fluorescência da sonda sensível a pH 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA) (415/485 nm excitação/emissão), e expressos em porcentagem. O meio de reação conteve 10 mM de Mops-Tris (pH 7,0), 100 mM de KCl (com e sem no caso da H^+ -PPase), 5 mM de MgCl_2 , 2,5 ACMA 2 μ M e 50 μ g de proteína. Em ambos os casos, a reação foi desencadeada pela adição do substrato ATP ou PPI (ambos 1 mM). A adição de FCCP 3 μ M ou de NH_4Cl 2 μ M foi usada para dissipar o gradiente de H^+ formado tanto pela hidrólise de ATP quanto de PPI.

3. RESULTADOS

3.1. Características estruturais dos ácidos húmicos

Para relacionar as características estruturais dos AH estudados com sua bioatividade, foi realizada a análise da composição elementar (Tabela 1). A formação das SH é um processo ecológico complexo, dependente de vários fatores bióticos e abióticos, mas cujas conseqüências são refletidas no conteúdo dos seus principais átomos constituintes. Assim, SH mais evoluídas, ou seja, com maior grau de humificação, apresentam relativamente maior conteúdo de C e de N e menor conteúdo de O. Além disso, a composição elementar dos AH é uma propriedade estável (Canellas *et al.*, 2000a). O conteúdo de C, H e N dos AH analisados variou de 322 a 556 g.kg⁻¹, de 41 a 70 g.kg⁻¹ e de 27 a 49 g.kg⁻¹, respectivamente. O maior conteúdo de C foi encontrado no AHC. O conteúdo de O variou de 351 a 610 g.kg⁻¹ e a acidez total variou de 333 a 1.340 cmol_c Kg⁻¹. Os valores mais elevados para essas características foram encontrados no AHA. A relação E₄/E₆ variou de 3,4 a 6,0, seguindo a seqüência em ordem decrescente AHA < AHC < AHL < AHV. A baixa relação E₄/E₆, indiretamente, reflete uma massa molecular relativamente mais elevada (Chen *et al.*, 1977).

Tabela 1. Composição elementar (livre das cinzas), acidez e relação E_4/E_6 de ácidos húmicos isolados de solos diferentes (AHA - Argissolo; AHC - Cambissolo) e resíduos orgânicos (AHL - Lodo de esgoto; AHV - Vermicomposto).

| tratamentos | Composição elementar (g.kg^{-1}) | | | | | Acidez ($\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$) | | | E_4/E_6 |
|------------------|---|----|----|-----|--------|---|------|--------|-----------|
| | C | H | N | O | cinzas | total | COOH | OH-fen | |
| AHA ¹ | 322 | 41 | 27 | 610 | 20 | 1340 | 1227 | 113,0 | 3,4 |
| AHC | 556 | 48 | 45 | 351 | 17 | 333 | 207 | 126,0 | 3,9 |
| AHL ² | 540 | 70 | 49 | 341 | 7,4 | 574 | 455 | 129,2 | 4,3 |
| AHV ³ | 485 | 56 | 32 | 427 | 5,1 | 531 | 496 | 170,2 | 6,0 |

1-Canellas *et al.* (2002a); 2-Canellas (1999) e 3-Canellas *et al.*, 2002b

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) fornecem informações sobre a presença dos grupos funcionais na matéria orgânica, bem como sobre a natureza de suas ligações químicas e sua reatividade (Stevenson, 1994; Johnston *et al.*, 1994; Johnston e Aochi, 1996). Os espectros de IV-TF dos AH (Figura 1) apresentaram uma banda de absorção alargada e intensa em 3.400 cm^{-1} devido a grupos OH e estiramentos N-H; estiramentos simétricos e assimétricos de grupos C-H alifáticos em 2.950 e 2.970 cm^{-1} . A banda de absorção em 1.720 cm^{-1} geralmente é atribuída à presença de C=O em grupos carbonila. O modo de estiramento carbonila de amidas secundárias, como aquelas que ocorrem em proteínas e polipeptídeos, está relacionado à banda Amida I e ocorreu próximo a 1.650 cm^{-1} . Amidas secundárias também exibem outra banda característica (Amida II) em 1.540 cm^{-1} firmada pelo modo de deformação N-H (Coulthup *et al.*, 1964). Os grupos carboxílicos ionizados apareceram entre 1.610 cm^{-1} e em 1.380 cm^{-1} , correspondendo a vibrações simétricas e assimétricas de estruturas COO^- . A região de deformação C-H é em 1.450 cm^{-1} . As bandas de absorção em 1.237 cm^{-1} foram atribuídas a deformações de fenóis; absorções devido a estiramentos de polissacarídeos exibiram bandas entre 1.094 e 1.007 cm^{-1} . As bandas em 914 cm^{-1} foram atribuídas à deformação C-H em anéis aromáticos. As principais diferenças entre os espectros IV-TF dos AH foram identificadas na região de impressão digital das amostras entre 1.480 e 900 cm^{-1} . A absorção obtida nessa região foi bastante diferente nos AH avaliados.

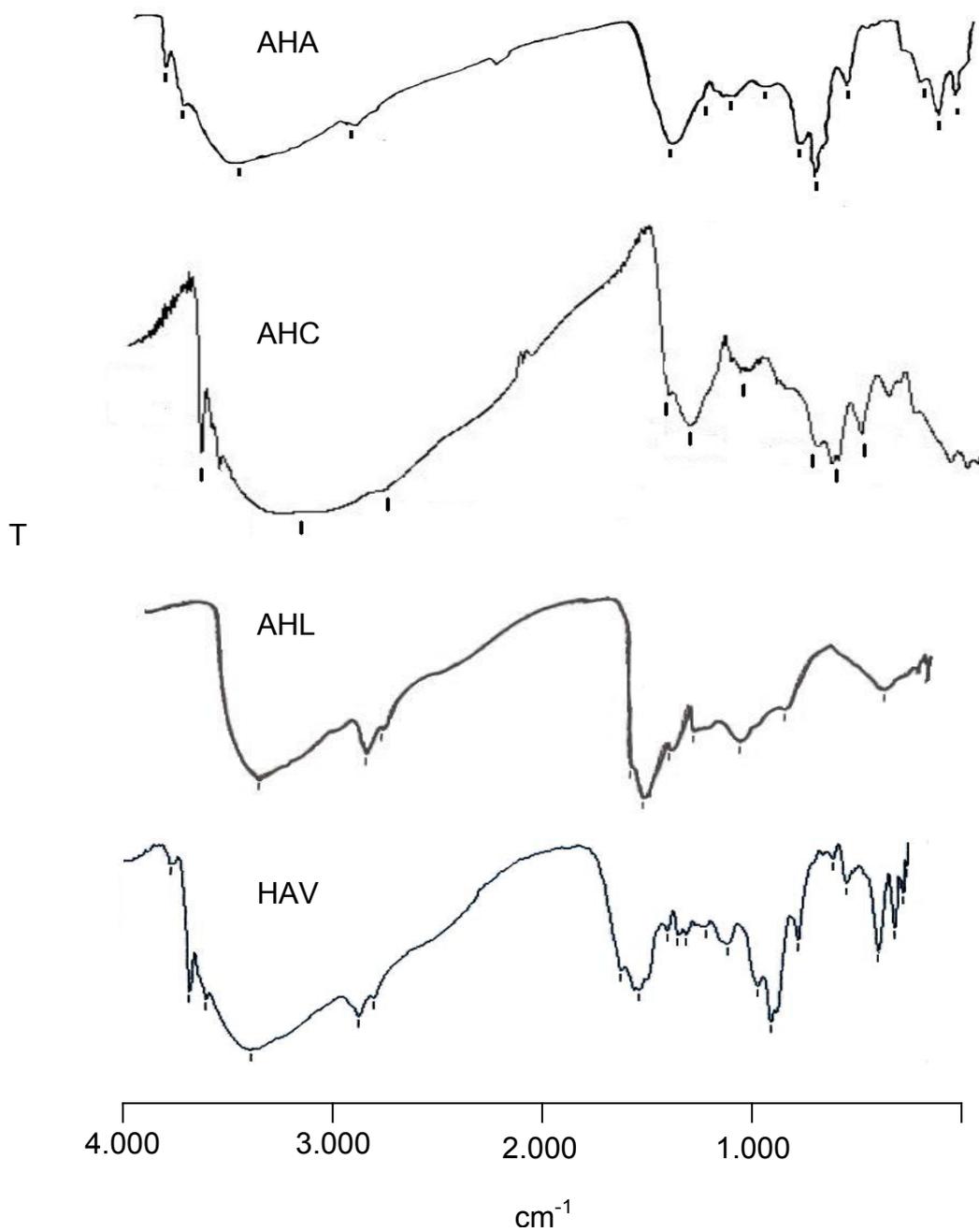
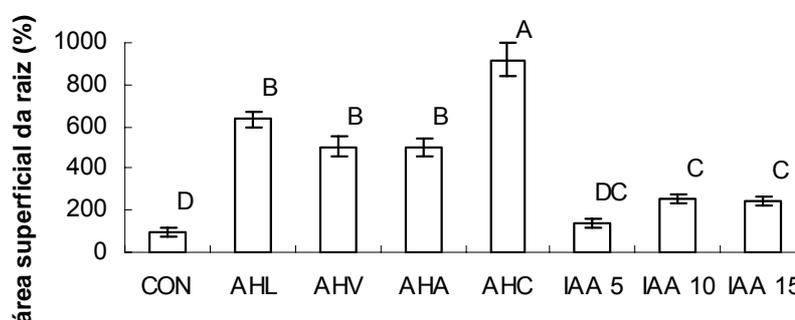


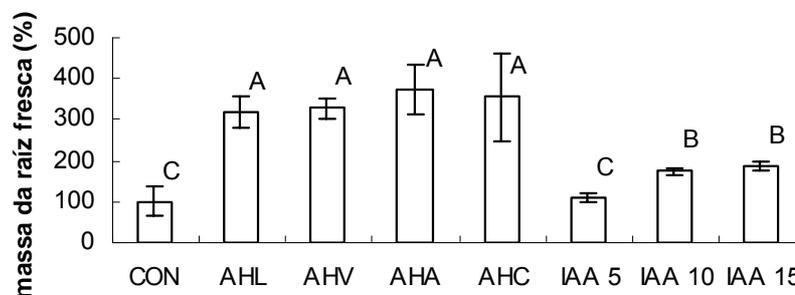
Figura 1. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) de ácidos húmicos isolados de solos diferentes (AHA - Argissolo; AHC - Cambissolo) e resíduos orgânicos (AHL - Lodo de esgoto; AHV – Vermicomposto).

3.2. Área superficial e massa das raízes frescas

As plântulas de milho tratadas por cinco dias com os diferentes AH e duas concentrações de AIA, 10^{-10} e 10^{-15} M, apresentaram elevada proliferação de raízes secundárias, resultando em maior área radicular superficial, analisada pelo programa computacional para análise digital de imagens *Delta-T Scan*TM (Figura 2A). Os AH promoveram um estímulo quatro vezes maior na área radicular quando comparados às menores doses de auxina. A massa fresca das raízes aumentou em 244%, em média, nos tratamentos com AH, enquanto as doses 10^{-10} e 10^{-15} M de AIA estimularam essa característica em cerca de 80% (Figura 2B).



A



B

Figura 2. Efeito de diferentes AH (AHA - Argissolo; AHC - Cambissolo; AHL - Lodo de esgoto; AHV - Vermicomposto) e concentrações de auxina 10^{-5} , 10^{-10} e 10^{-15} M (IAA5, IAA10 e IAA15, respectivamente) sobre a área radicular (A) de plântulas de milho analisada pelo programa computacional para análise digital de imagens *DeltaT-Scan*TM e sobre a massa fresca das raízes (B). Os dados representam a média de quatro experimentos independentes (10 plantas por tratamento em cada um). A diferença estatística é representada por letras diferentes (Teste de Tukey $P < 0,05$).

3.3. Indução de sítios de mitose e emergência de raízes laterais

A auxina é um hormônio que exerce um papel fundamental no desenvolvimento das raízes laterais (Laskowski *et al.*, 1995). A zona de diferenciação celular das raízes tem uma região com elevada densidade de células meristemáticas onde ocorre a emissão de raízes laterais (Jahn *et al.*, 1998). No presente trabalho, foram avaliados o desenvolvimento desses sítios de mitose e a emissão de raízes a partir deles em plântulas tratadas ou não com AH 20 mg C L⁻¹ ou AIA 10⁻⁵, 10⁻¹⁰ e 10⁻¹⁵ M (Tabela 2). Os AH e as menores concentrações de auxina elevaram em cerca de duas vezes o número de sítios de mitose e raízes laterais em média. O AH mais efetivo (AHC, isolado da camada superficial de um Cambissolo) induziu a 50% mais sítios de mitose quando comparado a concentração de AIA mais eficaz (10⁻¹⁰ M). Esses primórdios radiculares sofrem uma expansão notável (última fase do desenvolvimento da raiz lateral) e, uma vez emersa, o número de células perto dos ápices da raiz lateral aumenta (Casimiro *et al.*, 2003).

Tabela 2. Efeito de diferentes AH (AHA - Argissolo; AHC – Cambissolo; AHL - Lodo de esgoto; AHV – Vermicomposto) e concentrações de auxina 10⁻⁵, 10⁻¹⁰ e 10⁻¹⁵ M (AIA5, AIA10 e AIA15, respectivamente) sobre o desenvolvimento radicular avaliado pela quantificação dos sítios de mitose e raízes emersas. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes (10 plantas por tratamento em cada um). A diferença estatística é representada por letras diferentes na coluna (Teste de Tukey $P < 0,05$).

| Tratamentos | Sítios de mitose | Raízes emergidas |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Controle | 36 ± 2,3 D | 53 ± 2,5 D |
| AHA | 103 ± 2,9 A | 175 ± 2,7 AB |
| AHC | 107 ± 3,3 A | 182 ± 1,8 A |
| AHL | 80 ± 2,7 BC | 165 ± 1,0 B |
| AHV | 67 ± 1,8 C | 89 ± 4,5 C |
| AIA5 | 46 ± 2,7 D | 60 ± 1,3 D |
| AIA10 | 88 ± 1,3 B | 182 ± 1,5 A |

AIA15

78 ± 5,1 BC

166 ± 1,9 B

3.4. Efeitos dos ácidos húmicos e auxinas sobre as bombas de H⁺

As vesículas de tonoplasto e de MP isoladas das raízes de plântulas de milho tratadas por cinco dias com 20 mg C L⁻¹ de AH ou AIA 10⁻¹⁰ e 10⁻¹⁵ M exibiram um estímulo evidente das atividades ATPásica sensível a concanamicina e vanadato e dependente de K⁺ da H⁺-PPase (Tabela 3), bem como a formação de um gradiente de H⁺ dependente de ATP ou PPi, medido pela queda da fluorescência da sonda ACMA (Figura 2). Tanto o tratamento com o AHA quanto com o AHV, promoveram um aumento três vezes maior na atividade de hidrólise de ATP sensível a concanamicina, enquanto o AHL e o AHC estimularam 113% e 60%, respectivamente. Por outro lado, os tratamentos com as concentrações de auxina 10⁻⁵, 10⁻¹⁰ e 10⁻¹⁵ M aumentaram essa atividade hidrolítica em 13%, 53% e 120%, respectivamente. A estimulação observada sobre a hidrólise da H⁺-PPase foi de 23%, 46%, 123% e 146% para os tratamentos AHV, AHL, AHC e AHA, respectivamente. As concentrações de auxina 10⁻⁵, 10⁻¹⁰ e 10⁻¹⁵ M aumentaram essa atividade em 31%, 38% e 69%, respectivamente. Os tratamentos AHC e AHL elevaram em cerca de três vezes a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase sensível a vanadato, enquanto os tratamentos AHV e AHA estimularam essa atividade em 82% em média. Os tratamentos com auxina nas concentrações 10⁻¹⁰ e 10⁻¹⁵ M estimularam essa atividade em 57%, enquanto a dose mais alta desse hormônio (10⁻⁵ M) promoveu uma inibição discreta (Tabela 3). A atividade de hidrólise de ATP ou PPi na maioria dos tratamentos foi acoplada à translocação de H⁺ (Tabela 3 e Figura 3).

Tabela 3. Efeito de diferentes AH (AHA - Argissolo; AHC - Cambissolo; AHL - Lodo de esgoto; AHV - Vermicomposto) e concentrações de auxina 10^{-5} , 10^{-10} e 10^{-15} M (AIA 5, AIA 10 e AIA 15, respectivamente) sobre as bombas de H^+ . A atividade de hidrólise de ATP vanadato-sensível medida em vesículas isoladas de raízes de milho tratadas ou não por cinco dias. O meio de reação foi composto de 50 mM Tris-HCl (pH 6,5), 3 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl e 1 mM ATP. Para as vesículas de tonoplasto, o meio foi similar, com exceção do pH do tampão (7,0) e agentes inibidores (Concanamicina para a V-ATPase.e K^+ -dependente para a H^+ -PPase). A diferença estatística é representada por letras diferentes na coluna (Teste de Tukey $P < 0,05$).

| Tratamentos | Atividade das bombas de H^+ | | |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | Membrana plasmática | Tonoplasto | |
| | H^+ -ATPase | H^+ -ATPase | H^+ -PPase |
| | $\mu mol Pi mg^{-1} min^{-1}$ | $\mu mol Pi mg^{-1} min^{-1}$ | $\mu mol PPI mg^{-1} min^{-1}$ |
| Controle | 1,57 \pm 0,13 C | 0,15 \pm 0,02 C | 0,13 \pm 0,02 C |
| AHA | 2,75 \pm 0,14 B | 0,41 \pm 0,02 A | 0,32 \pm 0,02 A |
| AHC | 4,65 \pm 0,24 A | 0,24 \pm 0,03 BC | 0,29 \pm 0,04 AB |
| AHL | 4,58 \pm 0,12 A | 0,32 \pm 0,02 AB | 0,19 \pm 0,01 C |
| AHV | 2,97 \pm 0,13 B | 0,40 \pm 0,03 A | 0,16 \pm 0,02 C |
| AIA 5 | 1,19 \pm 0,17 C | 0,23 \pm 0,03 BC | 0,17 \pm 0,01 C |
| AIA 10 | 2,52 \pm 0,12 B | 0,33 \pm 0,01 AB | 0,18 \pm 0,01 C |
| AIA 15 | 2,41 \pm 0,10 B | 0,17 \pm 0,01 C | 0,22 \pm 0,01 BC |

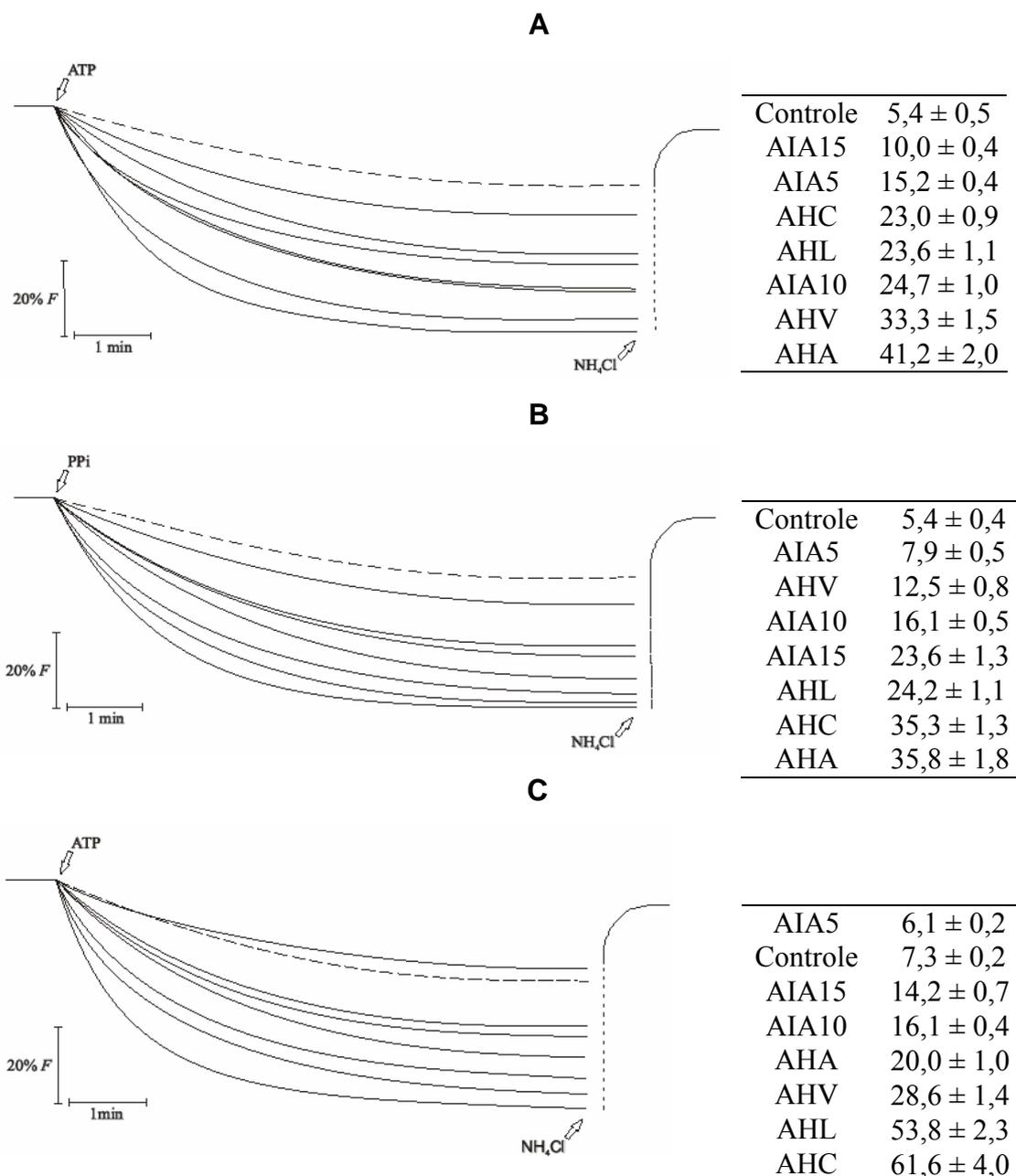


Figura 3. Formação do gradiente de H^+ pela V-ATPase (A), PPase (B), e H^+ -ATPase de MP (C) de vesículas isoladas de raízes de milho tratadas ou não com 20 mg C de AH L^{-1} proveniente de Argissolo (AHA), Cambissolo (AHC), lodo da estação de tratamento (AHL) e Vermicomposto (AHV) ou auxinas 10^{-5} , 10^{-10} e 10^{-15} mol. L^{-1} (AIA 5, AIA 10 e AIA 15, respectivamente). O meio de reação conteve 10 mM Mops-Tris (pH 7,0 - vesículas de tonoplasto; pH 6,5 vesículas de MP), 3 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 2 μ M de ACMA e 50 μ g de proteína. A reação foi iniciada com a adição de ATP (ou PPI) 1 mM a 30°C. Após o declínio do gradiente de H^+ , o protonóforo FCCP ou NH_4Cl foi adicionado, promovendo a recuperação da fluorescência-base.

4. DISCUSSÃO

Tem sido amplamente reconhecido que as SH podem regular o crescimento das plantas através de uma atividade do tipo auxínica (Bottomley, 1917; Cacco e Dell'Agnola, 1984; Nardi *et al.*, 1996). Existem duas interpretações diferentes para o processo de crescimento vegetal induzido pelas auxinas: o primeiro é baseado numa ativação de curto prazo e/ou uma indução da síntese *de novo* da H⁺-ATPase de MP, a qual acidifica o apoplasto e ativa enzimas (eg. expansinas) que promovem a plasticidade da parede celular (Teoria do Crescimento Ácido, Hager *et al.* 1971, 1991; Rayle e Cleland, 1972, 1992); o segundo postula uma modulação combinada das bombas de H⁺ do tonoplasto e a absorção de íons, resultando na entrada de água no vacúolo para dar origem à pressão de turgor necessária à expansão da célula (Katou e Okamoto, 1992; Maeshima *et al.*, 1996).

Embora existam evidências convincentes de que as SH são capazes de estimular a H⁺-ATPase de MP (Maggioni *et al.*, 1987; Pinton *et al.*, 1992; Varanini *et al.*, 1993; Pinton *et al.*, 1997; Canellas *et al.*, 2002; Façanha *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004), a ação dessas substâncias sobre as bombas de H⁺ localizadas no tonoplasto e sua provável relação com efeitos hormonais permanecem obscuras. No presente estudo, foram avaliados os efeitos promovidos por AH isolados da camada superficial de dois solos diferentes (Cambissolo e Argissolo) e de dois resíduos orgânicos distintos (Vermicomposto e lodo proveniente da estação de tratamento de esgoto), além de três concentrações de AIA (a auxina mais comum na natureza) sobre as propriedades de transporte de H⁺ das vesículas de tonoplasto e MP, em paralelo ao desenvolvimento de raízes laterais em milho. A auxina é um regulador-chave do desenvolvimento de raízes laterais (Laskowski *et al.*, 1995) e os níveis desse fitormônio na extremidade radicular podem controlar a iniciação de raízes laterais através da regulação de genes específicos (Stals e Inze', 2001). As concentrações mais baixas de AIA (10⁻¹⁰ e 10⁻¹⁵ M) induziram aos sítios de mitose nessa região da raiz em 140 e 115%, respectivamente, enquanto os AHA e AHC aumentaram em 200% essa característica (Tabela 2). A partir da emissão da raiz,

o número de células próximas ao seu ápice aumenta, e existem evidências de que essas células possuem elevada quantidade de H⁺-ATPases de MP (Jahn *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, 2002). Além disso, a raiz lateral emergida passa por uma visível expansão celular (Casimiro *et al.*, 2003). As raízes emergidas foram estimuladas em cerca de 200% pelas auxinas, ao passo que alguns AH aumentaram essa característica em mais de 250%. Os maiores estímulos sobre a emissão de raízes laterais e sobre a área radicular foram promovidos pelos AH, e podem ser relacionados com a maior ativação das bombas de H⁺ do tonoplasto. Maeshima (1990) demonstrou, em hipocótilos de feijão, que, para ocorrer o processo de expansão celular estimulado pelo turgor do vacúolo, é necessário o aumento da quantidade de H⁺-ATPase e H⁺-PPse. Os resultados aqui apresentados revelaram que AH isolados de diversas fontes de matéria orgânica e as menores concentrações de AIA foram capazes de estimular a atividade do tonoplasto e da H⁺-ATPase de MP e o desenvolvimento radicular. Embora a área radicular tenha sido estimulada tanto pelos AH quanto pelas auxinas, as SH aumentaram em 540% essa característica enquanto a concentração de AIA mais efetiva (10⁻¹⁰ M) elevou-a em cerca de 150%. Além disso, a massa fresca da raiz foi estimulada em mais de três vezes pelos AH, ao passo que as auxinas pouco alteraram essa característica.

Estudos prévios realizados *in vitro* demonstraram que muitos fitormônios, incluindo auxinas em baixa concentração (10⁻¹⁰ M), podem estimular as atividades de hidrólise das bombas de H⁺ do tonoplasto isoladas de vesículas de raízes de beterraba (Ozolina *et al.*, 1996; Salyaev *et al.*, 1999). Além disso, também foi relatado que SH poderiam estimular a atividade *in vitro* da H⁺-ATPase vacuolar de raízes de aveia (Pinton *et al.*, 1992). Esses autores demonstraram que o efeito estimulatório sobre a H⁺-ATPase foi limitado às SH de baixa massa molecular (< 5 KDa) em baixa concentração (< 0,5 mg C L⁻¹), uma vez que, acima dessa concentração, haveria inibição do efeito observado. De qualquer forma, até o presente não existem relatos da ação de SH de elevada massa molecular sobre as bombas de H⁺ de tonoplasto em ensaios realizados *in vivo*. Os dados aqui apresentados demonstram que as bombas de H⁺ do tonoplasto também são estimuladas em raízes de plântulas de milho tratadas com diferentes doses de auxina (Tabela 3 e Figura 2). A atividade de hidrólise e o transporte de H⁺ dependentes de ATP e PPi promovidos pela V-ATPase H⁺-PPase,

respectivamente, exibiram seus maiores estímulos quando as raízes de milho foram tratadas com AIA na concentração de 10^{-10} M. A dose mais elevada de AIA (10^{-5} M) aumentou a atividade e transporte de H^+ dependentes de ATP da V-ATPase, contrastando com um menor estímulo relativo sobre a H^+ -PPase (dependente de PPI) na mesma concentração. Fenômeno oposto ocorreu com a atividade e o transporte de H^+ no caso da H^+ -PPase de plantas tratadas com AIA 10^{-15} M, ou seja, menor estímulo da V-ATPase e maior da H^+ -PPase. Ozolina *et al.* (1996) demonstraram que os hormônios vegetais (auxina, citocinina, ácido abscísico e giberelina) podem agir como reguladores da atividade hidrolítica das bombas de H^+ do tonoplasto, e que essa regulação depende da concentração do hormônio testado. Mais tarde, em um ensaio semelhante, Salyaev *et al.* (1999) demonstraram que o papel-chave desses fitormônios na regulação da atividade das enzimas também é alterado de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta. Apesar de os estudos do grupo citado anteriormente terem se concentrado somente na atividade hidrolítica das enzimas *in vitro*, é possível estabelecer um comportamento do tipo regulatório das bombas de H^+ baseado também nos resultados *in vivo* aqui relatados, onde foram levadas em consideração ainda as atividades de transporte de H^+ .

Foi descrita previamente a presença de grupos semelhantes ao AIA na estrutura de AH isolados de vermicomposto, os quais estimulam a atividade da H^+ -ATPase de MP através de um mecanismo análogo ao proposto para a auxina (Canellas *et al.*, 2002; Façanha *et al.*, 2002). No presente trabalho, a efetividade dos grupos AH-AIA deve ser avaliada com cautela, uma vez que todos os AH analisados foram muito mais efetivos do que as três concentrações de AIA usadas. Realmente, foi demonstrado que o AIA está presente em diferentes SH, mas as concentrações encontradas nunca eram suficientes para justificar a atividade bioquímica dessas SH sobre o crescimento das plantas (por exemplo, Muscolo *et al.*, 1998; Pizzeghello *et al.*, 2001). Embora essas concentrações estejam dentro da faixa encontrada nos AH (cerca de 10^{-10} M, dados não apresentados), existem mais de 50 compostos que podem expressar uma atividade biológica semelhante à da auxina (Tomic *et al.*, 1998; Bertosa, 2003 e referências citadas). Portanto, é provável que atividade do tipo auxínica expressa pelos AH esteja relacionada também a outros compostos químicos com atividade semelhante que podem estar presentes no arranjo supra-estrutural dos AH.

Por outro lado, a atividade dos grupos bioativos dos AH pode ser dependente da sua liberação da estrutura dos AH durante uma possível interação-resposta da raiz, através de uma ligação específica a um receptor designado, desencadeando uma série de eventos que resultam no desenvolvimento de raízes laterais.

As incertezas relativas ao mecanismo pelo qual as SH estimulam as atividades bioquímicas das plantas também é devido, em parte, à sua heterogeneidade e dificuldade de caracterização (Pizzeghello *et al.*, 2001). Através da análise dos espectros de IV-TF, foi possível identificar uma relação entre os aspectos estruturais e a fonte de onde os AH foram extraídos. A região de absorção entre 1.492 e 900 cm^{-1} é conhecida como a região de impressão digital (Coulthup *et al.*, 1964) de uma substância: compostos similares apresentam absorções idênticas nessa região e, por outro lado, compostos distintos apresentam absorções distintas. Cada AH estudado apresentou absorções particulares nessa região (Figura 1). Além disso, os AH apresentaram, também, características químicas bem distintas, avaliadas pela composição elementar, acidez total e razão E_4/E_6 (Tabela 1), indicando uma diferenciação marcante entre os diversos tipos de AH utilizados. Apesar das diferenças estruturais observadas, todos os AH apresentaram habilidade para estimular o crescimento das raízes e a atividade das bombas de H^+ do tonoplasto e da MP. Porém, a magnitude desses estímulos variou em função do tipo de AH. Isso está de acordo com a idéia de que SH extraídas de fontes diferentes têm características estruturais diferentes, o que, por sua vez, pode influenciar a sua bioatividade (Dormmar, 1975). A ação das SH sobre o desenvolvimento vegetal pode variar também de acordo com sua interação com as raízes das plantas (Vaughan e Malcolm, 1985). Façanha *et al.* (2002) relataram que exsudatos liberados por raízes de milho modificam a conformação de SH de elevada massa molecular (eg. AH), através da observação de forte mudança no perfil cromatográfico (analisado em cromatografia por exclusão de tamanho em gel de sephadex) de soluções de AH após o cultivo das plantas. Nardi *et al.* (2005) utilizaram exsudatos radiculares de milho na extração de SH, além de KOH. Foi relatado um aumento relativo da bioatividade (avaliado pela concentração de auxina e giberelina nas frações orgânicas) das SH.

A magnitude dos efeitos sobre as atividades das bombas do tonoplasto é dependente da fonte da qual foi isolado o AH e, conseqüentemente, da sua

natureza química. Orlov (1998) sugeriu que a elevada atividade biológica do solo concorre para a formação de SH alcalino-solúveis mais condensadas e com maior estabilidade. Por outro lado, o baixo conteúdo de bases trocáveis no Argissolo pode contribuir para o decréscimo da intensidade do processo de humificação (Cunha *et al.*, 2005), *i.e.*, degradação microbiológica dos resíduos animais e vegetais, condensação química e formação dos agregados húmicos e estabilização através da ligação com a fração mineral do solo (Stevenson, 1994). Como consequência, a condensação dos AH é reduzida nos solos muito intemperizados (Kononova, 1966). Solos com maior grau de intemperismo (*eg.* Argissolos) apresentaram AH com maior conteúdo de O, e acidez total e carboxílica como resultado de uma matéria orgânica mais oxidada. Isso está de acordo com a teoria geral da humificação postulada por Stevenson (1994) que revela a presença de material húmico mais oxidado nos solos como maior grau de humificação. Canellas e Façanha (2004) demonstraram que SH mais condensadas podem promover maiores estímulos sobre a H⁺-ATPase de MP de raízes de milho. Os processos de vermicompostagem e de produção do lodo de esgoto tratado caracterizam-se por uma intensa transformação biológica no primeiro passo do processo de humificação, e, como resultado dessa atividade, ocorrem a estabilização desses resíduos e a formação de produtos do tipo SH. Os AH provenientes desses produtos apresentaram elevada bioatividade (Tabela 2, Figuras 2 e 3). No presente trabalho, os AH mais condensados aparentemente promoveram maiores estímulos sobre as bombas de H⁺ do tonoplasto (V-ATPase e H⁺-PPase) e sobre a H⁺-ATPase de MP: os AH com maior bioatividade foram isolados do solo com menor grau de intemperismo (AHC) e do lodo de esgoto (AHL), ambos com baixa relação E₄/E₆. A macroestrutura complexa dos AH revelada por essa relação está de acordo com o estabelecido por Canellas e Façanha (2004). A ação de SH de elevada massa molecular sobre as bombas de H⁺ do tonoplasto foi comprovada.

Finalmente, os dados tomados em conjunto fornecem a primeira evidência de que tanto auxinas como frações húmicas de elevada massa molecular estão envolvidas na expansão de raízes de milho, através da ativação da V-ATPase e da H⁺-PPase. Essas bombas de H⁺ são responsáveis pela ativação do transporte secundário de íons no tonoplasto e pelo turgor necessário à expansão celular (Rea e Sanders, 1985; Taiz, 1992; Maeshima, 2000). Uma vez

que a raiz primordial sofre uma expansão notável conforme emerge de seu sítio precursor no último estágio de desenvolvimento da raiz lateral (Casimiro *et al.*, 2003), a ativação das bombas de H^+ dependente de AH e AIA também pode participar do desenvolvimento de raízes laterais de plântulas de milho. São necessários mais estudos com a finalidade de entender as vias de sinalização pelas quais os AH poderiam alterar as propriedades das principais bombas de H^+ do tonoplasto.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

As substâncias húmicas (SH) podem induzir ao crescimento e à produtividade vegetal através de mecanismos ainda não completamente elucidados. Trabalhos anteriores demonstraram que ácidos húmicos (AH) isolados de vermicomposto podem estimular os estádios iniciais do desenvolvimento de raízes laterais e a atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática, através de um mecanismo similar ao promovido por auxinas (AIA). Neste estudo, foi avaliado o efeito de AH isolados de diferentes fontes e de três concentrações de IAA sobre a atividade da H^+ -ATPase e H^+ -PPase de tonoplasto.

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- (i) os AH isolados de diferentes solos e resíduos orgânicos na concentração de 20 mg C L^{-1} , assim como as menores concentrações de AIA (10^{-10} e 10^{-15} M), podem induzir ao crescimento de plântulas de milho relacionado com uma marcante proliferação de sítios de mitose e raízes emergidas;
- (ii) a ativação das bombas de prótons do tonoplasto promovida por AH e AIA parece ter relação com o crescimento e morfologia das raízes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arancon, N.Q., Lee, S., Edwards, C.A., Atiyeh, R. (2003) Effect of humic acids derived from cattle, food and paper-waste vermicomposting on growth of greenhouse plants. *Pedobiologia* 47.
- Atiyeh, R.M., Lee, C.A., Edwards, C.A., Arancon, N.Q., Metzger, J.D. (2002) The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresourse Technology* 84, 7-14.
- Bertosa, B., Kojic'-Prodic, B., Wade, R.C., Ramek, M., Piperaki, S., Tsantili-Kakoulidou, A., Tomic, S. (2003) A new approach to predict the biological activity of molecules based on similarity of their interaction fields and the $\log p$ and $\log d$ values: application to auxins. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43:1532-1541.
- Blakely, L.M., Durham, M., Evans, T.A., Blakely, R.M. (1982) Experimental studies on lateral root-formation in radish seedling roots 1. general-methods, developmental stages, and spontaneous formation of laterals roots. *Bot. Gazet.* 143, 341-352.
- Bottomley, W.B. (1917) Some effects of organic-promotion substances (auximones) on the growth of *Lema minor* in mineral cultural solutions. *Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences* 89, 481-505.
- Bowman, E. J., Siebers A., Altendorf, K. (1988) Bafilomicins: a class of inhibitors of membranes ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Prot Natl Acad Sci USA* 85:7972-7976.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Cacco, G., Dell'Agnola, G. (1984) Plant growth regulator activity of soluble humic complexes. *Can. J. Soil Sci.* 64:225–228.

Canellas, L.P., Guridi, F., Santos, G.A., Rumjanek, V.M. e Bráz-Filho, R. (2001) Aumento da resolução de espectros de RMN ^{13}C com uso de $\text{KCl } 0,03 \text{ mol L}^{-1}$. *Química Nova* 24, 131-132.

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002a) 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., Santos, G.A., Moraes, A.A., Olivares, F.L. e Rumjanek, V.M. (2000a) Avaliação das características de ácidos húmicos extraídos de resíduos urbanos I: métodos espectroscópicos (Uv-vis, IV, RMN ^{13}C -CP/MAS) e microscopia eletrônica de varredura. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 24, 741-750.

Canellas, L.P., Santos, G.A., Moraes, A.A. e Rumjanek, V.M. (2000b) Avaliação das características de ácidos húmicos extraídos de resíduos urbanos II: métodos termodegradativos (pirólise acoplada à cromatografia gasosa-espectrometria de massas). *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 24, 751-754.

Canellas, L.P., Santos, G.A., Sobrinho, M.B.A., Moraes, A.A. e Rumjanek, V.M. (1999) Adsorção de Cu^{2+} e Cd^{2+} em ácidos húmicos extraídos de resíduos orgânicos de origem urbana. *Ciência Rural* 29:21-26.

Canellas, L.P., Vellso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Guridi, F., Olivares, F.L., Santos, G.A., Bráz-Filho, R. (2002b) Distribution of humified fractions and characteristics of the humic acids of an ultisol under cultivation of eucalyptus

and sugar cane. *Terra* 20(4):371-381.

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang H., Casero P., Sandberg, G., Bennett, M.J. (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *TRENDS in Plant Science* 8:165-171.

Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M. (1977) Information provide on humic substances by E₄/E₆ ratios. *Soil Science of American Journal* 41:352-358.

Christian, M., Steffens, B., Schenck, D. e Lüthen, H. (2003) The *diageotropica* mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. *Planta* 218, 309–314.

Claussen, M., Lüthen, H. e Böttger, M. Inside or outside? Localization of the receptor relevant to auxin-induced growth. (1996) *Physiologia plantarum* 98, 861-867.

Cleland, R.E. (1995) Auxin and cell elongation. In *Plant hormones and their role in the plant growth development*, (ed. P. J. Davies), pp. 214-227. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.

Coulthup, N.B.; Daly, L.H.; Wiberley, S.E. (1964) Introduction to infrared and rmn spectroscopy. New York: Academic, 511p.

Conte, P., Piccolo, A. (1999) High pressure size exclusion chromatography (HPSEC) of humic substances. Molecular size, analytical parameters, and columns performance. *Chemosphere* 38:517–528.

Cosgrove, D.J. (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* 38,109-124.

- Cosgrove, D.J. (1998) Cell Wall Loosening by expansins, *Plant Physiology* 118, 333-339.
- Cozzolino, A., Conte, P. e Piccolo, A. (2001) Conformatinal changes of humic substances induced by some hydroxy, keto, and sulfonic acids. *Soil biology and biochemistry* 33, 563-571.
- Cunha, T.J.F., Canellas, L.P., Santos, G.A, Ribeiro, L.P. (2005) Fracionamento da matéria orgânica humificada em solos brasileiros. *In: Canellas, L.P., Santos, G.A., (eds.) Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, p. 66.
- Dell'Agnola G., Nardi, S. (1987) Hormone-like effect and enhanced nitrate uptake induced by depolycondensated humic fractions obtained from *Allolobofora* and *A. caliginosa* faeces. *Biol. Fertil. Soils* 4:115–118.
- De Michelis, M.I., Spanswick, R.M. (1986) H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corns roots. *Plant Physiology* 81:542-547.
- 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. e 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.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology* 116:1487-1495.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiology* 108:241-246.

- Fiske, C.F., Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375.
- Forgac, M. (1999) Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *The J. of Biol. Chem.* 274(19):12951-12954.
- Frías, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Culianez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8:1533-1544.
- Govindasmy, R., Chandrasekaran, S. (1992) Effect of humic substances on the growth, yield, and nutrient content of sugar cane. *The Science of Total Environment* 117/118:575-581.
- Guminski, S. (1968) Present days view on physiological effects induced in plant organisms by humic compounds. *Soviet Soil Science* 9:1250-1255.
- Hager, A., Menzel, H., Krauss, A. (1971) Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth. *Planta* 100:47-75.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta* 185:527-537.
- Hayes, M.H., Malcolm, R. (2001) Consideration of composition and aspects of the structures of humic substances. In: Hayes, M.H, Malcolm, R. (eds.) *Humic substances and chemical contaminants*. Madson: Soil Science Society of America, p. 3-39.

- Jahn T., Baluska F., Michalke, W., Harper, J.F., Volkman, D. (1998) Plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiologia Plantarum* 104:311-316.
- Johnston; C.T., Davies; W.M, Erickson; C., Delfeno; J.J. (1994) Characterization of humic substances using Fourier transform infrared spectroscopy. *In: Senesi, N., Miano, T.M. (eds.), Humic substances in the global environment and implications on human health.* New York: Elsevier Scientific Publ. Co., p. 145-152.
- Johnston; C.T.; Aochi, Y.O. (1996) Fourier transform infrared and rmn spectroscopy. *In: Spark, D.L. (ed.) Methods of soil analysis. Chemical methods.* Madison: American Society of Agronomy, p. 269-321.
- Katou, K., Okamoto, H. (1992). Symplast as a functional unit in plant growth. *Internatl. Rev. Cytol.* 142:263-304.
- Kogel-knaber, I., Zech, W., Hatcher, P.G. (1988) Chemical composition of the organic matter in forest soil II. The humus layer. *Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde* 151:331-340.
- Kononova, M.M. (1982) Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades e métodos de investigación. Barcelona: Oikus-Tou, 365p.
- Kononova, M.M. (1966) Soil organic matter. Pergamon press, p.364.
- Laskowski, M.J., Williams, M.E. Nusbaum, H.C., Sussex, I.M. (1995) Formation of lateral root-meristems is a 2-stage. *Process. Develop.* 121:3303-3310.
- Maeshima, M. (1990) Development of vacuolar membranes during elongation of

cells in mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 31:311-317.

Maeshima, M., Nakanishi, Y., Matsuura-Endo, C., Tanaka, Y., (1996) Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. *Journal of Plant Research* 109:119-125.

Maeshima, M., Yoshida, S. (1989) Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *Journal of Biology and Biochemistry* 264:20068-20073.

Maeshima, M. (2000) Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:37-51.

Maggioni, A., Varanini, Z., Nardi, S., Pinton, R. (1987) Action of soil humic matter on plant roots: Stimulation of ion uptake and effects on (Mg²⁺ K⁺) ATPase activity. *Sci. Tot. Envir.* 62:355–363.

Marty, F. (1999) Plant vacuoles. *The plant cell* 11:587-589.

Masciandaro, G., Ceccanti, B., Garcia, C. (1999) Soil agro-ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores.Technol.* 59:199–206.

Mato, M.C., Olmedo, M.G., Méndez, J. (1972) Inhibition of Indoleacetic acid-oxidase by soil humic acids fractioned on sephadex. *Soil Biology and Biochemistry* 4:469-473.

Meurer, E.J. (2000) *Fundamentos de química do solo*, pp. 174. Gênese, Porto Alegre.

Mielniczuck, J., Bayer, C., Vezzani, F.M., Lovato, T., Fernandes, F.F., Debarba, L. (2003) Manejo do solo e culturas e sua relação com estoque de carbono e nitrogênio do solo. *In: Curi et al., (eds.) Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa: SBCS, p. 209-248.

- Morsomme, P., Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica* 1465:1-16.
- Muscolo A., Bovalo F., Gionfriddo F. e Nardi S (1999) Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. Biochem.* 31:1303–1311.
- Muscolo, A. Cutrupi, S. e Nardi, S. (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biology and Biochemistry* 30:1199-1201.
- Napier, R.M, David, K.M., Penot-Rechenmann, C. (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant molecular biology* 49:339-348.
- Nardi, S., Panuccio, M.R., Abenavoli, M.R., Muscolo, A. (1994) Auxin-like effect of humic substances from faeces of allolobophora caliginosa and a. rosea. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1341-1346.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello A. (2002). Physiological effects of humic substances in higher plants. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1527-1537.
- 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.
- Nishi, T., Forgac, M. (2003) The vacuolar (H⁺)-ATPases – Nature`s most versatile proton pumps. *Nature* 3:94-103.
- Nurmi, J.T, Tratnyek P.G. (2002) Eletrochemical properties of natural organic matter (NOM), fractions of NOM, and model biogeochemical eletron shuttles. *Environmental Science technology* 36:617-624.

- O'Donnell, R.W. (1973) The auxin-like effects of humic preparations from leonardite. *Soil Science* 116:106-112.
- Orlov, D.S. (1975) Molecular parameters of humic acids. *Geoderma* 13:211-229.
- Orlov, D.S. (1998) Organic substances of Russian soils. *Eurasian Soil Science* 31:946-953.
- Ozolina, N.V., Pradedova, E.V., Salyaev, R.K. (1996) Phytohormone effects on hydrolytic activity of phosphohydrolases in red beet (*Beta vulgaris* L.) tonoplasts. *Plant Growth Regulation* 19:189-191.
- Piccolo, A., Conte, P., Cozzolino, A. (1999) Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular associations of dissolved humic substances. *European Journal of Soil Science* 50:687-694.
- Piccolo, A. (1996) Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. *Chemosphere* 33:595-600.
- Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy* 75:57-133.
- Pinton, R., Cesco, S., Santis., Varanini Z. (1997) Soil humic substances release by intact oat seedling roots. *Journal of Plant Nutrition*, 20:857-869.
- Pinton, R.; Varanini Z.; Vizzoto G., Maggioni A. (1992) Soil humic substances affect transport-properties of tonoplasto vesicles isolated from oat roots. *Plant and Soil*, 142:203-210.
- Pizzeghello, D., Nicolini, G., Nardi, S., (2002) Hormone-like activities of humic substances in different forest ecosystems. *New Phytologist* 155:393–402.
- Pizzeghello, D., Nicolini, G., Nardi, S. (2001) Hormone-like activity of humic

substances in *Fagus sylvaticae* forests. *New Phytologist* 151:647–657.

Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S., (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 55:803-813.

Rayle, D.L., Cleland, R. (1972) In-vitro acid-growth response-relation to in-vivo growth responses and auxin action. *Planta* 104:282-296.

Rayle, D.L., Cleland, R. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99:1271-1274.

Rea, P. A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia plantarum* 71:131-141.

Ruck, A., Palme, K., Venis, M. A., Napier, R. M., Felle, R. H. (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin-binding protein in the auxin stimulation of plasma-membrane current in *Zea mays* protoplasts. *Plant Journal* 4:41-46.

Salyaev, R.K., Ozolina, N.V., Pradedova, E.V. (1999) Effects of exogenous phytohormones and kinetin on the hydrolytic activity of proton pumps in the tonoplast of red beet at different stages of plant development. *Russian J. Plant Physiol.* 46(1):1-4.

Schnitzer, M., Skinner, S.I.M. (1982) Organic matter characterization. In *Method of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Mineralogical Properties* (eds American Society of Agronomy/Soil Science Society of America Agronomic Monograph), pp. 581–597. ASA/SSSA Publishers, Madison, USA.

Schnitzer, M., Gupta, U. C. (1965) Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 27:274-277.

Schnitzer, M. (1991) Soil organic matter: the next 75 years. *Soil Science* 151:41-

58.

- Singh, R.B. (2000) Environmental consequences of agricultural development: a case study from the green revolution state of Haryana, India. *Agriculture Ecosystems and Environment* 82, 97-103.
- Steffens, B.; Feckler, C.; Palme, K.; Christian, M.; Böttger, M., Lüthen, H. (2001) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *The Plant Journal* 27, 591-599.
- Stevenson, F.J. (1994) Biochemistry of the formation of humic substances. In Stevenson, F.J. (ed.) *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*, 2^o ed. New York: John Wiley e Sons Inc., p 188–211.
- Struyk, Z., Sposito, G. (2001) Redox properties of standard humic acids. *Geoderma* 102:329-346.
- Sze, H. (1985) H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annual Review of Plant Physiology* 36:113-122.
- Sze, H., Ward, J. M., Lai, S., Perera, I. (1992) Vacuolar-type H⁺-translocating ATPases in plant endomembranes: subunit organization and multigene families. *Journal of Experimental Biology* 172:132-135.
- Taiz, L., Zeiger, E., (2002) *Plant Physiology*, Massachusetts: Sinauer Associates, 690 p.
- Taiz, L. The plant vacuole (1992) *Journal of Experimental Biology* 172:113-122.
- Tomic, S., Gabdoulline, R.R., Kojic'-Prodic', B., Wade, R.C. (1998) Classification of auxin plant hormones by interaction property similarity indices. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 12:63–79.
- Tu, S., Naghashi, G., Brouillette J.N (1987) Proton pumping kinetics and origin of

nitrate inhibition of tonoplast-type H⁺-ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 256(2):625-637.

Wang, Y., Leigh, R.A., Kaestner, K.H., Sze, H. (1986) Eletrogenic H⁺-pumping pyrophosphatase in tonplast vesicles of oat roots. *Plant Physiology* 81:497-502.

Went, F.W. (1928) Wushstoff und wachstum *Rec. Trav. Need.* 25:1-116.

Varanini, Z., Pinton, R., De Biase, M.G., Astolfi, S., Maggioni, A. (1993) Low molecular weight humic substances stimulate H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant and Soil* 153:61-69.

Vaughan, D., Malcom, R. E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological process. *In: Vaughan, D., Malcom, R. E. (eds.), Soil Organic Matter and Biological Activity.* Dordrecht: Kluwer Academic, p. 37-75.

Vaughan, D., Malcom, R. E, Ord, B. C. (1985) Influence of humic substances on biochemical processes in plants. *In: Vaughan, D., Malcom, R. E. (eds.), Soil Organic Matter and Biological Activity,* Dordrecht Kluwer Academic, p. 78-108.

INIBIDORES DE AUXINA ALTERAM A AÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS SOBRE PLÂNTULAS DE MILHO

RESUMO

Os ácidos húmicos (AH) exibem atividade do tipo auxínica, mas o mecanismo de ação envolvido no estímulo do desenvolvimento vegetal ainda não é claro. Estudos recentes demonstraram que essas substâncias húmicas (SH) são responsáveis pelo aumento da atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP) e pelo crescimento radicular. No presente trabalho, foi mostrado que o efeito de SH de massa molecular aparentemente elevada (eg. AH) é reduzido por um inibidor da via de sinalização de auxina [PCIB (*p*-ácido clorofenoxisobutírico)]. O inibidor de efluxo de auxina TIBA (ácido 2,3,5-triidobenzóico) reduziu os efeitos produzidos pelos AH em menor proporção quando comparado ao PCIB. Foi evidenciado que os AH estimulam o desenvolvimento radicular de maneira semelhante à concentração 10⁻¹⁰ M de ácido indol-3-acético (AIA), porém com maior intensidade. Existe uma conexão entre os efeitos promovidos pelos AH, pela auxina e inibidores sobre a H⁺-ATPase de MP e a emissão inicial de raízes laterais. Os resultados sugerem que o efeito estimulatório dos AH sobre as raízes de plântulas de milho está associado à via

de sinalização de auxina.

ABSTRACT

Humic acids (HA) are known as a putative auxin (indole acetic acid, IAA), although the mechanism of action of HA-mediated stimulation of plant development remains unclear. Recent studies indicate those humic substances (SH) as responsible for enhancement of plasma membrane (PM) H⁺-ATPase activity and root growth. In the present work, we showed that high molecular size HA effects on maize root development are impaired by an auxin-signalling pathway inhibitor [PCIB (*p*-Chlorophenoxyisobutyric acid)]. The efflux AIA inhibitor TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid) also decreased HA effects to a lesser extent. It was found that HA causes root development similar, but higher than AIA 10⁻¹⁰ M. There is a connection with the stimulus and inhibition on PM H⁺-ATPase activity and earliest stages of lateral root development promoted by HA and IAA inhibitors. These results suggest that stimulatory effect of HA on maize roots are associated to auxin-signalling pathway.

1. INTRODUÇÃO

Desde o início do século XX, sugeriu-se uma ação do tipo hormonal dos ácidos húmicos (AH) sobre o desenvolvimento vegetal (Bottomley, 1917). Vários trabalhos confirmaram essa proposta, relacionando os efeitos das substâncias húmicas (SH) com fitormônios, principalmente a auxina (Guminski, 1968; O'Donell, 1973; Dell'Agnola e Nardi, 1987; Muscolo *et al.*, 1999; Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004). A auxina está envolvida potencialmente em todos os passos do desenvolvimento e crescimento vegetal (Went, 1928; Davies, 1995).

Apesar da importância da auxina para as plantas, vários aspectos do mecanismo de ação e sinalização ainda não estão elucidados (Leyser, 2002). Foi observado que o ácido indol-3-acético (AIA) - a forma mais comum de auxina encontrada na natureza - pode aumentar a síntese de H⁺-ATPases de membrana plasmática (MP), ativando a acidificação do apoplasto (Hager *et al.*, 1991; Frías *et al.*, 1996). O aumento da plasticidade da parede celular, necessário para o alongamento celular, por sua vez, é mediado por proteínas (e.g. expansinas) que atuam em pH menor que 4,5 (Cosgrove, 1998). Tais descobertas fundamentaram a teoria do crescimento ácido proposta anos antes por Rayle e Cleland (1972). O mecanismo do crescimento ácido postula que o crescimento celular induzido por AIA estaria diretamente relacionado com a acidificação do apoplasto provocada pelo aumento da atividade da H⁺-ATPase (Cleland, 1995). Canellas *et al.* (2002) demonstraram o aumento da síntese de H⁺-ATPase de MP isoladas de raízes de milho e sua relação com a presença nos AH de grupamentos semelhantes ao AIA. Quaggiotti *et al.* (2004) confirmaram esses resultados.

Muitos aspectos do processo de sinalização da auxina ainda não são conhecidos. Existem várias evidências da existência de uma proteína receptora para AIA no lado externo da membrana plasmática conhecida como ABP1 (*auxin binding protein*) (Ruck *et al.*, 1993; Napier *et al.*, 2002). Por outro lado, foi também descrito um receptor intracelular sensível a presença de auxina (Vesper e Kuss, 1990; Claussen *et al.*, 1996). Yamagami *et al.* (2004) indicam a via independente de ABP1 como a mais provavelmente envolvida no controle do crescimento em casos de concentrações endógenas de AIA. Além disso, estudos com tomate mutante *diageotropica* (*dgt*) sugerem ser bastante plausível a funcionalidade de receptores tanto intra como extracelulares (Christian *et al.*, 2003). De qualquer forma, o papel do ABP1 na via de sinalização da auxina não tem sido determinado. Aspectos da transcrição relacionados à auxina que são melhor compreendidos. O fator de resposta à auxina (*ARF*) e as proteínas Aux/AIA estão envolvidos nesse processo (Guilfoyle, 1998). Na presença de auxina, ocorre a destruição das proteínas Aux/AIA, permitindo a ligação dos *ARFs* nos promotores de resposta à auxina (*AuxREs*), ativando a transcrição de genes induzidos por auxina. Gray *et al.* (2001) relataram que a auxina poderia promover a degradação das Aux/AIA através da proteína ubiquitina ligase SCF^{TIR1}. Estudos recentes indicam que o *TIR1* (*Transport Inhibitor Response-1*) é um receptor de auxina que

media a degradação de *Aux/AIA* e a transcrição regulada por auxina.

Com a finalidade de estudar a ação do tipo auxínica dos AH isolados de vermicomposto sobre o crescimento radicular e sobre a atividade da H⁺-ATPase de MP, foram utilizados, neste trabalho, dois tipos de inibidores de AIA: o ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) e o ácido *p*-clorofenoxisobutírico (PCIB). O TIBA é um inibidor do efluxo de AIA (Lomax *et al.*, 1995). O PCIB é um inibidor bastante específico, que atua na via de sinalização de AIA, bloqueando a transcrição de genes induzidos por AIA (Oono *et al.*, 2003).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção, isolamento e purificação dos ácidos húmicos

Os ácidos húmicos foram obtidos de vermicomposto (AHV). O procedimento de extração dos AH foi realizado conforme a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (Schnitzer e Skinner, 1982). Resumidamente, foi utilizado NaOH 0,5 mol L⁻¹ como solvente na razão solvente: resíduo orgânico de 1:10 (v:v) em atmosfera inerte de N₂. A separação dos AH foi realizada com o abaixamento do pH da solução até 1,5 com HCl 6 mol L⁻¹. A redissolução e precipitação foi repetida três vezes. Em seguida, adicionaram-se 200 mL de solução aquosa diluída de HF e HCl [5 mL HCl (12 M) + 5 mL HF (48 %) L⁻¹]. Após uma centrifugação (5.000 *g*) por 15 minutos, os AH foram lavados seguidamente com água, até teste negativo com AgNO₃. Foi realizada a diálise contra água deionizada, usando-se uma membrana 12-14 KDa (*Thomas Scientific Inc.*). As amostras dialisadas foram liofilizadas e caracterizadas quimicamente.

2.2. Crescimento e tratamento das plântulas de milho

Sementes de milho (*Zea mays* L., var UENF 506-6), obtidas no Laboratório de Fitotecnia da UENF, foram esterilizadas através da imersão numa solução de NaClO 1.0% por 30 minutos e, depois, colocadas em água destilada por um período de seis horas após a lavagem. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em papel, para germinação no escuro, a 28°C. Quatro dias após a germinação das sementes de milho, as plântulas foram transferidas para um meio mínimo contendo CaCl₂ 2 mM suplementado com AHV, na concentração de 20 mg C L⁻¹ ou auxina (10⁻¹⁰ M, Sigma Co.) com ou sem os inibidores TIBA (20 µM) e PCIB (400 µM) (Sigma-Aldrich). O pH da solução foi ajustado para 6,0. Após cinco dias de crescimento nessas soluções, as plântulas foram coletadas e avaliadas. O meio mínimo (CaCl₂ 2 mM) é utilizado a fim de evitar qualquer influência dos nutrientes, que poderiam funcionar de maneira sinérgica com os AH, estimulando o desenvolvimento radicular e o metabolismo das plântulas (e.g. Pinton *et al.*, 1999).

2.3. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições por tratamento, cujo modelo matemático pode ser descrito como: $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$, onde: Y_{ij} = resposta experimental medida na unidade experimental j submetida ao tratamento i; μ = média geral; t_i = efeito relativo ao tratamento i; e_{ij} = erro aleatório.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para a avaliação de todas as características. A diferença entre os tratamentos foi determinada pelo Teste de Média Tukey ($P < 0,05$).

2.4. Avaliação do crescimento radicular

Após cinco dias em solução, as plântulas foram coletadas para avaliação da área radicular e comprimento total (soma do comprimento da raiz primária e raízes laterais), utilizando-se o programa computacional para análise digital de imagens *DeltaT-Scan*TM (8 plantas por tratamento). Essa mesma amostra de

raízes foi pesada após 72 horas, em estufa com ventilação forçada a 65° C, utilizando-se balança analítica para determinação da massa seca. Outra amostra de raízes foi coletada, e os sítios de mitose e raízes emergidas foram analisados individualmente (5 plantas por tratamento), como descrito em Canellas *et al.* (2002). A terceira amostra de raízes foi coletada e usada imediatamente para o isolamento de vesículas, como descrito no item 2.5.

2.5. Purificação das vesículas de membrana plasmática

As vesículas de MP foram isoladas de raízes de plântulas de milho crescidas em meios com ou sem 20 mg C L⁻¹ de AH isolado de vermicomposto ou AIA com ou sem os inibidores TIBA (20 µM) e PCIB (400 µM), utilizando a centrifugação diferencial como descrito por De Michelis e Spanswich (1986), com algumas modificações (Façanha e De Meis, 1995). Resumidamente, 10 g (massa fresca) de raízes de milho foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 20 mL de meio de extração gelado contendo 250 mM de sacarose, 10% de glicerol (m:v), 0,5% de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético), 0,2% de BSA (Albumina Sérica Bovina) (m:v) e 0,1 M de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano] -HCl, pH 8,0. As soluções-estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso, foram adicionados 150 mM de KCl, 2 mM de DTT (ditiotreitól) e 1 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). Na manipulação das raízes até a obtenção do homogenato, bem como nas centrifugações, a temperatura foi controlada a fim de que não excedesse 4°C. Além disso, o pH do tampão de extração também foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,5-8,0. Após a maceração, o homogenato resultante foi filtrado por meio de quatro camadas de gaze e submetido a centrifugação numa centrífuga himac CP (HITACHI) a 8.000 g durante 15 minutos, para a remoção de células não-rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 g por 15 minutos, numa ultracentrífuga himac CP 85b (HITACHI) utilizando o rotor P70 para o isolamento das mitocôndrias. O precipitado foi coletado e ressuspensionado em 1 mL de solução-tampão (meio de ressuspensão: glicerol 15% (v:v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 mM de Tris-HCl pH 7,6 e EDTA 1 mM) e armazenado em *freezer* a -70°C. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação, agora a

100.000 g por 40 minutos. O precipitado dessa nova centrifugação, denominado fração microssomal, foi ressolubilizado em meio de ressuspensão, para imediata aplicação sobre o gradiente de sacarose. Aplicou-se 1 mL da suspensão contendo a fração microssomal sobre um gradiente descontínuo bifásico de sacarose (cada camada com volume de 1,5 mL) nas concentrações de 25/45% (m/m), contendo ainda: Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM. O gradiente foi submetido a uma centrifugação de 100.000 g num rotor SW40 (Himac), durante 90 minutos (ultracentrífuga himac CP 85b). Após a centrifugação, as vesículas entre as camadas 25 e 45% (MP) foram coletadas e utilizadas imediatamente, ou congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -70°C antes do uso. A concentração de proteína total contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

2.5.1. Determinação da atividade ATPásica de membrana plasmática

A atividade ATPásica foi determinada pela medida da liberação de Pi segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada mediante a adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10% (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada com a adição de 0,5 mL da mistura contendo molibdato de amônio 2% em H₂SO₄ 2% + ácido ascórbico 1% (100:1) e, após 15 minutos, foi efetuada a leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Composição do meio de reação: 50 mM de Mops-Tris pH 6,5, 3 mM de MgCl₂, 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 50 µg de proteína. Cerca de 80-95% da atividade da H⁺-ATPase das vesículas medida foi inibida por 0,2 mM de vanadato, um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (De Michelis e Spanswick, 1986). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase foi medida a 30 °C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída à ATPase do tipo P.

2.5.2. Bombeamento de H⁺ da ATPase de membrana plasmática

O gradiente eletroquímico de H⁺ gerado pela H⁺-ATPase de MP foi estimado pelo decréscimo de fluorescência da sonda sensível a pH 9-amino-6-

cloro-2-metoxiacridina (ACMA) (415/485 nm excitação/emissão), e expressa em porcentagem. O meio de reação foi composto de 10 mM de Mops-Tris (pH 6,5), 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, ACMA 2 μM e 50 μg de proteína. A reação foi desencadeada pela adição de ATP (1 mM). A adição, tanto 3 de μM FCCP quanto de 2 μM NH₄Cl, acabou com o gradiente de H⁺ formado pela hidrólise de ATP.

3. RESULTADOS

3.1. Comprimento total, área superficial e massa das raízes secas

As plântulas de milho tratadas com ácidos húmicos isolados de vermicomposto (AHV) na concentração de 20 mg C L⁻¹ e com auxina (AIA) na concentração de 10⁻¹⁰ M estimularam o crescimento das raízes, proporcionando incrementos no comprimento total, na área e na massa seca (Figuras 1A, 1B e 1C). Os inibidores de AIA, tanto o TIBA como o PCIB, alteraram os efeitos de promoção de crescimento das raízes. O comprimento total e a área superficial das raízes foram estimulados em mais de 40% pelos AHV e em cerca de 20% pelo AIA (10⁻¹⁰ M) em relação ao controle (C). O uso do inibidor PCIB na presença de AHV e AIA reduziu essas características, em média, 75%. A inibição foi de 90% nas plântulas de milho tratadas somente com PCIB (CP). O aspecto visual das plântulas pode ser observado na Figura 2.

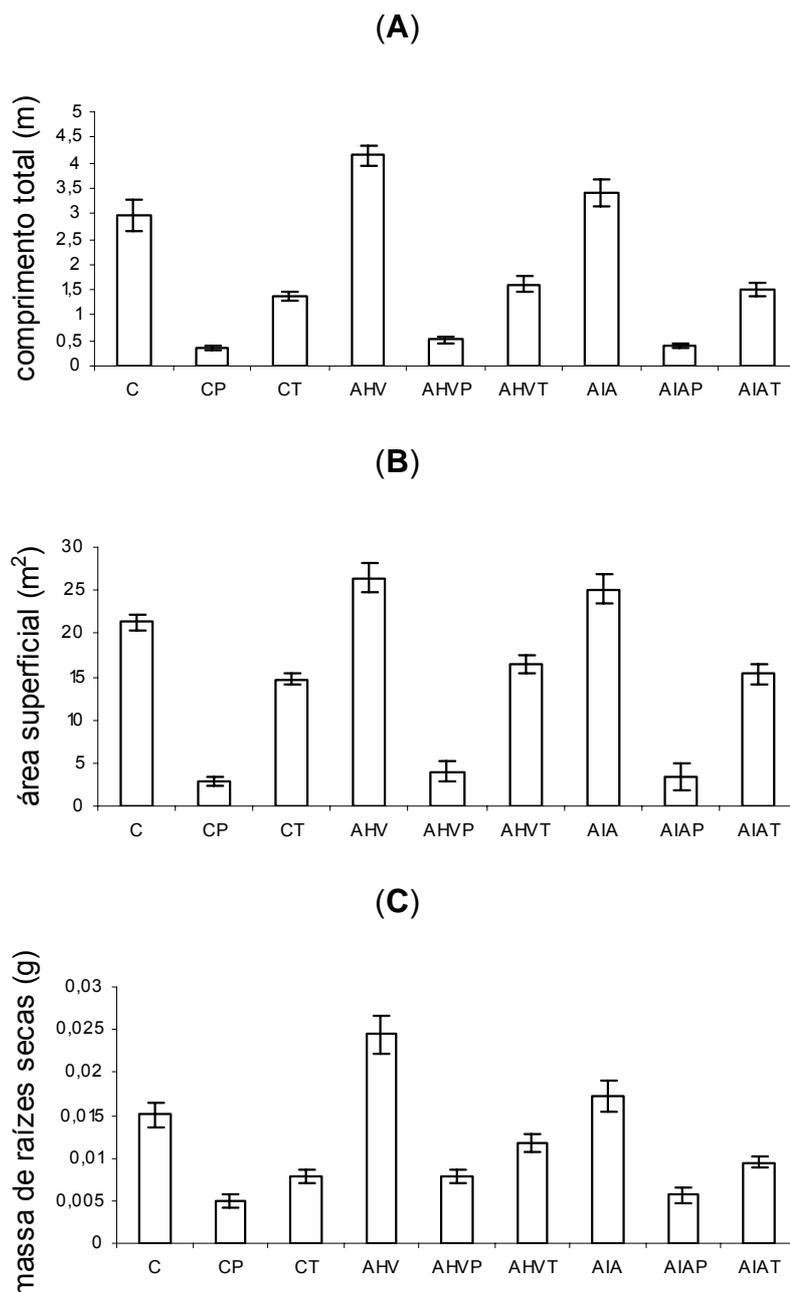


Figura 1. Efeito de ácidos húmicos na concentração de 20 mg C L⁻¹ (AHV), de ácido indol-3-acético 10⁻¹⁰ M (AIA) e dos inibidores de AIA: controle + PCIB (CP); controle + TIBA (CT); AIA + PCIB (AIAP); AIA + TIBA (AIAT); AHV + PCIB (AHVP) e; AHV + TIBA (AHVT) sobre o comprimento total (A), área (B) e massa seca radicular (C) de plântulas de milho tratadas por 5 dias. Os dados representam a média de 8 repetições por tratamento ± erro-padrão. Todas as colunas são diferentes, estatisticamente, pelo Teste de Tukey $P < 0,05$.



Figura 2. Aspecto visual das raízes de plântulas de milho tratadas com 20 mg C L^{-1} (AHV), ácido indol-3-acético 10^{-10} M (AIA) e inibidores: controle + PCIB (CP); controle + TIBA (CT); AIA + PCIB (AIAP); AIA + TIBA (AIAT); AHV + PCIB (AHVP) e; AHV + TIBA (AHVT) durante 5 dias.

3.2. Freqüência de sítios de mitose e emergência de raízes laterais

Avaliou-se a proliferação dos sítios de mitose (SM) e raízes emergidas (RE) em plântulas de milho tratadas ou não por cinco dias, com 20 mg C L⁻¹ de AHV ou AIA, na presença de inibidores de AIA (Figura 3). Foi observada uma diminuição nos SM de 41, 42 e 58% nos tratamentos CT, AHVT e AIAT quando utilizado TIBA, ao passo que a inibição foi quase duas vezes maior na presença de PCIB nos tratamentos AHVT e AIAT. As RE foram inibidas em 54, 79 e 86% nos tratamentos CT, AHVT e AIAT quando utilizado TIBA. A adição de PCIB provocou uma inibição de cerca de 90% nos tratamentos AHVP e AIAP, em média, e de 64% no tratamento CP. O tratamento AHV, assim como o AIA, estimulou essas características.

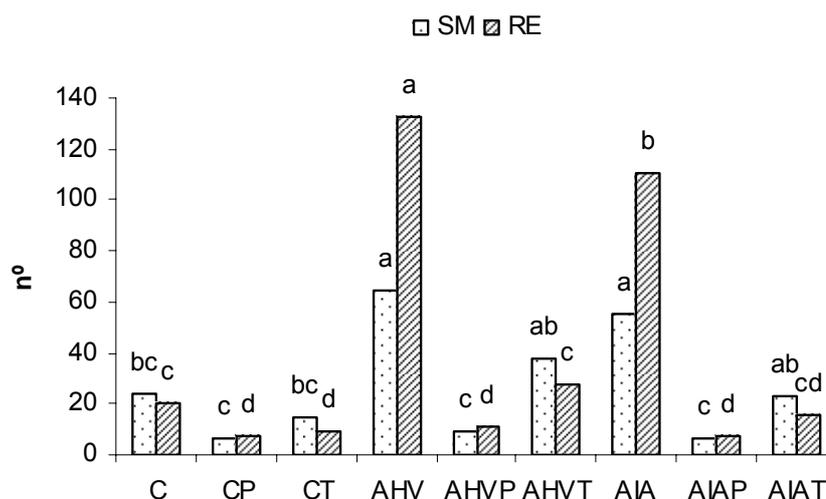


Figura 3. Efeito de ácidos húmicos na concentração de 20 mg C L⁻¹ (AHV), de ácido indol-3-acético 10⁻¹⁰ M (AIA) e dos inibidores: controle + PCIB (CP); controle + TIBA (CT); AIA + PCIB (AIAP); AIA + TIBA (AIAT); AHV + PCIB (AHVP) e; AHV + TIBA (AHVT) sobre o número de sítios de mitose (SM) e raízes laterais emergidas (RE) em plântulas de milho tratadas por cinco dias. Os dados representam a média de cinco repetições por tratamento ± erro-padrão. As colunas com letras iguais não são diferentes, estatisticamente, pelo Teste de Tukey $P < 0,05$.

3.3. Efeitos dos ácidos húmicos e auxina sobre H⁺-ATPase de membrana plasmática

As vesículas de MP isoladas das raízes de plântulas de milho tratadas por cinco dias com 20 mg C L⁻¹ ou AIA 10⁻¹⁰ mol L⁻¹ exibiram um estímulo claro das atividades ATPásica sensível ao ortovanadato de sódio, assim como a formação de um gradiente de H⁺ dependente de ATP, medido pela queda da fluorescência da sonda ACMA. O estímulo sobre a hidrólise de ATP promovido H⁺-ATPase de MP nos tratamentos AHV e AIA em relação ao controle foi de cerca de 110 e 55%, respectivamente. A presença de TIBA não alterou significativamente a hidrólise em relação ao controle. Por outro lado, o PCIB reduziu em cerca de 45% a atividade de hidrólise. O gradiente de H⁺ dependente de ATP foi estimulado na mesma proporção da atividade de hidrólise na maioria dos tratamentos, com exceção daqueles nos quais TIBA foi adicionado (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de ácidos húmicos na concentração de 20 mg C L⁻¹ (AHV), de ácido-3-indol acético 10⁻¹⁰ M (AIA) e dos inibidores: controle + PCIB (CP); controle + TIBA (CT); AIA + PCIB (AIAP); AIA + TIBA (AIAT); AHV + PCIB (AHVP) e AHV + TIBA (AHVT) sobre a H⁺-ATPase MP. A atividade Vanadato sensível de hidrólise de ATP foi medida em vesículas de MP isoladas de raízes de milho tratadas ou não por 5 dias. Os valores representam a média de 3 repetições ± erro padrão da média.

| Tratamentos | H ⁺ -ATPase de MP | | |
|-------------|---|------------------------------|-----------|
| | Atividade de hidrólise <i>μmol Pi mg⁻¹ min⁻¹</i> | Transporte de H ⁺ | |
| | | V ₀ (% / min.) | ΔF (%) |
| C | 0,47 ± 0,04 | 3,29 | 7,06 |
| CP | 0,25 ± 0,02 | 2,35 | 3,50 |
| CT | 0,37 ± 0,05 | 2,60 | 5,88 |
| AHV | 0,97 ± 0,10 | 14,35 | 27,05 |
| AHVP | 0,28 ± 0,04 | 2,35 | 3,65 |
| AHVT | 0,49 ± 0,06 | 8,24 | 15,30 |
| AIA | 0,72 ± 0,05 | 9,65 | 21,18 |
| AIAP | 0,27 ± 0,06 | 2,35 | 3,55 |
| AIAT | 0,47 ± 0,05 | 8,24 | 15,29 |

4. DISCUSSÃO

A promoção do desenvolvimento radicular por SH tem sido tema de diversos trabalhos. A relação entre a bioatividade e as características químicas das SH é bastante difícil de ser estabelecida em função da sua complexidade, heterogeneidade e aspectos estruturais indeterminados, que resultam em resultados conflitantes (Vaughan *et al.*, 1985). Pouca atenção tem sido dedicada à possibilidade de SH serem absorvidas pelas plantas. Foi demonstrado que AH podem ser absorvidos lentamente ao longo do tecido vascular corando a parede das células do parênquima, embora não tenha sido demonstrado como as raízes poderiam absorver os AH (Prat, 1963). Utilizando SH marcadas com ^{14}C , Führ e Sauberbeck (1967) relataram que o material húmico radioativo é estável o suficiente para produzir resultados confiáveis na maioria dos sistemas experimentais. A detecção de radioatividade nos tecidos expostos a AH marcados indica que eles podem ser absorvidos diretamente. Não está claro se o material absorvido representa uma unidade estrutural intacta de AH ou se são somente fragmentos (embora marcados) resultantes da ação microbiana. Vaughan e Linehan (1976) confirmaram os resultados de Führ e Sauberbeck (1967). Canellas *et al.* (2005) providenciaram evidências adicionais da absorção de AH através da produção de anticorpos marcados anti-AH. Não foi possível determinar, no entanto, como os AH podem acessar o interior da célula. Por outro lado, a ação estimulatória de moléculas de baixa massa molecular (e.g. ácidos fúlvicos) foi demonstrada por Schnitzer e Poapst (1967). Esses autores trataram plantas com derivados húmicos acetilados e observaram que a iniciação de raízes pode dever-se à presença de grupos fenólicos nas SH. Outros trabalhos propuseram que SH de baixa massa molecular poderiam estimular diretamente o crescimento radicular de maneira semelhante à auxina (O'Donnell, 1973; Cacco e Dell'Agnola, 1984; Nardi *et al.*, 1994).

Os AH foram descritos inicialmente como substâncias de elevada massa molecular originadas da transformação de biopolímeros do solo (Schnitzer, 1991). Esse conceito tem sido revisado ultimamente em função de uma série de evidências experimentais. Foi sugerido que os AH resultam da associação

hidrofóbica de pequenos agregados formando um arranjo supra-estrutural com aparente elevada massa molecular (Orlov, 1975; Piccolo 2002; Simpson, 2002). Pequenas unidades portadoras de bioatividade podem se desagregar do arranjo supra-estrutural e acessar receptores específicos (intra ou extracelulares).

A presença dos inibidores de auxina modificou o desenvolvimento radicular promovido pelos AH extraídos de vermicomposto (AHV). Tanto os AHV como o AIA afetaram a morfologia das plântulas de milho, aumentando o comprimento total e a área superficial das raízes, os sítios de mitose e a atividade da H^+ -ATPase de MP (Figuras 1,2 e 3; Tabela 1). O uso de inibidores bloqueou o efeito de promoção do desenvolvimento radicular observado com o uso de AHV e AIA. Oono *et al.* (2003), num estudo com raízes de *Arabidopsis*, também verificaram a ação de PCIB e TIBA no bloqueio da ação da auxina. As células meristemáticas localizadas na zona de alongamento da raiz são formadoras de sítios de mitose precursores de raízes laterais ricos em H^+ -ATPases de MP (Jahn *et al.*, 1998). Tanto os AHV quanto o AIA promoveram a indução de sítios de mitose (SM) e emissão de raízes laterais (RE) nessa zona (Figura 2). Esse processo de diferenciação celular foi reduzido pelos inibidores de auxina; também nesse caso, o efeito do PCIB foi o mais pronunciado. Oono *et al.* (2003) relataram que o PCIB inibe a emergência de raízes laterais e a atividade da *BA::β*-glucuronidase (GUS) induzidas por auxina exógena. Tomados em conjunto, os resultados observados na literatura e neste trabalho sugerem que a relação entre o estímulo sobre os SM e RE e a atividade de da H^+ -ATPase de MP poderia estar envolvida no efeito do tipo auxínico dos AH.

Nardi *et al.* (1994) demonstraram que o efeito de SH de pequena massa molecular sobre a iniciação de raízes em folhas de *Nicotiana plumbaginifolia* foi inibido por TIBA, mas não por PCIB. Somente a aplicação isolada de PCIB reduziu a formação de raízes. É provável que ocorram interações químicas entre os referidos inibidores e as SH utilizadas, que, conseqüentemente, poderiam gerar respostas pouco claras. Esses autores sugeriram que a ação do tipo auxínica das SH deveu-se à combinação de pequena massa molecular e elevada acidez carboxílica. Entretanto, de acordo com vários autores, o tamanho molecular das SH pode ser um fato resultante de um arranjo supra-estrutural de apenas aparente massa molecular elevada (Orlov, 1975; Piccolo *et*

al., 1996, 1999; Conte e Piccolo, 1999). Concentrações pequenas de ácidos orgânicos podem romper esse arranjo de maneira reversível (Nardi *et al.*, 2002; Cozzolino *et al.*, 2001). Façanha *et al.* (2002), relataram que exsudatos liberados por raízes de milho modificam a conformação de AH, ao observarem forte mudança na cromatografia de soluções de AH após o cultivo das plantas; portanto, a aparente massa molecular elevada dos AH não seria a principal razão de sua atividade biológica. No presente trabalho, foi comprovado que o PCIB reduz significativamente os efeitos dos AH sobre os estádios iniciais do desenvolvimento das raízes, sugerindo que subunidades AH-AIA podem influenciar a fisiologia radicular regulada por auxina.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os ácidos húmicos (AH) exibem atividade do tipo auxínica, mas o mecanismo de ação envolvido no estímulo do desenvolvimento vegetal ainda não é claro. Estudos recentes demonstraram que essas substâncias húmicas (SH) são responsáveis pelo aumento da atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP) e pelo crescimento radicular. Neste trabalho, foi mostrado que o efeito de SH de elevada massa molecular (AH) é reduzido por inibidor da via de sinalização de auxina [PCIB (*p*-ácido clorofenoisobutírico)]. O inibidor de efluxo de auxina TIBA (ácido 2,3,5-triidobenzóico) reduziu os efeitos produzidos pelos AH em menor proporção, comparado ao PCIB. Foi evidenciado que os AH estimulam o desenvolvimento radicular de maneira semelhante à concentração 10⁻¹⁰ M de auxina, porém com maior intensidade. Existe uma conexão entre os efeitos promovidos pelos AH, pela auxina e inibidores sobre a H⁺-ATPase de MP e a emissão inicial de raízes laterais. Os resultados indicam que: o efeito estimulatório dos AH sobre as raízes de plântulas de milho está associado à via de sinalização de auxina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bottomley, W.B. Some effects of organic-promotion substances (auximones) on the growth of *Lema minor* in mineral cultural solutions. Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences, 89:481-505, 1917.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Cacco, G., Dell’Agnola, G., (1984) Plant growth regulator activity of soluble humic complexes. *Can. J. Soil Sci.* 64:225–228.
- Canellas, L.P., Guridi, F., Santos, G. A., Rumjanek, V.M., Braz-Filho, R. Aumento da resolução de espectros de RMN ^{13}C com uso de KCl 0,03 mol L $^{-1}$. *Química Nova*, 24:131-132, 2001.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002a) 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., Zandonadi, D.B., Medice, L.O., Peres, L.E.P., Olivares, F.L., Façanha, A.R. (2005) Bioatividade de substâncias húmicas – ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas. *In*: Canellas, L.P., Santos, G.A., (eds.) *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, p. 238-239.
- Christian, M., Steffens, B., Schenck, D., Lüthen, H. (2003) The *diageotropica* mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. *Planta* 218:309–314.

- Claussen, M., Lüthen, H., Böttger, M. Inside or outside? Localization of the receptor relevant to auxin-induced growth. (1996) *Physiologia plantarum* 98:861-867.
- Cleland, R.E. (1995) Auxin and cell elongation. In: Davies, P.J. (ed.) *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology* The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 214-225.
- Conte, P., Piccolo, A. (1999) High pressure size exclusion chromatography (HPSEC) of humic substances. Molecular size, analytical parameters, and columns performance. *Chemosphere* 38:517–528.
- Cosgrove, D.J. (1998) Cell Wall Loosening by expansins, *Plant Physiology* 118:333-339.
- Cozzolino, A., Conte, P., Piccolo, A. (2001) Conformatinal changes of humic substances induced by some hydroxy, keto, and sulfonic acids. *Soil biology and biochemistry* 33:563-571.
- Davies, P.J. (1995) The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: Davies, P.J. *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 1-12.
- Dell’Agnola G., Nardi, S. (1987) Hormone-like effect and enhanced nitrate uptake induced by depolycondensated humic fractions obtained from *Allolobofora* and *A. caliginosa* faeces. *Biology and Fertility of Soils* 4:115–118.
- De Michelis, M.I. e Spanswick, R.M. H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corns roots. *Plant Physiology*, 81:542-547, 1986.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiology* 108:241-246.

- Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz-filho, R., Oliveira, M.A. Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37:1301-1310.
- Fiske, C.F., Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375.
- Frías, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Culianez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8:533-1544.
- Führ, F., Sauerbeck, D. (1967) The uptake of colloidal organic substance by plant roots as shown by experiments with ¹⁴C-labelled humic compounds. *In: IAEA. Isotopes in plant nutrition and physiology.* Viena: IAEA, p.317-328.
- Guifoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., Murfet, J. (1998) How does auxin turn on genes? *Plant physiology* 118:341-347.
- Guminski, S. (1968) Present days view on physiological effects induced in plant organisms by humic compounds. *Soviet Soil Science* 9:1250-1255.
- Gray, W.M., Kenpiski, S., Rouse, D., Leyser, O., Estelle, M. (2001) Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/AIA proteins. *Nature* 414:271-276.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta* 185:527-537.
- Jahn, T., Baluska, F., Michalke, W., Harper, J.F., Volkmann, D. (1998) Plasma

membrane H⁺-ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiologia Plantarum* 104:311-316.

Leyser, O. (2002) Molecular genetics of auxin signaling *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:377–98.

Lomax, T.L., Muday, G.K., Rubery, P.H. (1995) Auxin transport. In: Davies, P.J. (ed.) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.509–530.

Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F., Nardi, S. (1999) Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil. Biol. Biochem.* 31:1303–1311.

Napier, R.M, David, K.M., Penot-Rechenmann, C. (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant molecular biology* 49:339-348.

Nardi, S., Panuccio, M.R., Abenavoli, M.R., Muscolo, A. (1994) Auxin-like effect of humic substances from faeces of allolobophora caliginosa and a. rosea. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1341-1346.

O'Donnell, R.W. (1973) The auxin-like effects of humic preparations from leonardite. *Soil Science* 116:106-112.

Oono, Y., Chiharu, O., Rahman A., Asppuria, E.T., Hayashi, K., Tanaka, A., Uchimiya, H. (2003) *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in arabidopsis root. *Plant Physiology* 134:1135-1147.

Orlov, D.S. (1975) Molecular parameters of humic acids. *Geoderma* 13:211-229.

Piccolo, A., Conte P., Cozzolino, A. (1999) Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular associations of dissolved humic substances. *European Journal of Soil Science* 50:687-694.

- Piccolo, A. (1996) Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. *Chemosphere* 33:595-600.
- Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z. (1999) Modulation of NO_3^- uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant and Soil* 215:155-161.
- Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S., (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 55:803-813.
- Rayle, D.L., Cleland, R. (1972) In-vitro acid-growth response - relation to in-vivo growth responses and auxin action. *Planta* 104:282-296.
- Ruck, A., Palme, K., Venis, M. A., Napier, R. M., Felle, R. H. (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin-binding protein in the auxin stimulation of plasma-membrane current in *Zea mays* protoplasts. *Plant Journal* 4:41-46.
- Schnitzer, M., Poapst, P.A. (1967) Effects of a soil humic compound on root initiation. *Nature* 11:598-599.
- Schnitzer, M. (1991) Soil organic matter: the next 75 years. *Soil Science* 151:41-58.
- Sze, H. (1985) H^+ -translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annual Review of Plant Physiology* 36:113-122.
- Yamagami, M., Haga, K., Napier, R. M., Lino, M. (2004) Two distinct signaling pathways participate in auxin-induced swelling of pea epidermal protoplasts. *Plant Physiology* 134:735-747.
- Went, F.W. (1928) Wushstoff und wachstum *Rec. Trav. Need.* 25:1-116.

Vaughan, D., Linehan, D.J. The growth of wheat plants in humic acids solutions under axenic conditions. *Plant and Soil* 44:445-449.

Vaughan, D., Malcom, R. E, Ord, B. C. (1985) Influence of humic substances on biochemical processes in plants. *In: Vaughan, D., Malcom, R. E. (eds.), Soil Organic Matter and Biological Activity*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 78-108.

Vesper, M.J., Kuss, C.L. (1990) Physiological evidence that the primary site of auxin action in maize coleoptiles is an intracellular site. *Planta* 182:486-491.

ÁCIDOS HÚMICOS ESTIMULAM O DESENVOLVIMENTO RADICULAR ATRAVÉS DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DE AUXINA

RESUMO

Plantas mutantes são bastante úteis para o estudo das vias de sinalização envolvidas no controle de uma determinada resposta fisiológica. A ação tipo auxínica de ácidos húmicos (AH) isolados de vermicomposto foi avaliada em diferentes genótipos de tomate de porte micro sensível (MT) ou insensível (*diageotropica*, *dgt*) e raízes transgênicas supersensíveis (MT8196) à auxina. Os AH não foram capazes de estimular a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática nem das bombas de H⁺ do tonoplasto (V-ATPase e H⁺-PPase) do genótipo *dgt*, resultando na ausência de emissão de raízes laterais. Por outro lado, nos genótipos MT e MT8196, os AH estimularam a atividade das bombas de H⁺ e promoveram um aumento nítido da emissão de raízes laterais. Foram obtidas evidências de que o efeito dos AH, tanto na expansão (crescimento) quanto na diferenciação celular (iniciação das raízes), é dependente da sensibilidade à auxina. Dessa forma, os AH podem ser considerados como um tipo de auxina.

ABSTRACT

Hormone response mutants are useful tools to understand the signalling pathways involved in the control of physiological responses. The auxin-like effect of humic acids (HA) isolated from earthworm compost was evaluated in different micro tomato genotypes due its auxin sensibility: Sensitive (MT) and insensitive *diageotropica* (*dgt*), and hairy roots oversensitive (MT8196). We have found that HA were not able to enhance neither plasma membrane H⁺-ATPase nor tonoplast H⁺ pumps activity (V-ATPase and H⁺-PPase) resulting in absence of lateral roots emergence in *dgt* genotype. On the other hand, HA enhanced H⁺ pumps associated to an apparent stimulation on lateral root emergence in MT and MT8196 genotypes. We obtained evidences that the HA effect, so much in the expansion (growth), as in the cellular differentiation (root initiation), it is dependent of the auxin sensibility. Therefore, HA can be considered as an auxin type.

1. INTRODUÇÃO

A auxina é uma família de hormônios vegetais responsável pela regulação de diversos aspectos do desenvolvimento e crescimento. Apresenta uma atividade reguladora-chave do desenvolvimento de raízes laterais (Laskowski *et al.*, 1995). A ramificação do sistema radicular representa uma especialização determinante na arquitetura das plantas (Laskowski *et al.*, 1995). O transporte basípido da auxina na raiz e acrópeto nas folhas são necessários, respectivamente, durante as fases de iniciação e emergência das raízes laterais (Casimiro *et al.*, 2001). A auxina é requerida, inicialmente, para estabelecer uma população elevada de células no periciclo em intensa divisão (Laskowski *et al.*, 1995). Essa zona de diferenciação da raiz é rica em H⁺-ATPases de membrana plasmática (MP) (Jahn *et al.*, 1998). A ação da auxina em nível celular envolve o reconhecimento por proteínas receptoras específicas, tais como as ABP1 nas

membranas celulares (Ruck *et al.*, 1993; Napier *et al.*, 2002) e o TIR1 presente no citosol (Dharmasiri *et al.*, 2005) e a presença do hormônio em faixas de concentração compatíveis com a sua ação (geralmente μM) (Davies, 1995).

Pequenas concentrações de substâncias húmicas (SH) podem aumentar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, enquanto concentrações mais elevadas geralmente ocasionam efeito deletério sobre o desenvolvimento (Kononova, 1982). O aumento no sistema radicular geralmente é mais notado do que na parte aérea (Vaughan e Malcolm, 1985). Os primeiros experimentos que levaram a supor uma ação do tipo hormonal pelos ácidos húmicos (AH) foram desenvolvidos por Bottomley em 1917. Os efeitos das SH nas membranas celulares promovendo aumento da absorção de nutrientes (Varanini e Pinton, 1995) e a presença de auxinas na sua estrutura química complexa (Muscolo *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004) indicam o papel similar ao das auxinas.

A expansão da célula pode ser induzida pela ação do ácido indol-3-acético (AIA) (Rayle e Cleland, 1972), a forma mais comum de auxina na natureza (Taiz e Zaiger, 2002). Observou-se que as auxinas também podem induzir ao aumento da síntese de H^+ -ATPases de MP (Hager *et al.*, 1991; Frías *et al.*, 1996). Postulou-se a possibilidade de as auxinas aumentarem a taxa de extrusão de H^+ pela estimulação tanto dos processos de ativação de H^+ -ATPases preexistentes na MP como de síntese de novas H^+ -ATPases. Existem evidências de que os dois mecanismos podem existir conjuntamente (Cleland, 1995). Além da ativação da H^+ -ATPase de MP, foi relatado recentemente que AH e AIA podem ativar as principais bombas de H^+ do tonoplasto (Zandonadi *et al.*, 2005a).

Tem sido proposto que tanto SH de baixa massa molecular (Pinton *et al.*, 1992; Varanini *et al.*, 1993) como de massa molecular aparentemente elevada (*e.g.* AH) (Canellas *et al.*, 2002; Façanha *et al.*, 2002) podem induzir à atividade da H^+ -ATPase de MP. O forte estímulo sobre a atividade e expressão da H^+ -ATPase de MP em raízes de plântulas de milho tratadas com AH isolado de vermicomposto e a presença de grupamentos de AIA em seu arranjo estrutural suportam a proposta de um mecanismo para a bioatividade dos AH baseado na “teoria do crescimento ácido” (Canellas *et al.*, 2002). Quaggiotti *et al.* (2004) demonstraram que frações húmicas de baixa massa molecular estimularam a absorção de nitrato, possivelmente através do aumento das

isoformas *Mha1* e *Mha2* da H⁺-ATPase de MP.

A formação de raízes laterais induzidas por auxinas requer duas etapas fundamentais: o transporte de AIA da parte aérea para as raízes e indução da divisão celular (Davies, 1995). Nardi *et al.* (1994), através do uso de SH de baixo peso na presença de dois inibidores de auxina, um de transporte e outro de sinalização (TIBA: ácido 2,3,5-triidobenzóico e PCIB: ácido 4-clorofenoxibutírico, respectivamente), verificaram em folhas de *Nicotiana plumbaginifolia* que na presença de TIBA, houve forte inibição do desenvolvimento de raízes e na presença de PCIB, o efeito das SH sobre o crescimento não foi alterado.

Oono *et al.* (2003) demonstraram que o PCIB afeta a via de sinalização de auxina, regulando a estabilidade das proteínas Aux/AIA. Zandonadi *et al.* (2005b) observaram que o PCIB diminui o desenvolvimento radicular e a atividade da H⁺-ATPase de MP de plântulas de milho tratadas com SH de alta massa molecular. Esses autores demonstraram que o inibidor de efluxo de AIA (TIBA) tem uma ação discreta quando comparada ao inibidor PCIB, de forma contrária ao anteriormente observado por Nardi *et al.* (1994). A via de sinalização celular envolvida na ação do tipo auxina de SH é ainda controversa. Parte desse impasse pode ser atribuída a problemas relacionados a possíveis alterações das substâncias inibidoras em contato com as soluções de SH. Uma alternativa para o estudo criterioso dos efeitos hormonais de SH é o uso de plantas mutantes ou geneticamente modificadas.

Plantas mutantes insensíveis ou supersensíveis à ação hormonal são bastante úteis para o estudo das vias de sinalização envolvidas no controle de uma determinada resposta fisiológica (Coenen *et al.*, 2002). O tomateiro mutante *diageotropica* (*dgt*) foi bem caracterizado quanto a sua resistência à auxina (Zobel 1972; Kelly e Bradford, 1986; Muday *et al.*, 1995; Pinno-Nunes, 2005). Kelly e Bradford (1986) demonstraram a redução da síntese de etileno e do alongamento de hipocótilos de tomate *dgt*. Coenen *et al.* (2002) comprovaram que o produto do gene DGT é necessário para a regulação negativa da extrusão de H⁺. Recentemente foi obtida uma linhagem de tomateiro contendo a mutação *dgt* em plantas de porte micro (Micro-Tom - MT) (Pinno-Nunes, 2005), conhecidas como um modelo genético de tamanho reduzido e ciclo de vida curto (Meissner, 1997). Por outro lado, a utilização de plantas transgênicas com alta sensibilidade à auxina (superexpressão dos genes *rolABC*) pode ser uma ferramenta

extremamente eficaz para o estudo das respostas fisiológicas desencadeadas por SH.

Não existe nenhum relato da utilização de mutantes *dgt* ou de raízes transformadas geneticamente supersensíveis a auxinas (eg. MT8196) para determinação da bioatividade de SH.

O presente trabalho teve o objetivo de verificar se o modo de ação do AH é dependente ou não da via de transdução de sinal de auxina. Para isso, foram utilizados genótipos de tomateiro supersensíveis (MT8196) ou insensíveis (*dgt*) à auxina e avaliados os mecanismos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento de raízes laterais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção, isolamento e purificação dos ácidos húmicos

A extração dos AH foi realizada com NaOH 0,5 mol L⁻¹, na razão solvente: solo de 1:10 (v:v) em atmosfera inerte de N₂. A separação dos AH foi conseguida com o abaixamento do pH da solução até 1,0 com HCl 6 mol L⁻¹. A redissolução e precipitação foi repetida três vezes. Em seguida, adicionam-se 200 mL de solução aquosa diluída de HF e HCl (preparada com 5 mL de HCl concentrado e 5 mL de HF concentrado e volume de solução completado para 1 L com água deionizada) e agitação da amostra por 8 horas. Os AH foram lavados com água até teste negativo com AgNO₃ e secos por liofilização.

2.2. Crescimento das plântulas e tratamento com ácidos húmicos

Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) do mutante *diageotropica* (*dgt*) insensível a AIA de porte micro e seu parente sensível a AIA (MT) foram esterilizadas através da imersão numa solução de NaClO 1.0% por 30 minutos. Após lavagem com água destilada, as sementes foram acondicionadas em papel

e germinadas no escuro, a 28°C. Após seis dias da germinação das sementes de tomate, as raízes do tomate *dgt* e MT foram coletadas e transferidas para o meio, suplementado com 0 e 20 mg C_{AH} L⁻¹ extraído de vermicomposto.

2.3. Cultivo das *hairy roots* e tratamento com ácido húmicos

As raízes transgênicas de tomate MT8196 supersensíveis à auxina foram repicadas a partir do meio sólido MS (Murashige *et al.* 1962) e transferidas para o meio líquido MS suplementado com 0 e 20 mg C_{AH} L⁻¹ extraído de vermicomposto. Os frascos contendo as raízes permaneceram sob agitação e temperatura de 25° C constantes e sob luz fluorescente (irradiância de 55 μmols.m⁻².s⁻¹), com um fotoperíodo de 12 horas (Lima *et al.*, 2004). Todas as raízes foram mantidas nas soluções de tratamento durante 25 dias.

2.4. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições por tratamento, cujo modelo matemático pode ser descrito como: $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$, onde: Y_{ij} = resposta experimental medida na unidade experimental j submetida ao tratamento i; μ = média geral; t_i = efeito relativo ao tratamento i; e_{ij} = erro aleatório.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para a avaliação de todas as características qualitativas. A diferença entre os tratamentos foi determinada pelo Teste de Média Tukey ($P < 0,05$).

As características quantitativas, como a expansão de pecíolos (genótipos Mt e *dgt*), foram avaliadas mediante regressão linear simples e os coeficientes de regressão, testados a 1% de probabilidade (Figura 1).

2.5. Avaliação da sensibilidade a ácidos húmicos e à auxina

Foram utilizadas plantas de tomate MT e *dgt* cultivadas em casa de vegetação durante 40 dias. Os pecíolos dos folíolos (retirados sempre da terceira folha de cada planta) foram cortados com o auxílio de um gabarito de 12 mm. Os pecíolos foram incubados durante 24 horas em, meio previamente preparado contendo solução-tampão pH 5,2 (2,5 mM KH₂PO₄, 2,5 mM KCl, 1mM Ca(NO₃)₂ e

3 % de sacarose) (Kelly e Bradford, 1986). Utilizaram-se diferentes concentrações de AH (0, 10, 20, 30 mg C L⁻¹). Após o período de incubação o material foi escaneado a 600 dpi de resolução e impressos com três vezes de aumento, para facilitar a avaliação do comprimento do pecíolo com régua milimetrada comum.

2.6. Contagem do número de raízes e raízes laterais emergidas

As raízes de tomate *dgt*, MT e MT8196 foram colocadas em placas de petry sob lupa, e o número de raízes e as raízes laterais emergidas foram quantificadas.

2.7. Purificação das vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto

As vesículas de membrana plasmática (MP) e tonoplasto foram isoladas de raízes de plantas de tomate *dgt*, MT e MT8196 crescidas em meios com ou sem 20 mg C L⁻¹ de AH utilizando a centrifugação diferencial como descrito por De Michelis e Spanswich (1986), com algumas modificações (Façanha e De Meis, 1998). Resumidamente, as raízes foram homogeneizadas em meio tamponado usando grau e pistilo. Foram utilizados 4 g (massa fresca) de raízes de milho e 8 mL de meio de extração gelado contendo 250 mM de sacarose, 10% de glicerol (m:v), 0,5% de PVP-40 (40 KDa), 2 mM de EDTA, 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) (m:v) e 0,1 M de tampão Tris-HCl, pH 8,0. Somente antes do uso, foram adicionados 150 mM de KCl, 2 mM DTT e 1 mM de PMSF. O homogenato resultante foi então filtrado através de quatro camadas de gaze e submetido à centrifugação a 3.000 g durante 15 minutos, para remoção de células não-rompidas e núcleos. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, a 100.000 g por 40 minutos. O precipitado dessa centrifugação foi solubilizado em solução-tampão contendo: glicerol a 15% (v:v), 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 10 mM de Tris-HCl pH 7,6 e 1 mM de EDTA. A suspensão com a fração microsomal foi aplicada sobre um gradiente descontínuo bifásico de sacarose nas concentrações de 30/45% m/v, contendo ainda: Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM. O gradiente foi submetido a uma centrifugação de 100.000 g num rotor SW40 (Beckman), durante 90 minutos. As bandas contendo as vesículas de tonoplasto e membrana plasmática foram coletadas e utilizadas

imediatamente para avaliação do transporte de H^+ ou congeladas em N_2 líquido, para futura utilização. A proteína total contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

2.7.1. Determinação da atividade ATPásica de membrana plasmática

A atividade ATPásica foi determinada pela medida da liberação de P_i segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarrow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através de ácido tricloroacético (gelado) para uma concentração final de 10 % (v/v). Composição do meio de reação: 50 mM de Mops-Tris pH 6,5, 3 mM de $MgCl_2$, 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 50 μ g de proteína. Cerca de 80-95% da atividade da H^+ -ATPase das vesículas medida foi inibida por 0,2 mM de vanadato, um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (Sze, 1985). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H^+ -ATPase foi medida a 30 °C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída à ATPase do tipo P.

2.7.2. Bombeamento de H^+ da ATPase de membrana plasmática

O gradiente eletroquímico de H^+ gerado pela H^+ -ATPase de MP foi estimado através do decréscimo de fluorescência da sonda sensível a pH 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA) (415/485 nm excitação / emissão), e expressa em porcentagem. O meio de reação conteve 10mM de Hepes-KOH (pH 6,5), 100 mM de KCl, 5 mM de $MgCl_2$, 3 μ M de ACMA e 30 μ g de proteína. A reação foi desencadeada pela adição de ATP (1 mM). A adição, tanto de 3 μ M FCCP quanto de 2 μ M NH_4Cl , acabou com o gradiente de H^+ formado pela hidrólise de ATP.

2.7.3. Determinação da atividade da V-ATPase e H^+ -PPase

A atividade da V-ATPase e V-PPase de vesículas de tonoplasto foi determinada pela medida da liberação de P_i segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarrow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloroacético (gelado)

para uma concentração final de 10% (v/v). Cerca de 80-95% da atividade da ATPase das vesículas medidas a pH 7,0 foi inibida por 50mM de KNO₃ ou por 10nM de concanamicina, dois eficientes inibidores da V-ATPase (Tu et al., 1987; Bowman *et al.*, 1988; Sze, 1985). O meio de reação conteve 50 mM de Hepes-KOH, 100 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 50 µg de proteína. Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da V-ATPase foi medida a 30° C, com ou sem bafilomicina A₁, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a ATPase do tipo V. A atividade da V-PPase das vesículas medidas a pH 7,0 foi inibida por KF, um eficiente inibidor da V-PPase (Maeshima e Yoshida, 1989), ou ausência de KCl. O meio de reação conteve 50 mM de Hepes-KOH, 3 mM de MgCl₂ e 50 µg de proteína com ou sem 100 mM de KCl. A diferença entre as atividades com ou sem KCl foi atribuída à atividade da V-PPase.

2.7.4. Bombeamento de H⁺ da V-ATPase e H⁺-PPase

Os gradientes eletroquímicos de H⁺ gerados pela V-ATPase e V-PPase foram estimados pelo decréscimo de fluorescência da sonda sensível a pH 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA) (415/485 nm excitação/emissão), e expressa em porcentagem. O meio de reação conteve 10mM de Tris-HCl (pH 7,0), 100 mM de KCl (com e sem, no caso da V-PPase), 5 mM de MgCl₂, 3 µM de ACMA e 50 µg de proteína. Em ambos os casos, a reação foi desencadeada pela adição do substrato ATP ou PPI (1 mM). A adição de 3 µM FCCP ou de 2 µM NH₄Cl acabou com o gradiente de H⁺ formado tanto pela hidrólise de ATP quanto de PPI.

3. RESULTADOS

3.1. Sensibilidade ao ácido húmico em genótipos MT e *dgt*

Foram utilizadas diferentes concentrações de ácidos húmicos (AH; 0; 10; 20 e 30 mg C_{AH} L⁻¹) para o tratamento de pecíolos coletados de plantas de tomate MT e *dgt* cultivadas em casa de vegetação, durante 40 dias. A equação de regressão apresentou variação linear em função das doses de AH estudadas (figura 1). Detectou-se um estímulo na expansão dos pecíolos do tomate MT tratados com AH. Por outro lado, os pecíolos de tomate *dgt* não apresentaram incremento (expansão em relação às doses de AH), sendo semelhante ao controle. A presença de AIA na estrutura de SH foi demonstrada através de uma série de métodos, tais como testes de comparação de atividade (O'Donnell, 1973; Dell'Agnola e Nardi, 1987), imunodeteção (Muscolo *et al.*, 1999) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Canellas *et al.*, 2002).

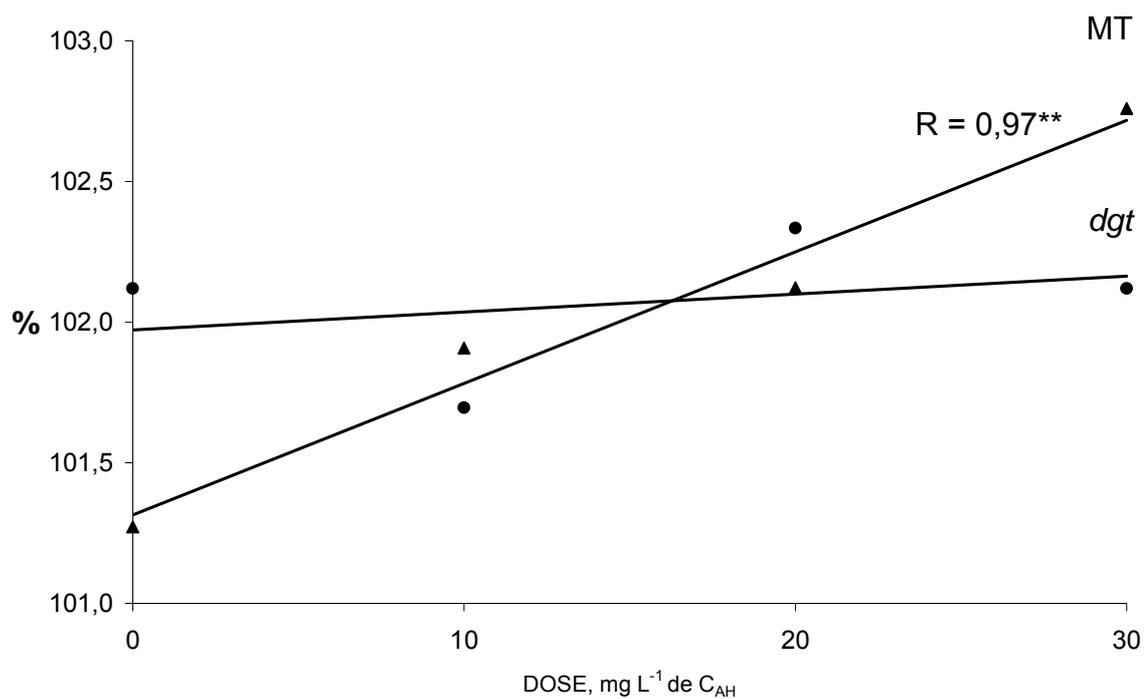


Figura 1. Expansão de pecíolos de MT (sensível à auxina,▲) e *dgt* (pouco sensível a auxina,●) na presença de concentrações crescentes de AH (A). Foi realizado o estudo de regressão linear simples e os coeficientes da regressão foram testados a 1 % de probabilidade.

3.2. Atividade e transporte de H⁺ das bombas da membrana plasmática e do tonoplasto

As vesículas *in-side-out* isoladas das raízes de tomate MT e MT8196 tratadas por 25 dias com 20 mg C_{AH} L⁻¹ exibiram um estímulo evidente das atividades ATPásica sensível a KNO₃ (vesículas do tonoplasto) e a vanadato (vesículas de MP) e da V-PPase dependente de K (vesículas do tonoplasto) (Figuras 3 A, B e C). A formação do gradiente de H⁺ dependente de ATP ou PPi, medido pela queda da fluorescência da sonda ACMA (Figuras 3 D, E e F) também foi verificado no tratamento com AH. Os estímulos sobre a atividade de hidrólise da H⁺-ATPase de MP, V-ATPase e V-PPase nas raízes das plantas MT tratadas com AH foram de 54, 39 e 71%, respectivamente, enquanto que a velocidade inicial de transporte de H⁺ por essas bombas eletrogênicas foi aumentada em 52, 90 e 60%, respectivamente. No genótipo MT8196, os estímulos foram de 74, 52 e 82% para a hidrólise e de 50, 60 e 77% para a velocidade inicial de transporte de H⁺, respectivamente. Nas raízes pouco sensíveis à auxina (*dgt*) tratadas com AH foram observados estímulos muito discretos sobre a atividade das bombas de H⁺. Coenen *et al.* (2002) demonstraram que o produto do gene *dgt* é necessário para a regulação negativa da extrusão de H⁺ pela auxina mediada pela H⁺-ATPase de MP. No presente trabalho, foi verificado, além disso, que as bombas de H⁺ do tonoplasto também estão envolvidas na resposta ao AH através da via de transdução de sinal de auxina.

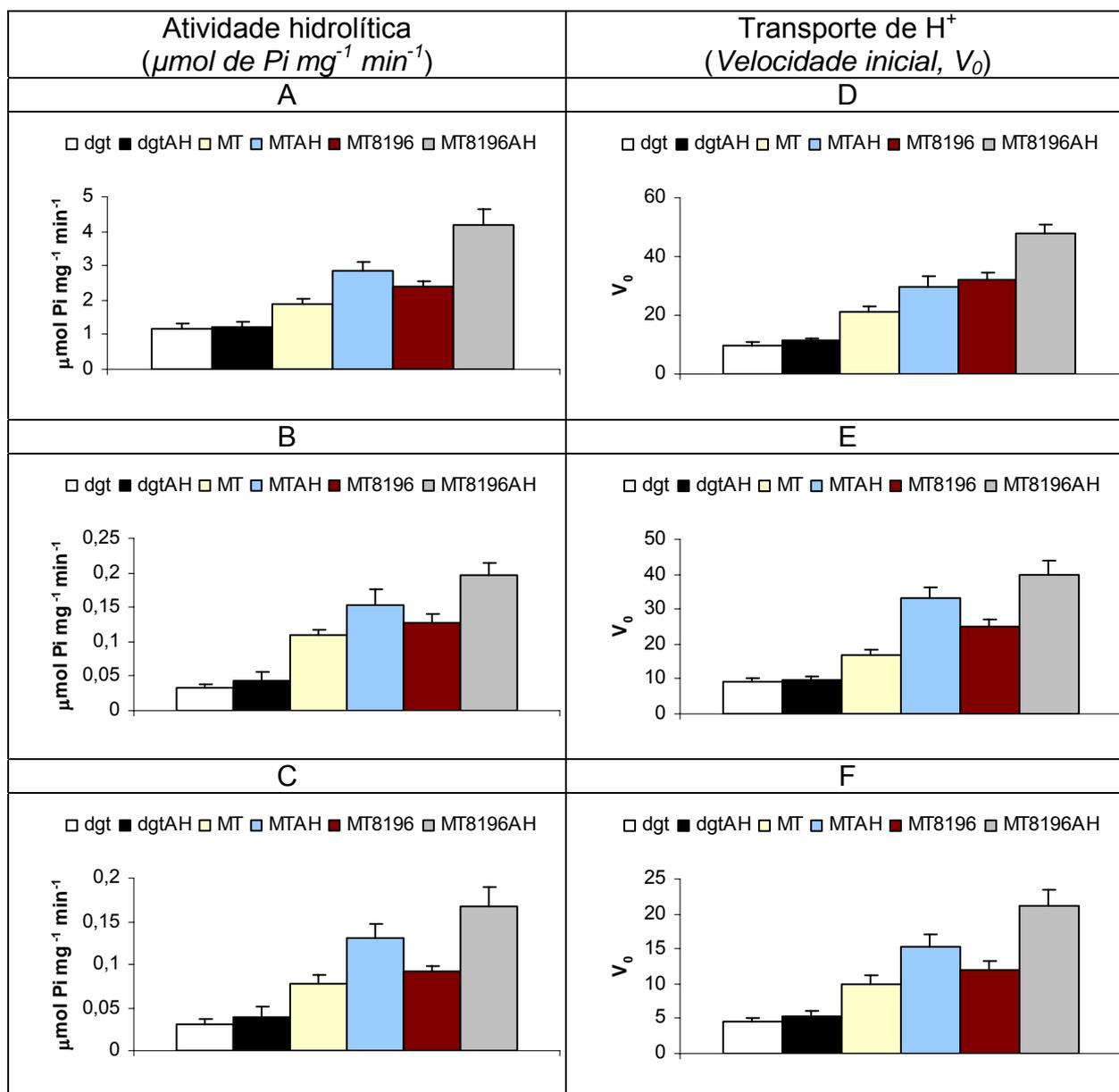
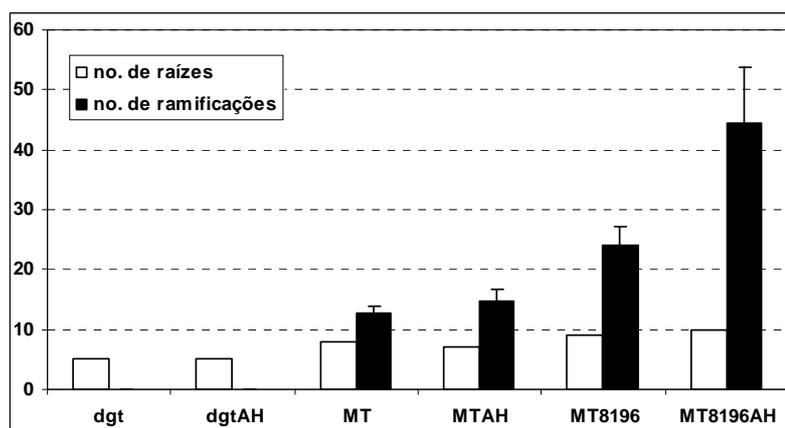


Figura 3. Atividade hidrolítica da H^+ -ATPase de MP (A), V-ATPase (B) e V-PPase (C) e velocidade inicial (V_0) do transporte de H^+ (D, E e F) de vesículas isoladas de raízes MT (sensível à auxina), *dgt* (pouco sensível à auxina) e MT8196 (supersensível à auxina) cultivadas ou não na presença de ácidos húmicos ($20 \text{ mg C}_{\text{AH}} \text{ L}^{-1}$).

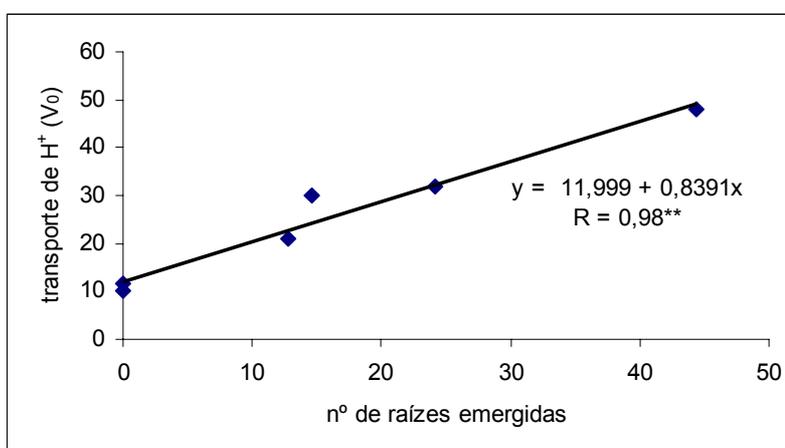
3.3. Diferenciação: raízes emergidas

A zona de diferenciação celular das raízes inclui uma região com elevada densidade de células meristemáticas que são precursores de raízes laterais (Jhan *et al.*, 1998). A relação entre esses sítios de diferenciação celular, área radicular e atividade da H^+ -ATPase da MP foi demonstrada por Canellas *et al.* (2002) em plântulas de milho tratadas com AH isolado de vermicomposto. No presente trabalho verificou-se que as raízes emergidas não foram induzidas por AH no mutante *dgt*, mas foram estimuladas em raízes MT e raízes transgênicas MT8196 com genes *rol* superexpressos (Figura 5A). O estímulo da emissão de raízes foi relacionado com a extrusão de H^+ medida pela H^+ -ATPase de MP (Figura 5B) e pelas bombas de H^+ do tonoplasto (Figura 5C), presentes em vesículas isoladas das raízes.

(A)



(B)



(C)

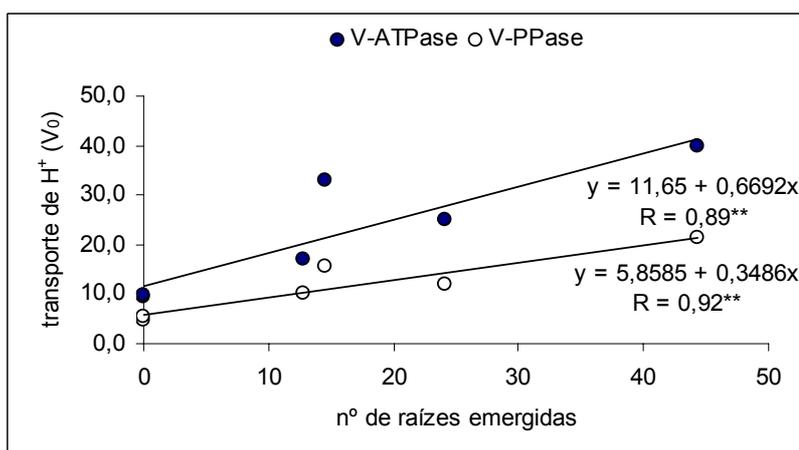


Figura 5. Número de raízes e ramificação das raízes laterais de tomate MT (sensível à auxina), *dgt* (pouco sensível à auxina) e MT8196 (supersensível à auxina) na presença de $20 \text{ mg } C_{AH} \text{ L}^{-1}$ (A); e correlação de Pearson ($P < 0,01$) da ramificação das raízes laterais e estímulo do transporte de H^+ (V_0) mediado pela ATPase de MP (B) e pelas bombas do tonoplasto (C).

4. DISCUSSÃO

O estudo da promoção do crescimento vegetal mediado por SH tem sido objetivo de muitos trabalhos (Guminski, 1968; O'Donell, 1973; Dell'Agnola e Nardi, 1987; Muscolo *et al.*, 1999; Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004). A maior parte desses autores relacionou os efeitos estimulatórios das SH, principalmente na raiz, com a presença de grupamentos semelhantes à auxina encontrados através de diferentes métodos, tais como imunoenaios (Muscolo *et al.*, 1998; Quaggiotti *et al.*, 2004) ou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Canellas *et al.*, 2002). Neste trabalho, foram utilizadas, pela primeira vez, plantas mutantes em respostas hormonais (tomates *dgt* insensível e MT8196 supersensível), para a avaliação da atividade do tipo auxínica de AH.

Os resultados confirmam que a atividade hormonal dos AH está relacionada com a auxina. A insensibilidade do tomate mutante *dgt* ao AIA já foi demonstrada (Kelly e Bradford, 1986; Muday *et al.*, 1995; Pinno-Nunes, 2005). Os AH, assim como o AIA, não induzem ao alongamento de pecíolos de tomate *dgt* (Figura 1), indicando que parte da ação dos AH nesse fenômeno está relacionada com o efeito promovido pela auxina. Uma série de métodos fisiológicos, bioquímicos e eletrofisiológicos foi empregada para caracterizar o efeito da auxina sobre a extrusão de H^+ em uma ampla variedade de tecidos vegetais (Cleland, 1995). O estímulo da extrusão de H^+ devido à auxina é rápido (cerca de 10 minutos) e foi atribuído tanto ao aumento da atividade quanto ao da quantidade de H^+ -ATPases de MP. O aumento da quantidade dessa enzima induzida por auxina em coleótilos de milho já foi demonstrado (Hager *et al.*, 1991; Frías *et al.*, 1996). Ácidos húmicos também podem induzir à síntese de H^+ -ATPase de MP (Canellas *et al.*, 2002). As atividades da H^+ -ATPase de MP e de tonoplasto (V-ATPase) e da pirofosfatase de tonoplasto (V-PPase) foram alteradas nos diferentes genótipos avaliados sob tratamento com AH (Figura 3). A H^+ -ATPase de MP participa de várias funções essenciais para o funcionamento normal das plantas como tolerância a salinidade, regulação do pH intracelular, expansão celular e ativação do transporte secundário (Serrano, 1989; Palmgren, 1998; Morsomme e Boutry, 2000). A atividade e o transporte de H^+ promovidos pela H^+ -

ATPase de MP no genótipo insensível ao AIA (*dgt*) não foram afetados pelo tratamento com AH. Os genótipos sensível (MT) e supersensível (MT8196) foram fortemente estimulados na presença de AH (Figuras 3, A e D). O mesmo comportamento foi observado no caso das bombas de H⁺ de tonoplasto (V-ATPase e V-PPase) (Figuras 3 B, C, E e F).

O vacúolo das células vegetais é uma organela multifuncional que exerce um papel fundamental na estratégia do desenvolvimento (Marty, 1999). Entre suas funções, destacam-se a regulação da homeostase celular, que envolve o controle do volume e turgor, regulação de íons do citoplasma e pH e armazenamento de aminoácidos, açúcares e CO₂ (Sze *et al.*, 1992; Taiz, 1992; Maeshima, 2000). Ambas, V-ATPase e V-PPase, são importantes nessas funções (Rea *et al.*, 1992; Taiz, 1992). A redução da acidificação dependente da H⁺-ATPase de MP em segmentos de hipocótilo de tomate *dgt* já foi descrita anteriormente (Coenen *et al.*, 2002). No presente estudo, foi descrito, além disso, que as bombas de H⁺ do tonoplasto também são ativadas de maneira diferente de acordo com o genótipo utilizado. É possível estabelecer uma função da auxina sobre a regulação dessas bombas, embora ainda não muito clara.

A não-observação de qualquer efeito dos AH sobre a H⁺-ATPase de MP no genótipo *dgt* insensível à auxina é uma prova inequívoca de que os AH utilizam uma via dependente de auxina para estimulação dessa bomba. A relação entre a localização de H⁺-ATPases de MP nos ápices de raízes de milho e a formação de raízes laterais foi estabelecida por Jahn *et al.* (1998). A diferenciação das células das raízes dos genótipos de tomate estudados foi bastante distinta nos tratamentos estudados (Figura 5A) e demonstrou uma relação entre o bombeamento de H⁺ promovido pela H⁺-ATPase de MP e a emissão de raízes laterais (Figura 5B). Esses resultados estão de acordo com os descritos anteriormente em raízes de milho (Canellas *et al.*, 2002). Segundo Maeshima (1990), o processo de expansão celular estimulado pelo turgor do vacúolo necessita do aumento da quantidade de H⁺-ATPase e H⁺-PPase em tecidos jovens de hipocótilo de feijão. A velocidade inicial do transporte de H⁺ (V₀) promovido pelas bombas do tonoplasto também é maior nos tratamentos que mais estimularam a emissão de raízes (Figura 5C). Os dados apresentados no presente trabalho indicam que efeito que os AH exercem na promoção do enraizamento lateral nas plantas é do tipo auxínica. A utilização de mutantes

insensíveis e supersensíveis à auxina forneceu argumentos irrefutáveis para um modo de ação do AH dependente da via de transdução de sinal de auxina.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Plantas mutantes são bastante úteis para o estudo das vias de sinalização envolvidas no controle de uma determinada resposta fisiológica. A ação tipo auxínica de AH isolados de vermicomposto foi avaliada em diferentes genótipos de tomate de porte micro sensível (MT) ou insensível (*dgt*) e raízes transgênicas supersensíveis (MT8196) a auxina. Os AH não foram capazes de estimular a atividade da P-ATPase, nem das bombas de H⁺ do tonoplasto (V-ATPase e V-PPase) do genótipo *dgt*, resultando na ausência de emissão de raízes laterais. Por outro lado, nos genótipos MT e MT8196, os AH estimularam a atividade das bombas de H⁺ e promoveram um aumento nítido da emissão de raízes laterais. Os resultados sugerem que:

(i) o efeito dos AH, tanto na expansão (crescimento) quanto na diferenciação celular (iniciação das raízes), é dependente da sensibilidade à auxina;

(ii) os AH podem ser considerados como um tipo de auxina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balbi, V., Lomax, T.L. (2003) Regulation of early tomato fruit development by the *diageotropica* gene. *Plant Physiology*, 131: 186-197.

Bottomley, W.B. (1917) Some effects of organic-promotion substances (auximones) on the growth of *Lema minor* in mineral cultural solutions.

- Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences, 89:481-505.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Canellas, L.P., Guridi, F., Santos, G.A., Rumjanek, V.M., Braz-Filho, R. (2001) Aumento da resolução de espectros de RMN ^{13}C com uso de KCl 0,03 mol L $^{-1}$. *Química Nova*, 24:131-132.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002) Humic Acids Isoleted from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H $^{+}$ -ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiology*, 1951-1957.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandber, G., Casero, P.J., Bennett, M. (2001) Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *The Plant Cell* 13:843-852.
- Christian, M., Steffens, B., Schenck, D., Lüthen, H. (2003) The *diageotropica* mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. *Planta*, 218: 309–314.
- Cleland, R.E. (1995) Auxin and cell elongation. In: Davies, P.J. (ed.) *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 214-225.
- Coenen, C., Bierfreund, N., Lüthen, H., Neuhaus, G. (2002) Developmental regulation of H $^{+}$ -ATPase-dependent auxin responses in the *diageotropica* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiologia Plantarum*, 114, 461-471.

- Davies, P.J. (1995) The plant hormones: their nature, occurrence and functions. *In: Davies, P.J. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 1-12.
- Dell'Agnola G., Nardi, S. (1987) Hormone-like effect and enhanced nitrate uptake induced by depolycondensated humic fractions obtained from *Allolobofora* and *A. caliginosa* faeces. *Biology and Fertility of Soils* 4:115–118.
- De Michelis, M.I., Spanswick, R.M. (1986) H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.* 81:542-547
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Estelle, M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435:441-443.
- Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz-filho, R., Oliveira, M.A. Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37, 1301-1310.
- Fiske CF, Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66: 375.
- Frias I, Caldeira MT, Perez CJR., Navarro AJP, Cullianez MFA, Kuppinger O, Stransky H, Pages M, Hager A, Serrano R (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8: 1533-1544.
- Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 185:527-537.
- Jahn T, Baluska F, Michalke W, Harper JF, Volkmann D (1998) Plasma

- membrane H⁺-ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiologia Plantarum*, 104: 311-316.
- Kelly MO, Bradford KJ (1986) Insensitivity of the *diageotropica* tomato mutant to auxin. *Plant Physiology*, 82: 713-717.
- Kononova, M.M. (1982) Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades e métodos de investigación. Barcelona: Oikus-Tou, 365p.
- Laskowski, M.J., Williams, M.E. Nusbaum, H.C., Sussex, I.M. (1995) Formation of lateral root-meristems is a 2-stage process. *Development* 121:3303-3310.
- Lima, J.E., Carvalho, R.F., Tulmann Neto, A., Figueira, A., Peres, L.E.P. (2004) Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle, and improved in vitro shoot regeneration. *Plant Science* 167:753-757.
- Maeshima M, Yoshida S (1989) Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *J Biol Chem*. 264: 20068-20073.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y., Levy, A. (1997) A new model system for tomato genetics *Plant J*. 12:1465–1472.
- Muday, G.K., Lomax T.L., Rayle D.L. (1995) Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant *diageotropica*. *Planta* 195: 548-553.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Muscolo A, Cutrupi S, Nardi S (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biology and Biochemistry*, 30:1199-1201.

- Napier RM, David KM, Penot-Rechenmann C (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant molecular biology* 49: 339-348.
- Nardi S, Panuccio MR, Abenavoli MR, Muscolo A (1994) Auxin-like effect of humic substances from faeces of *allolobophora caliginosa* and *a. rosea*. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1341-1346.
- Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, Vianello A (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1527-1536.
- O'Donnell, R.W. (1973) The auxin-like effects of humic preparations from leonardite. *Soil Science* 116(2):106-112.
- Oono Y, Chiharu O, Rahman A, Asppuria, ET, Hayashi K, Tanaka A, Uchimiya H (2003) *p*-Chlorophenoxyisobutyric Acid Impairs Auxin Response in Arabidopsis Root. *Plant Physiology*, 134: 1135-1147.
- 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.
- Pinton R, Varanini Z, Vizzoto G, Maggioni A (1992) Soil humic substances affect transport-properties of tonoplasto vesicles isolated from oat roots. *Plant and Soil*, 142: 203-210.
- Quaggiotti S, Ruperti B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot.* 55: 803-813.
- Ramírez-Chávez, E., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., Molina-Torres, J. (2004) Alkamides isolated from plants promotes growth and alter root

- development in arabidopsis. *Plant Physiology*, 134: 1058-1068.
- Rayle, D.L., Cleland, R. (1972) in-vitro acid-growth response - relation to in-vivo growth responses and auxin action. *Planta*, 104: 282-296.
- Ruck, A., Palme, K., Venis, M.A., Napier, R.M., Felle, R.H. (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin-binding protein in the auxin stimulation of plasma-membrane current in *Zea mays* protoplasts. *Plant J.* 4: 41-46.
- Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:61–94.
- Sze, H. (1985) H⁺ translocating ATPases: advances using membranes vesicles. *Annu Rev Plant Physiol.* 36: 175-208.
- Taiz, L., Zeiger, E. *Plant Physiology* (2002), Massachusetts: Sunderland Sinauer Associates. 690 p.
- Vaughan, D., Malcolm, R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological process. In: Vaughan, D Malcolm, RE (eds.) *Soil Organic Matter and Biological Activity*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p 37–75.
- Varanini, Z., Pinton, R., De Biase, M.G., Astolfi, S., Maggioni, A. (1993) Low molecular weight humic substances stimulate H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant and Soil*, 153: 61-69.
- Varanini, Z., Pinton, R. (1995) Humic substances and plant nutrition. In: Luttge, U., (ed.), *Progress in Botany* 56. Berlin: Springer, p. 97–117.
- Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2005a) Root growth and tonoplast proton pumps activity are stimulated by auxin and humic acids. Não publicado.

Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2005b) Auxin inhibitors impair humic acids activity on plasmalemma proton pumps and maize development. Não publicado.

Zobel, R.W. (1972) Genetics of *diadeotropica* mutant of the tomato. *J. Hered.* 63:91-97.

BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS HÚMICOS: SIMILARIDADES COM A AÇÃO DAS ALQUILAMIDAS, UMA NOVA CLASSE DE HORMÔNIOS VEGETAIS

RESUMO

As alquilamidas - uma nova classe de reguladores do crescimento vegetal - promovem a formação de raízes laterais e o alongamento de pêlos radiculares de maneira independente da via de sinalização auxínica, sem reduzir o comprimento da raiz principal, do mesmo modo que os ácidos húmicos (AH). O objetivo desse trabalho foi explorar o possível envolvimento das afininas (N-isopropil-decanamida) no sistema primário de transporte de H^+ em células radiculares de plântulas de milho. Os resultados foram comparados aos obtidos com plântulas tratadas com AH isolados de vermicomposto. As afininas aumentaram a proliferação de raízes laterais e promoveram o crescimento radicular. Pelo menos em parte, esse efeito pode ser atribuído ao aumento da atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática. A concentração mais elevada de afinina (10^{-4} M) aumentou o crescimento radicular somente aos 15 dias. As menores concentrações (10^{-6} M e 10^{-8} M) causaram o aumento do crescimento radicular aos 7 e 15 dias. Através das técnicas de cromatografia líquida de alta pressão e de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, foi

possível identificar a presença de afininas nos AH. Além de grupos auxínicos, os AH podem conter, na sua estrutura supra-molecular, uma série de compostos com capacidade de promover o desenvolvimento vegetal.

ABSTRACT

Affinins, a new class of plant growth regulation, promotes lateral root formation and root hair elongation independent of auxin signaling pathway, but similar to humic acids (HA). In order to explore the possible involvement of affinin in primary H⁺ transport system in root cells we synthesize N-isopropyl-decanamide and treat maize seedlings with different affinin concentration. The results are compared with obtained from seedlings treated with HA isolated from vermicompost. Similar a previous results affinins enhance the proliferation of lateral root formation and promote root growth. At least in part, this effect can be attributed to enhance in H⁺-ATPase activities. The high concentrations of affinin (10⁻⁴ M) enhance root growth only at fifteenth day. Low concentration (10⁻⁶ M and 10⁻⁸ M) promotes enhance on radicular growth at seventh and fifteenth days. Through high pression liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry was found affinins in HA. Besides auxinic groups, HA could have in their supramolecular structure additional composts with ability to promote plant development.

1. INTRODUÇÃO

Os hormônios vegetais são fundamentais na regulação do crescimento das plantas. Vários tipos de hormônios já foram descritos, tais como auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. A auxina foi o primeiro hormônio descoberto (Went, 1928) e coordena o desenvolvimento vegetal através da regulação da divisão, diferenciação e expansão celular (Davies, 1995). Nesse aspecto, destaca-se sua importância durante a formação de raízes laterais (Laskowisk *et al.*, 1995; Casimiro *et al.*, 2001), especialmente nos ambientes tropicais onde predominam solos com baixa fertilidade. Plantas com raízes laterais mais desenvolvidas têm maior capacidade de exploração dos nutrientes e da água do solo.

Além dos cinco fitormônios já bem conhecidos e descritos, outros reguladores de crescimento têm sido apresentados, dentre eles, os brassinoesteróides (Thompson *et al.*, 1979) e, mais recentemente, as alquilamidas (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004).

As alquilamidas são metabólitos secundários incluindo mais de 200 compostos que possuem estrutura básica originada da condensação de ácidos graxos insaturados e uma amina (Hofer *et al.*, 1986). As afininas (N-isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida), naturalmente encontradas nas plantas, podem aumentar a formação e emissão de raízes laterais e o alongamento de pêlos radiculares de maneira bastante semelhante à auxina, sem, no entanto, causar o encurtamento do eixo principal (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004). Ramírez-Chávez e colaboradores (2004) verificaram que o estímulo no crescimento radicular provocado pela afinina ocorreu sem alterar a expressão de genes induzidos por auxina (GUS, β -glucuronidase), e inibiu o alongamento da raiz principal de mutantes resistentes à auxina. Esses autores levantaram a possibilidade de utilizar essa classe de compostos na estimulação do crescimento radicular. Entretanto, a maneira pela qual as alquilamidas podem afetar as cascatas de produção de sinais que modificam o crescimento e a diferenciação nas células radiculares ainda é desconhecida, uma vez que a via de ação é independente da

via da auxina.

Por outro lado, os efeitos da auxina na expansão celular foram alvo de diversos estudos que culminaram na elaboração da “teoria do crescimento”, no início da década de 1970. Essa teoria estabelece que a auxina pode ativar a extrusão de prótons para a parede celular numa taxa elevada, através da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP), resultando no decréscimo do pH apoplástico (Hager *et al.*, 1971, 1991; Rayle e Cleland, 1972,1992). A H⁺-ATPase de MP parece ser regulada por todos os fatores importantes que controlam a fisiologia das plantas: luz, hormônios, fitotoxinas e estresses do ambiente (Serrano, 1989; Palmgren, 2001). Jahn *et al.* (1998) demonstraram que esta enzima está associada à emissão de raízes laterais. Recentemente, foi estabelecida a relação entre a expressão da H⁺-ATPase e o desenvolvimento de raízes laterais estimuladas por frações da matéria orgânica (eg. ácidos húmicos, AH) dotadas de atividade auxínica (Canellas *et al.*, 2002, 2005; Façanha *et al.*, 2002; Zandonadi *et al.*, 2005). A presença de ácido indol-3-acético (AIA) nas substâncias húmicas (SH), bem como seus efeitos sobre a expressão de genes reguladores das isoformas *Mha1* e *Mha2* da H⁺-ATPase, foi confirmada por Quaggiotti *et al.* (2004). No entanto, a detecção de auxina nas SH explica apenas em parte os efeitos da matéria orgânica humificada sobre o metabolismo das plantas. Os efeitos diretos das SH vão desde a aceleração da germinação e da atividade de enzimas até o aumento da absorção de nutrientes e da produtividade de diferentes espécies (resumidos por Visser, 1986). Uma vez que muitos desses efeitos não dependem diretamente da auxina, é plausível que outras substâncias estejam envolvidas na ação hormonal desempenhada pelos AH. As SH estimulam o enraizamento das plantas de uma maneira dependente da concentração (Schnitzer e Poapst, 1967; O’Donnell, 1976; Cacco e Dell’Agnola, 1984; Muscolo *et al.*, 1999; Canellas *et al.*, 2002). Apesar dos AH utilizarem a via de transdução de sinal de auxina, as doses mais elevadas dessa substância inibem tanto o comprimento do eixo principal das raízes quanto a emissão de raízes laterais. Nessa situação, as afininas promovem um efeito semelhante ao observado para os AH: reduzem ou aumentam, ao mesmo tempo, a área e o comprimento da raiz principal em alta ou baixa concentração, respectivamente.

O presente estudo descreve os efeitos de uma afinina sintética (N-isopropil-decanamida) sobre a atividade da H⁺-ATPase de MP e sobre o

desenvolvimento de plântulas de milho. Constataram-se evidências de que as afininas, em diferentes concentrações, podem estimular o transporte de H^+ , propiciando um aumento no número dos sítios de mitose e de raízes emergidas, culminando numa maior área radicular, de modo muito similar ao encontrado anteriormente para AH isolados de vermicomposto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Síntese da N-isopropil-decanamida e confirmação da estrutura

A síntese da afinina N-isopropil-decanamida foi realizada pelo professor Carlos Roberto Abreu Matos, do Laboratório de Ciências Químicas da UENF, de acordo com procedimento convencional para obtenção de alquilamidas. A seguir, é descrito, de forma resumida, o procedimento de síntese e confirmação estrutural do produto obtido. Uma solução de ácido decanóico (5,0 g; 29,0 mmol) em cloreto de tionila (4,0 mL; 54,8 mmol) foi agitada e colocada em refluxo por 12 horas. O excesso de $SOCl_2$ foi removido pela destilação, e o resíduo contendo o cloreto de decanoila foi usado para o próximo passo, sem purificação. O cloreto de decanoila em hexano (20 mL) foi agitado e adicionado gota a gota de uma solução de isopropilamida (5 mL; 58,7 mmol) em hexano (10 mL). A temperatura da reação foi mantida em 0-5 °C durante a adição. A solução permaneceu em agitação à temperatura ambiente por 5 horas. Os sais foram removidos por filtração e as lavagens, feitas com H_2O (2 X 20 mL). A camada orgânica foi seca e evaporada a vácuo, e o sólido resultante foi purificado pela recristalização com éter etílico, para produzir a N-isopropil-decanamida como um sólido branco (5,3 g, 86% de rendimento de produção). Ponto de ebulição: 47°C, espectrometria de massas:

EI-MS: m/z 213 (M^+ , 3), 170 (), 156 (), 128 (), 114 (20), 101 (100), 86 (45), 58 (24), 57 (23), 55 (32).

1H NMR (400MHz): δ = 0.88 (3H, t, J = 7.0), 1.14 (6 H, d, J = 6.6), 1.28 (12

H, m), 1.61 (2 H, m), 2.12 (2H, t, J = 7.4), 4.09 (1 H, sp, J =6.6).

^{13}C NMR (100MHz): = 14.02, 22.60, 22.77, 25.79, 29.22, 29.31, 29.39, 31.79, 36.98, 41.09, 172.21.

2.1.1. Experimentos de RMN e CG-EM

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram gravados num equipamento Jeol 400 (^1H : 400MHz; ^{13}C : 100 MHz) usando-se tetrametilsilano como padrão interno. Os espectros de massa por impacto eletrônico (EIMS) foram obtidos com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) num equipamento Shimadzu QP5050A a 70 eV. Foi usada uma coluna CP-SIL8CB (30 x 25 m x 0,25 mm) com taxa de aquecimento de $15^\circ\text{C min}^{-1}$ de 50 até 270°C . A temperatura de injeção foi programada para 270°C .

A alquilamida N-isopropil-decanamida foi preparada a partir de ácido decanóico, pela acilação da isopropilamina pelo cloreto de decanoila *in situ* (Figura 1) com 86% de rendimento de produção da reação.

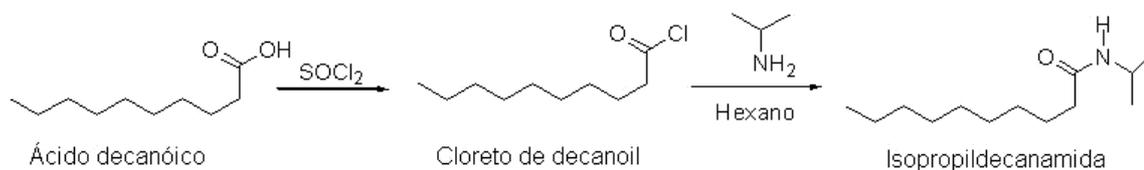


Figura 1. Representação esquemática da síntese de alquilamida.

A estrutura da N-isopropil-decanamida foi confirmada pelos dados espectroscópicos envolvendo RMN de ^1H e ^{13}C e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O espectro obtido com impacto de elétrons (IE) da N-isopropil-decanamida (Figura 2B) mostra o pico molecular em m/z 213 dáltons ($[\text{M}]^+$). Os picos observados em m/z 86 (45%) e 101 m/z (100%) estão de acordo com a presença da função amida (Figura 2 C). Os dados dos espectros de ^1H NMR (400MHz) e ^{13}C NMR (100MHz) (Tabela 1) são compatíveis com a estrutura da N-isopropil-decanamida.

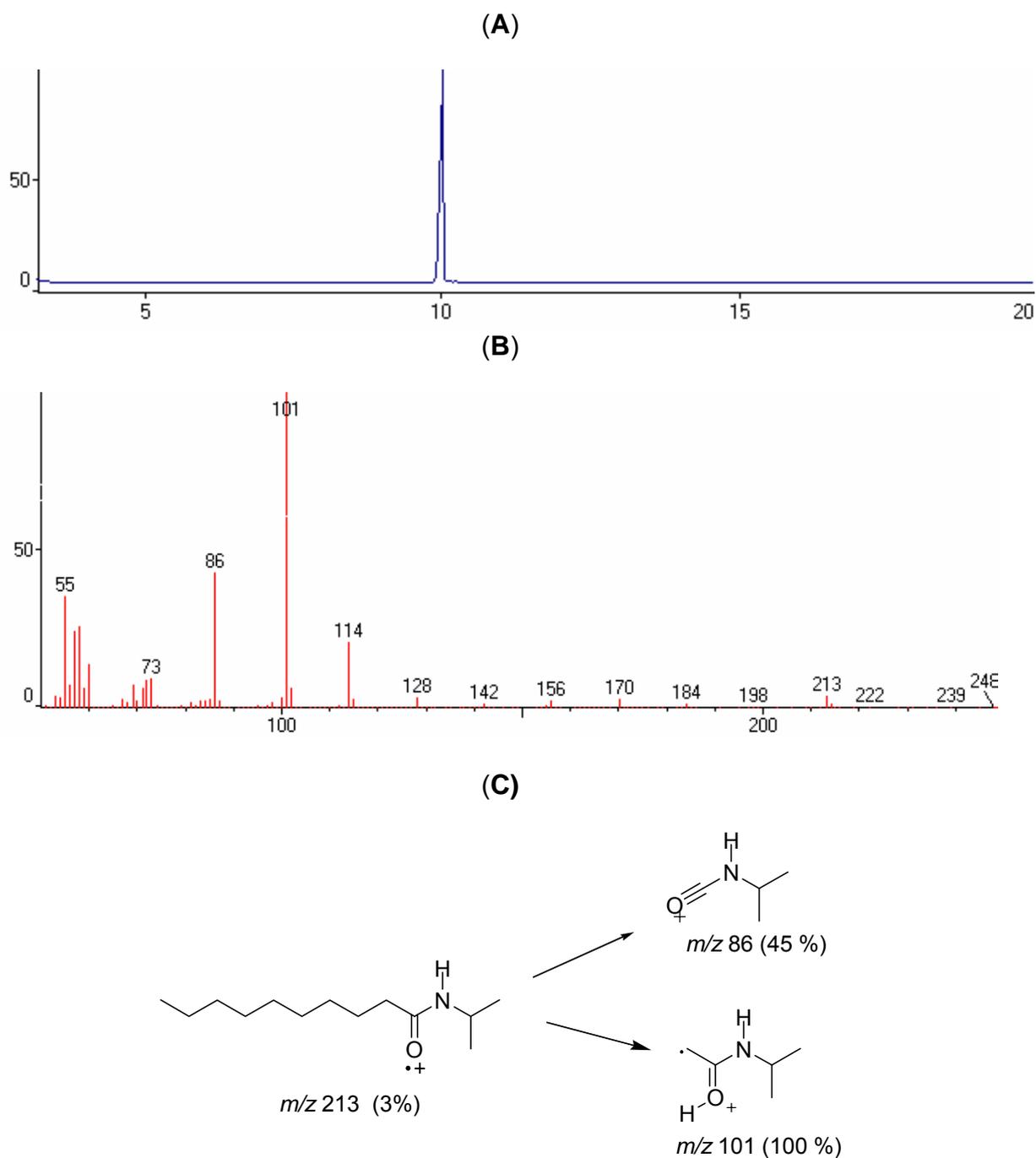
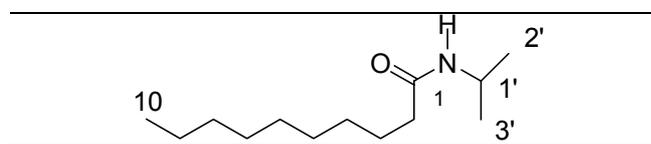


Figura 2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) da N-isopropil-decanamida. (A) Cromatograma. (B) Espectro de massas. (C) Mecanismo de fragmentação proposto para os principais picos observados na N-isopropil-decanamida.

Tabela 1. Dados espectrais de ^1H RMN (400MHz) e ^{13}C RMN (100MHz) para a N-isopropil-decanamida



| posição | δ_{C} (ppm) | δ_{H} (ppm) |
|---------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 172,21 | |
| 2 | 36,98 | 2.12 t (J= 7.4) |
| 3 | 25,79 | 1,61 m |
| 4 | 29,22 | 1,28 m |
| 5 | 29,22 | 1,28m |
| 6 | 29,39 | 1,28m |
| 7 | 29,31 | 1,28m |
| 8 | 31,79 | 1,28m |
| 9 | 22,60 | 1,28m |
| 10 | 14,02 | 0,88 t (J= 7.0) |
| 1' | 41,09 | 4,09 sp (J=6.6) |
| 2' e 3' | 22,77 | 1,14 d (J=6.6) |

2.2. Detecção de afininas em uma solução de AH

O experimento de detecção da presença de afinina nos AH foi realizado no Departamento de Química da UFRRJ, sob supervisão da professora Rosane de Nora Castro, que desenvolveu a seguinte metodologia: uma solução de AH contendo 1 mg AH mL com valores de pH ajustado para 11 foi submetida a extração com acetato de etila. O solvente foi separado em funil e uma amostra foi injetada e separada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foi utilizado um aparelho Shimadzu QP5050A a 70 eV e usada uma coluna capilar DB-5 (30 m; 0,25 nm d.i.) com taxa de aquecimento de $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de 50 até 230°C . A temperatura de injeção foi programada para 200°C .

A Figura 3 permite a comparação do cromatograma-padrão da afinina isolada com o obtido com a solução de AH. Foi possível indicar, através da similaridade no tempo de retenção e, principalmente, pela espectrometria de

massas, a presença de afinina na solução de AH.

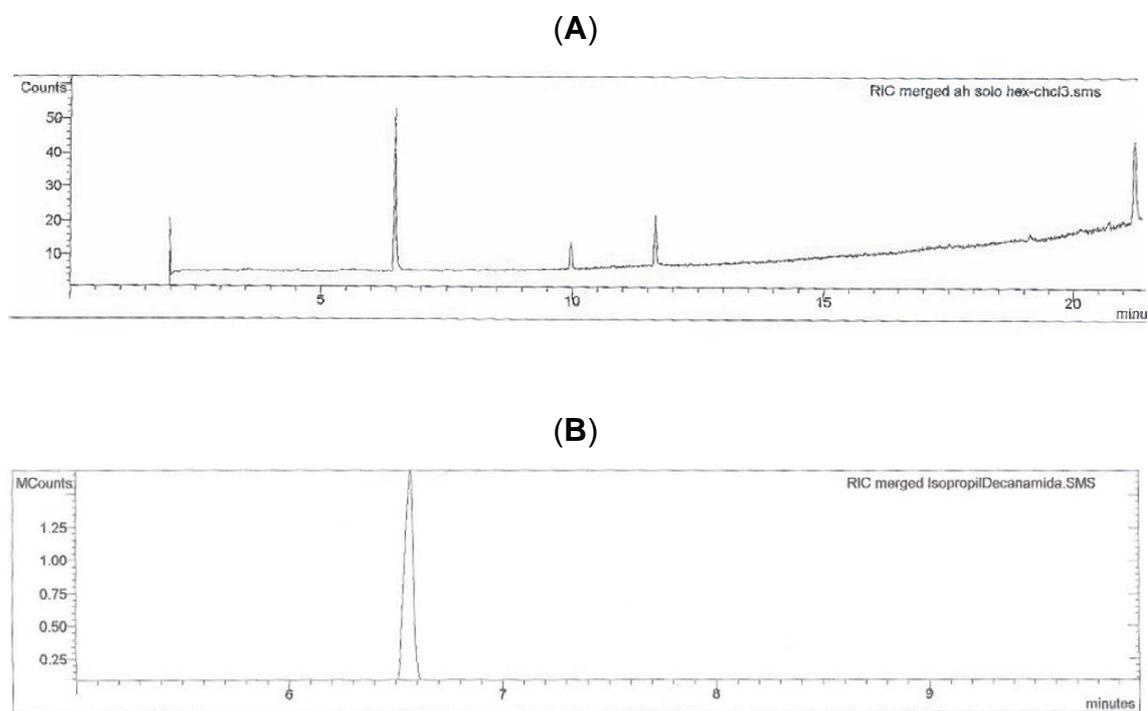
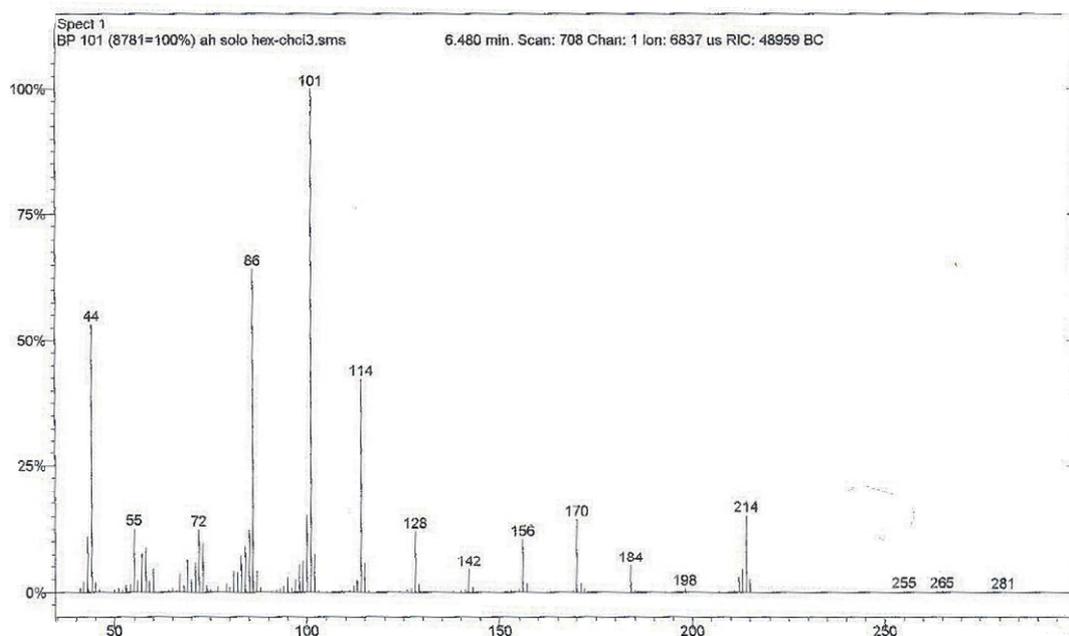


Figura 3. Cromatogramas do AH (A) e da Afinina (B).

(A)



(B)

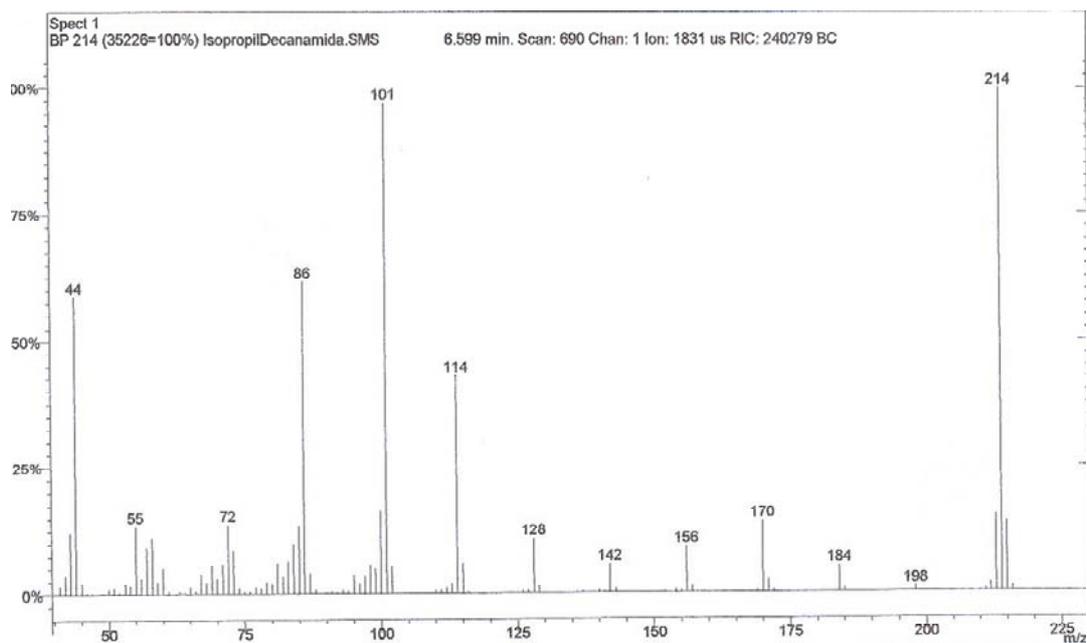


Figura 4. Espectros de massas do AH (A) e da Afinina (B).

2.3. Crescimento das plântulas e tratamento com ácidos húmicos e afininas

As plantas foram analisadas em dois estádios de desenvolvimento diferentes, aos sete e aos quinze dias. No primeiro experimento, foi possível avaliar o período inicial do crescimento das plântulas em condições de hidroponia. No segundo experimento, foi avaliado o estabelecimento das plantas em vasos com areia na casa de vegetação.

2.3.1. Experimento 1

Sementes de milho (*Zea mays* L., var UENF 506-6) foram esterilizadas por meio da imersão numa solução de NaClO 1.0% por 30 minutos, e, em seguida, colocadas em água destilada por um período de seis horas após a lavagem. Depois, as sementes foram acondicionadas em papel, para germinação, no escuro, a 28°C. No primeiro experimento, quatro dias após a germinação das sementes de milho, as plântulas com raízes com aproximadamente 3 cm foram transferidas para um meio mínimo contendo CaCl_2 2 mM e 0, 20 mg $\text{C}_{\text{AH}} \text{L}^{-1}$ extraído de vermicomposto ou afininas (10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} M). As plântulas de milho foram coletadas aos sete dias, para avaliações posteriores.

2.3.2. Experimento 2

No segundo experimento, quatro dias após a germinação das sementes de milho (previamente esterilizadas como no experimento 1), as plântulas foram transferidas para vasos do tipo Leonard contendo areia estéril. No primeiro dia, foram adicionados 500 mL de solução nutritiva diluída três vezes mais 0, 20 mg $\text{C}_{\text{AH}} \text{L}^{-1}$ ou afininas (10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} M). A solução foi trocada semanalmente sem adição de mais AH ou afininas. As plântulas de milho foram coletadas aos quinze dias, para avaliações posteriores.

2.4. Análises Estatísticas

Em ambos os experimentos, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições por tratamento, cujo modelo

matemático pode ser descrito como: $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$, onde: Y_{ij} = resposta experimental medida na unidade experimental j submetida ao tratamento i; μ = média geral; t_i = efeito relativo ao tratamento i; e_{ij} = erro aleatório.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para a avaliação de todas as características. A diferença entre os tratamentos foi determinada pelo Teste de Média Tukey ($P < 0,05$).

Os dados apresentados na Figura 5 representam a média de três experimentos independentes e a porcentagem de estímulos normalizada em relação ao controle.

2.5. Avaliação do crescimento radicular

Os seguintes procedimentos foram realizados nos experimentos 1 e 2:

As plântulas foram coletadas para avaliação da área radicular e comprimento total utilizando o programa computacional para análise digital de imagens *DeltaT-Scan*TM (10 plantas por tratamento). Essa mesma amostra de raízes foi pesada após 72 horas em estufa com ventilação forçada a 65° C, utilizando-se balança analítica para determinação da massa seca. Outra amostra de raízes foi coletada e analisados individualmente (5 plantas por tratamento) os sítios de mitose e raízes emergidas conforme descrito em Canellas *et al.* (2002). A terceira amostra de raízes foi coletada e usada imediatamente, para o isolamento de vesículas, como descrito no item 2.6.

2.6. Purificação das vesículas de membrana plasmática

As vesículas de MP foram isoladas de raízes de plântulas de milho mediante a centrifugação diferencial como descrito por De Michelis e Spanswich (1986), com algumas modificações (Façanha e De Meis, 1995). Resumidamente, 10 g (massa fresca) de raízes de milho foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 20 mL de meio de extração gelado contendo 250 mM de sacarose, 10% de glicerol (m:v), 0,5% de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 0,2% de BSA (Albumina Sérica Bovina) (m:v) e 0,1 M de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano] -HCl, pH 8,0. As soluções-estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente

antes do uso, foram adicionados 150 mM de KCl, 2 mM de DTT (ditiotreitól) e 1 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). Na manipulação das raízes até a obtenção do homogenato, bem como nas centrifugações, a temperatura foi controlada a fim de que não excedesse 4°C. Além disso, o pH do tampão de extração foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,5-8,0. Após a maceração, o homogenato resultante foi filtrado através de quatro camadas de gaze e submetido à centrifugação numa centrífuga himac CP (HITACHI) a 8.000 g durante 15 minutos, para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 g por 15 minutos, numa ultracentrífuga himac CP 85b (HITACHI) utilizando o rotor P70 para o isolamento das mitocôndrias. O precipitado foi coletado e ressuspenso em 1 mL de solução-tampão (meio de ressuspensão: glicerol 15% (v:v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 mM de Tris-HCl pH 7,6 e EDTA 1 mM) e armazenado em freezer a -70°C. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação, agora a 100.000 g por 40 minutos. O precipitado dessa nova centrifugação, denominado fração microssomal, foi solubilizado novamente em meio de ressuspensão para imediata aplicação sobre o gradiente de sacarose. Foi aplicado 1 mL da suspensão contendo a fração microssomal sobre um gradiente descontínuo bifásico de sacarose (cada camada com volume de 1,5 mL) nas concentrações de 25/45% (m/m), contendo ainda: Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM. O gradiente foi submetido a uma centrifugação de 100.000 g num rotor SW40 (Himac), durante 90 minutos (ultracentrífuga himac CP 85b). Após a centrifugação, as vesículas entre as camadas 25 e 45% (MP) foram coletadas e utilizadas imediatamente ou congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -70° C antes do uso. A concentração de proteína total contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

2.6.1. Determinação da atividade ATPásica de membrana plasmática

A atividade ATPásica foi determinada pela medida da liberação de Pi segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarrow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada por meio da adição de ácido tricloroacético (TCA), gelado para uma concentração final de 10% (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo molibdato de amônio 2% em H₂SO₄ 2% + ácido ascórbico 1% (100:1) e, após 15 minutos, foi efetuada a leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Composição do meio de reação: 50 mM de Mops-Tris pH 6,5, 3 mM de MgCl₂, 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 50 µg de proteína. Cerca de 80-95% da atividade da H⁺-ATPase das vesículas medida foi inibida por 0,2 mM de vanadato, um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (De Michelis e Spanswick, 1986). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase foi medida a 30 °C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída à ATPase do tipo P.

2.6.2. Bombeamento de H⁺ da ATPase de membrana plasmática

O gradiente eletroquímico de H⁺ gerado pela H⁺-ATPase de MP foi estimado por meio do decréscimo de fluorescência da sonda sensível a pH 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA) (415/485 nm excitação/emissão), e expressa em porcentagem. O meio de reação foi composto de 10 mM de Mops-Tris (pH 6,5), 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, ACMA 2 µM e 50 µg de proteína. A reação foi desencadeada pela adição de ATP (1 mM). A adição, tanto de 3 µM FCCP quanto de 2 µM NH₄Cl acabou com o gradiente de H⁺ formado pela hidrólise de ATP.

3. RESULTADOS

3.1. Massa seca, comprimento e área superficial da raiz

Foi avaliado o efeito do AH e da afinina sobre o crescimento do milho através de plantas crescidas em hidroponia (experimento 1) e em areia (experimento 2) contendo diferentes concentrações dessas substâncias. As Figuras 4A e 4B apresentam o aspecto visual das plântulas de milho aos 7 e aos 15 dias de tratamento, respectivamente. No experimento 1, após 7 dias na solução, os tratamentos com solução de afinina na concentração de 10^{-8} e 10^{-6} M estimularam a produção de biomassa radicular (Figura 5). O tratamento com afinina na concentração de 10^{-4} M não produziu efeito algum sobre o crescimento da raiz nesta fase. As plântulas de milho tratadas com AH (20 mg C L^{-1}) apresentaram um forte estímulo no desenvolvimento radicular (Figura 5). No experimento 2, após 15 dias de crescimento em vasos com areia e adição de solução nutritiva, o tratamento 10^{-4} M de afinina também não produziu nenhum efeito no desenvolvimento radicular. Entretanto, as menores concentrações de afinina (10^{-6} M e 10^{-8} M) promoveram o desenvolvimento radicular por um aumento marcante na massa seca da raiz, comprimento total e área superficial. O uso de AH também estimulou o desenvolvimento radicular em quinze dias de experimento (Figura 5).

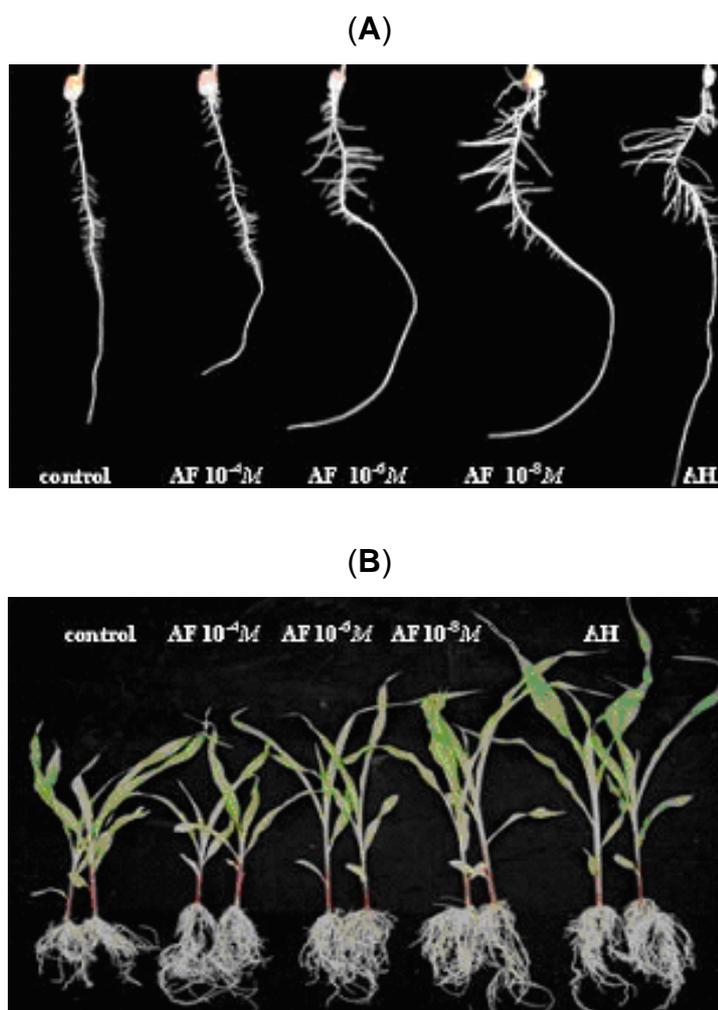


Figura 4. Aspecto visual das raízes de plântulas de milho tratadas com ácidos húmicos (AH) 20 mg de C L⁻¹ e diferentes concentrações de afininas (10⁻⁴, 10⁻⁶ e 10⁻⁸ M) coletadas aos sete dias em hidroponia (A) e aos quinze dias de tratamento em vasos com areia (B).

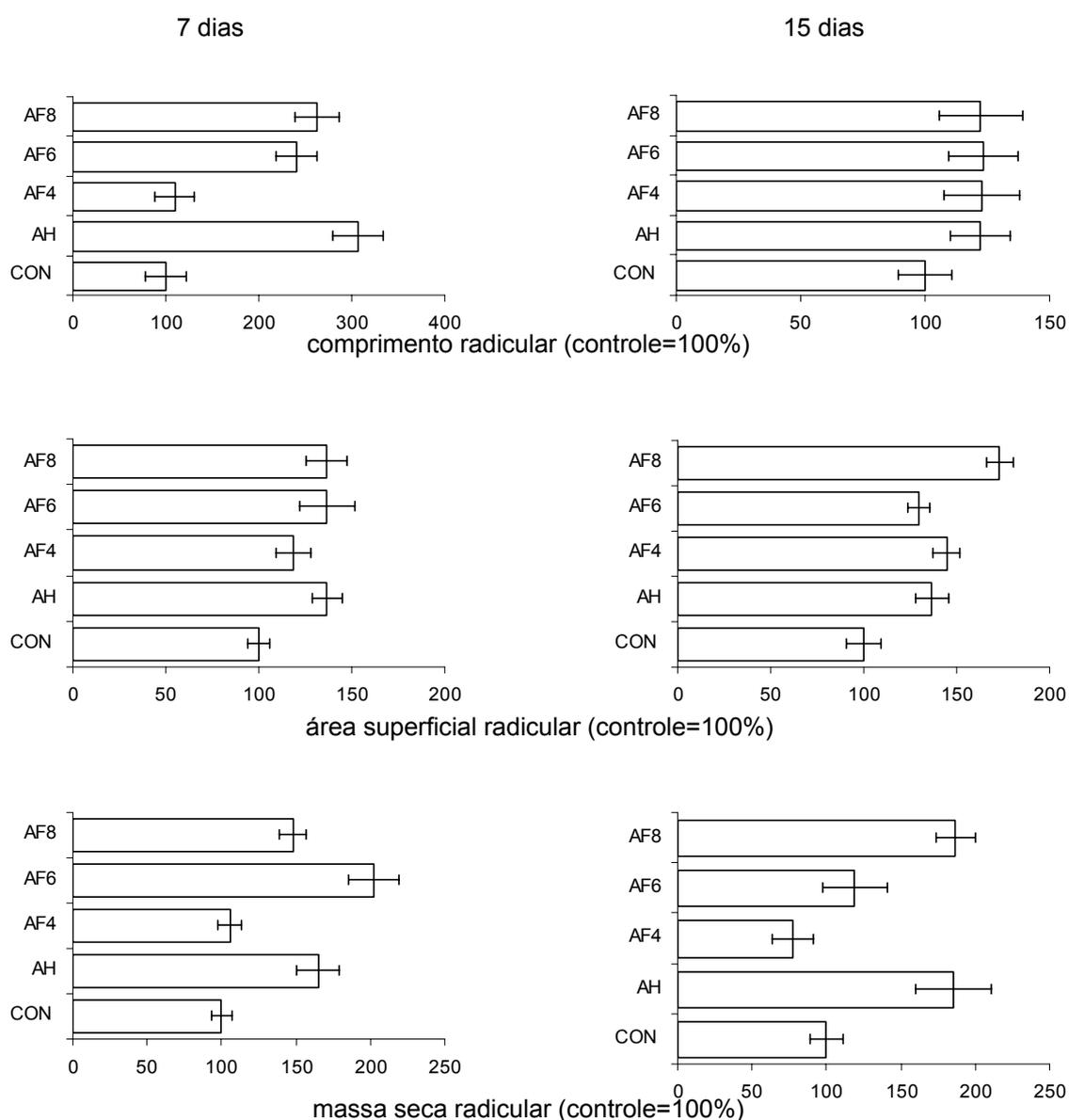


Figura 5. Efeito de ácidos húmicos (AH) 20 mg C L⁻¹ e diferentes concentrações de afininas (10⁻⁴, 10⁻⁶ e 10⁻⁸ M) sobre o comprimento, área superficial e massa seca de raízes de plântulas de milho analisadas pelo *software DeltaT-Scan*TM. O comprimento total é calculado através da soma do comprimento das raízes primária e lateral. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (100%) de médias normalizadas de três experimentos independentes realizados com plântulas de milho (10 por tratamento em cada caso) coletadas aos 7 e 15 dias de tratamento.

3.2. Sítios de mitose e raízes laterais emergidas

A zona de diferenciação e expansão da raiz é formada por células meristemáticas em constante atividade metabólica precursoras de raízes laterais (Janh *et al.*, 1998). Foi avaliado o desenvolvimento desses sítios de mitose na zona radicular tratada com afininas em concentrações diferentes e AH 20 mg C L⁻¹ durante 7 e 15 dias de crescimento das plântulas de milho em hidroponia e areia, respectivamente (Figura 6). Os tratamentos com as menores concentrações de afininas (10⁻⁶ M e 10⁻⁸ M) proporcionaram um estímulo semelhante ao observado no tratamento com AH isolados de vermicomposto. O estímulo apresentado aos 7 dias foi mantido nas plântulas de milho tratadas por 15 dias.

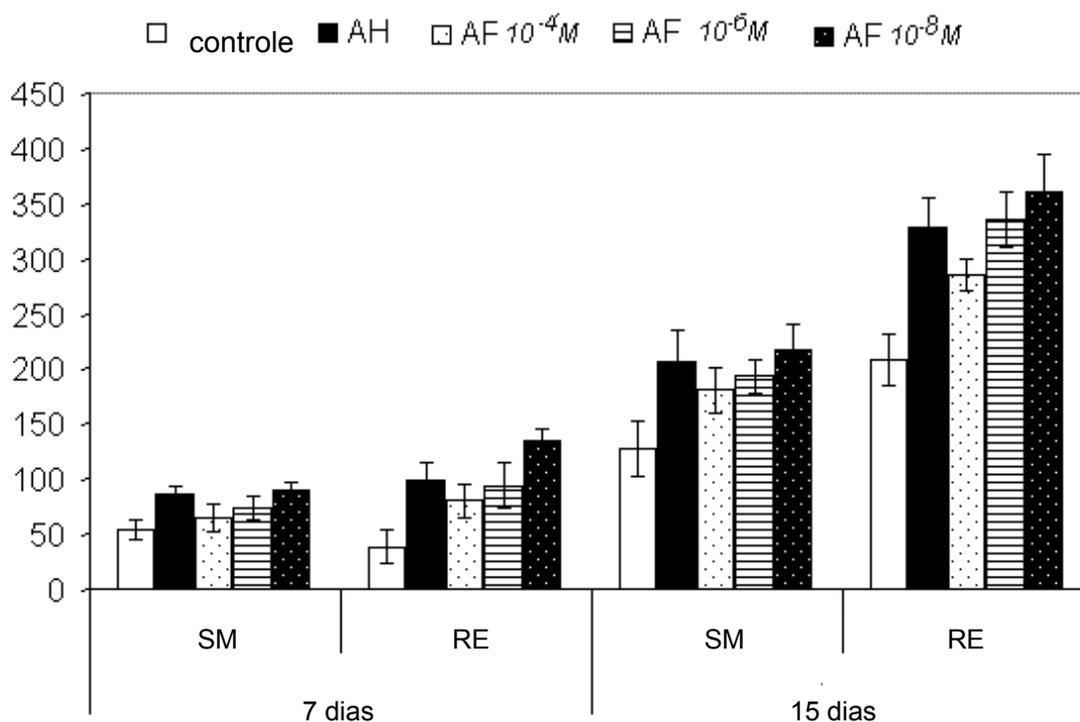


Figura 6. Efeito de ácidos húmicos (AH) 20 mg C L⁻¹ e diferentes concentrações de afininas (10⁻⁴, 10⁻⁶ e 10⁻⁸ M) sobre o crescimento radicular de plantas de milho tratadas durante 7 ou 15 dias, avaliado mediante quantificação dos sítios de mitose (SM) e raízes emergidas (RE). Os dados na coluna representam as médias de três experimentos \pm erro-padrão.

3.3. Bombeamento de H⁺ e hidrólise de ATP

As vesículas de MP isoladas das raízes de plântulas de milho tratadas por sete dias com 20 mg C L⁻¹ de AH e diferentes concentrações de afininas (10⁻⁴, 10⁻⁶ e 10⁻⁸ M) mostraram uma clara estimulação da atividade de hidrólise de ATP sensível ao vanadato (Figura 7A) acoplada ao transporte H⁺ dependente de ATP (Figura 8A). A atividade de hidrólise de ATP foi bastante estimulada no tratamento com AH (cerca de 350%, Figura 7A), enquanto a velocidade inicial e amplitude máxima da formação do gradiente de H⁺ foi três e quatro vezes maior, respectivamente, (Figura 8A). As afininas nas concentrações 10⁻⁶ e 10⁻⁸ M também estimularam a hidrólise de ATP e no bombeamento de H⁺, porém em menor magnitude do que os AH. As vesículas de MP isoladas das raízes de plântulas de milho tratadas por quinze dias (Figuras 7B e 8B) apresentaram respostas semelhantes às plantas tratadas por sete dias, porém numa menor magnitude. A hidrólise acoplada ao transporte de H⁺ mediados pela ATPase do tonoplasto pode ser afetada pelo estágio de desenvolvimento de plântulas de milho (Façanha e de Meis, 1998). É possível que tanto a hidrólise quanto o transporte de H⁺ tenham sido afetados pelo envelhecimento das plantas.

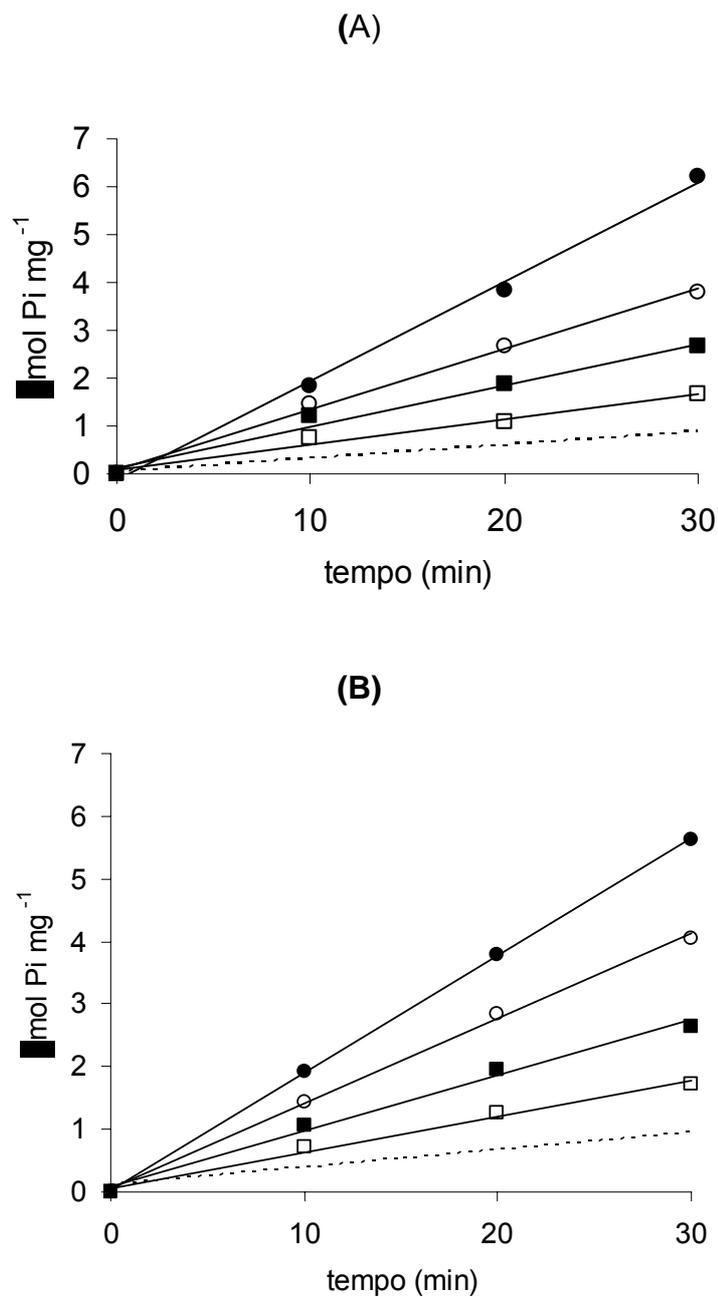


Figura 7. Efeito de ácidos húmicos (AH) 20 mg C L⁻¹ (●) e diferentes concentrações de afininas 10⁻⁸ (○), 10⁻⁶ (■) e 10⁻⁴ (□) M em relação ao controle (linha tracejada) sobre a atividade de hidrólise de ATP sensível a vanadato, medida em vesículas isoladas de raízes de milho tratadas ou não por 7 (A) ou 15 (B) dias.

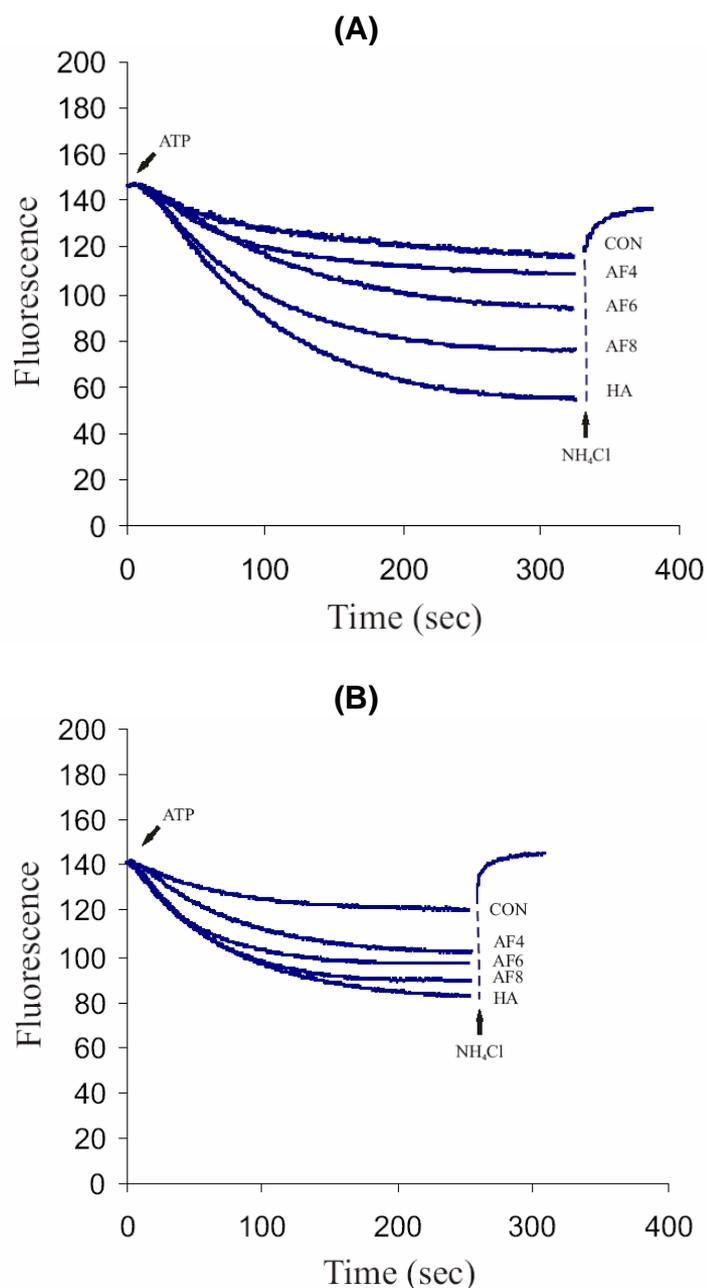


Figura 8. Efeito de ácidos húmicos (AH) 20 mg C L⁻¹ de e diferentes concentrações de afininas (10⁻⁴, 10⁻⁶ e 10⁻⁸ M) sobre a formação do gradiente de H⁺ promovido pela H⁺-ATPase de PM em vesículas isoladas de raízes de milho tratadas ou não durante sete **(A)** ou quinze **(B)** dias. O meio de reação conteve 10 mM Mops-Tris (pH 6,5), 3 mM MgSO₄, 100 mM KCl, 2 μM de ACMA e 50 μg de proteína. A reação foi iniciada com a adição de 1 mM ATP a 30°C. Após a estabilização do gradiente de H⁺, o protonóforo FCCP ou NH₄Cl foi adicionado levando à recuperação da fluorescência base.

4. DISCUSSÃO

A matéria orgânica humificada pode estimular diretamente o desenvolvimento vegetal através de uma ação do tipo auxínica (Mato *et al.*, 1972; Cacco e Dell'Agnola, 1984; Nardi *et al.*, 1991; Canellas *et al.*, 2002) que passa pelo estímulo das H⁺-ATPases de membrana plasmática (MP) (Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004). A H⁺-ATPase de MP desempenha um papel fundamental no metabolismo vegetal devido à energização de transportadores para a absorção de nutrientes e a acidificação do apoplasto (Sze, 1985; Morsomme e Boutry, 2000). Essa acidificação promove o afrouxamento da parede celular mediante a ação de enzimas ativadas em pH menor que 4,5, facilitando a expansão da célula (Cosgrove, 1998). As células meristemáticas localizadas na zona de expansão da raiz são formadoras de sítios de mitose precursores de raízes laterais, ricos em H⁺-ATPases de MP (Jahn *et al.*, 1998). O desenvolvimento dos pêlos radiculares tem um efeito direto sobre a área superficial das raízes. No entanto, uma série de trabalhos tem mostrado que as SH podem estimular os mais diversos tipos de eventos fisiológicos e bioquímicos independentemente da ação auxínica (Canellas *et al.*, 2005). Ramírez-Chávez *et al.* (2004) propuseram um mecanismo de estímulo do enraizamento lateral independente da ação das auxinas, mediado por uma nova classe de promotores de crescimento vegetal, as alquilamidas.

No presente trabalho, foi observado que tanto o AH como as menores concentrações de afinina ativaram a H⁺-ATPase de MP (Figuras 7 e 8) e induziram ao aumento do número de sítios de mitose e de raízes emergidas (Figura 6). Conseqüentemente, esses tratamentos exibiram maior área radicular (Figura 5). Ramírez-Chávez *et al.* (2004) relataram que afininas na faixa de 7×10^{-6} a $2,8 \times 10^{-5}$ M estimulam a formação de raízes laterais em *Arabidopsis* sem, no entanto, inibir o comprimento da raiz principal ou, até mesmo, estimulando-o, como no caso das menores concentrações (7×10^{-6} e $1,4 \times 10^{-5}$). Neste estudo, as afininas em menor concentração (10^{-6} e 10^{-8} M) foram tão eficientes quanto os AH na estimulação dessas características, principalmente aos 15 dias. De qualquer forma, a ativação enzimática promovida pelos AH foi mais pronunciada

(Figuras 7 e 8), indicando uma provável sinalização paralela, uma vez que inequivocamente, os AH operam a via de sinalização auxínica (Zandonadi *et al.*, 2005). Todavia, detectou-se, no atual experimento, a presença de afininas na solução de AH utilizada (Figuras 3 e 4). Uma importante semelhança no modo de ação das SH quando comparadas as afininas é que esses hormônios levam à formação de raízes laterais na mesma concentração que promovem o aumento do eixo principal das raízes (10^{-6} – 10^{-5} M), enquanto as auxinas induzem à formação de raízes laterais em concentrações que possuem um efeito inibitório sobre o crescimento do eixo principal das raízes (10^{-8} – 10^{-6} M). A afinina em alta concentração (10^{-4} M) não alterou o comprimento e a massa seca das raízes, mas estimulou a área radicular ligeiramente aos sete dias e, mais pronunciadamente, aos quinze dias (Figura 5). Foi demonstrado por Ramírez-Chávez *et al.* (2004) que a redução de 63% na raiz principal causada pelas afininas em alta concentração ($1,2 \times 10^{-4}$) deveu-se tanto à redução da divisão como a uma inibição do alongamento celular. Além disso, o comprimento e a área da raiz foram inibidos conjuntamente pelas concentrações mais altas de afinina. No presente trabalho, o estímulo sobre os sítios de mitose e raízes laterais emergidas (Figura 6), bem como a ativação das H^+ -ATPases pela afinina 10^{-4} M, foi o menor entre as concentrações de afininas utilizadas (Figuras 7 e 8).

As SH podem atuar em diversos processos da natureza, até mesmo naqueles importantes diretamente à saúde humana. As SH são utilizadas há séculos pela medicina tradicional dos países orientais no tratamento contra processos inflamatórios (Schepetkin *et al.*, 2002), ou utilizadas contra úlcera (Goel *et al.*, 1990). Existem ainda relatos do uso de AH no tratamento de alergias, ferimentos (Haanel, 1924), recomposição óssea (Tkachenco *et al.*, 1979) e supressão de infecção viral (Schneider *et al.*, 1996). Recentemente, foi confirmado, por meio da utilização de neutrófilos humanos *in vitro*, que os AH realmente podem atuar como agentes antiinflamatórios (Cromarty *et al.*, 2004). Além disso, a ação do tipo hormonal das SH foi relatada em anfíbios, através da expressão de RNA-m de receptores de estrógeno, culminando na alteração da proporção entre machos e fêmeas em ambiente aquático (Lutz *et al.*, 2004). Portanto, existem vias de ação das SH muito além das conhecidas nos vegetais. O estímulo do crescimento por outros hormônios além da auxina é uma possibilidade evidente.

A partir da concepção emergente da conformação supra-estrutural das SH, diferentes compostos de reconhecida capacidade de regulação e estimulação do crescimento vegetal podem estar fracamente unidos à supra-estrutura das SH e serem liberados para a solução do solo e para a absorção das plantas por uma simples variação de pH na interface das raízes decorrente, por exemplo, da exsudação de ácidos orgânicos, como experimentado por Façanha *et al.* (2002). Nardi *et al.* (2005) utilizaram exsudatos radiculares na extração de SH e observaram um aumento na atividade hormonal dessas substâncias, confirmando que a rizosfera pode alterar o arranjo das SH. Nesse contexto, as reações químicas resultantes da relação das plantas com a matéria orgânica humificada podem definir, de acordo com a necessidade da planta, qual a biomolécula a ser liberada da supraestrutura das SH.

Por fim, esse é o primeiro relato da ativação da H⁺-ATPase de MP por afininas. Provavelmente, a ativação dessa enzima é o último passo de uma cascata de sinalização, desencadeada por moléculas de alquilamidas também presentes na macroestrutura dos AH, que culmina no desenvolvimento radicular morfologicamente diferente do promovido pelas auxinas e que parece ser aditivo a este.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

As alquilamidas - uma nova classe de reguladores do crescimento vegetal - promovem a formação de raízes laterais e o alongamento de pêlos radiculares de maneira independente da via de sinalização auxínica, sem reduzir o comprimento da raiz principal, do mesmo modo que os ácidos húmicos. O objetivo desse trabalho foi explorar o possível envolvimento das afininas (N-isopropil-decanamida) no sistema primário de transporte de H⁺ em células radiculares de plântulas de milho. Os resultados foram comparados aos obtidos com plântulas tratadas com ácidos húmicos (AH) isolados de vermicomposto. A partir dos resultados, conclui-se que:

(i) as afininas aumentam a proliferação de raízes laterais e propiciam o crescimento radicular atribuídos, pelo menos em parte, ao aumento da atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática;

(ii) a concentração mais elevada de afinina (10⁻⁴ M) aumenta o crescimento radicular somente aos quinze dias;

(ii) as menores concentrações (10⁻⁶ M e 10⁻⁸ M) promovem o aumento do crescimento radicular aos sete e quinze dias de maneira similar aos resultados obtidos com AH.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology* 130, 1951-1957.

Canellas, L.P., Zandonadi, D.B., Médice, L.O., Peres, L.E.P., Olivares, F.L., Façanha, A.R. (2005) Bioatividade de substâncias húmicas – ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas. *In: Canellas, L.P., Santos, G.A., (eds.) Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, p. 238-239.

Cosgrove, D.J. (1998) Cell Wall Loosening by expansins, *Plant Physiology* 118:333-339.

Cromarty, A.D., van Rensburg, C.E.J. (2004) Humic acids as anti-inflammatory agents. *Humic substances and water and soil environment: proceedings 12th International meeting of humic substances*, São Pedro, São Paulo: IHSS, p. 469-471.

- Davies, P.J. (1995) *Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 833p.
- De Michelis, M.I., Spanswick, R.M. (1986) H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiology* 81:542-547.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology* 116:1487-1495.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiology* 108:241-246.
- Fiske, C.F., Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375.
- Frias, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Cullianez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A. e Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8:1533-1544.
- Goel, R.K., Banerjee, R.S., Acharya, S.B. (1990) Antiulcerogenic and anti-inflammatory studies of humic substances. *J. Ethnopharmacol.* 29:95-103.
- Haanel, B.F. (1924) Facts about peat. *Mines Brancu Publ.* 614.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta* 185:527-537.

- Hager, A., Menzel, H., Krauss, A. (1971) Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth. *Planta* 100:47–75
- Hofer, O., Greger, H., Robien, W., Werner, A. (1986) ^{13}C NMR and ^1H lanthanide induced shifts of naturally occurring alkamides with cyclic amides moieties: amides from *Achillea falcate*. *Tetrahedron Letters* 42:2707-2716.
- Jahn T., Baluska F., Michalke, W., Harper, J.F., Volkmann, D. (1998) Plasma membrane H^+ -ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiologia Plantarum* 104:311-316.
- Laskowski, M.J., Williams, M.E. Nusbaum, H.C., Sussex, I.M. (1995) Formation of lateral root-meristems is a 2-stage. *Process. Develop.* 121:3303-3310.
- Lutz, I., Opitz, R., Kloas, W., Ying, X., Steinberg, C.E.W. (2004) Endocrine disrupting effects of humic substances in amphibs: indications of the molecular mode of action. *Humic substances and water and soil environment: proceedings 12th International meeting of humic substances*, São Pedro, São Paulo: IHSS, p. 123-127.
- Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A and Vianello A. (2002). Physiological effects of humic substances in higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1527-1537.
- Palmgren, M.G., (2001) Plant plasma membrane H^+ -ATPase: powerhouses for nutrient uptake. *Annu Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 817-845.
- Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z. (1999) Modulation of NO_3^- uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Soil* 215:155-161.

- Quaggiotti S, Ruperti B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 55: 803-813.
- Ramírez-Chavez, E., Lopez-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., Molina-Torres, J. (2004) Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in arabidopsis. *Plant Physiology* 134:1058-1068.
- Rayle, D.L., Cleland, R. (1972) In-vitro acid-growth response-relation to in-vivo growth responses and auxin action. *Planta* 104:282-296.
- Rayle, D.L., Cleland, R. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99:1271-1274.
- Schneider, J., Weis, R., Manner, C., Kary, B., Werner, A., Seubert, B.J., Riede, U.N. (1996) Inhibition of HIV 1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone. *Virology*, 218: 389-395.
- Schepetkin, I., Khlebnikov, A., Kwon, B.S. (2002) Medical drugs from humus matter: focus on mumie. *Drug Development Research* 57:140-159.
- Sze, H., (1985) H⁺ translocating ATPases: advances using membranes vesicles. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 36:175-208.
- Thompson, M.J., Mandava, N.B., Flippen-Anderson, J.L., Worley, J.F., Dutky, S.R., Robbins, W.E., Lusby, W. (1979) Synthesis of brassinosteroids. New plant-growth promoting steroids. *Journal of Organic Chemistry*, 44:5002-5004.
- Tkachenco, S.S., Rutsikii, V.V., Grachev, I.R. (1979) Reparative regeneration of the bone tissue under the effect of mumie asyl. *Ortop. Traum. Protez.* 40:49-52.
- Tomic, S., Gabdoulline, R.R., Kojic'-Prodic', B., Wade, R.C. (1998) Classification of auxin plant hormones by interaction property similarity indices. *Journal of*

Computer-Aided Molecular Design, 12:63–79.

Visser, S.A., (1986) Effects of humic substances on plant growth. *In*: Burns, R.G., Dell`Agnola, G., Miele, S., Nardi, S., Savoini, G., Schnitzer, M., Sequi, P., Vaughan, D., Visser, S.A. (org.) *Humic substances: effect on soli and plants*. Milão:REDA edizione per l`agricoltura, p. 89-135.

Went, F.W. (1928) Wushstoff und wachstum *Rec. Trav. Need.* 25:1-116.

Zandonadi D.B., Pino-Nunes, L.E., Lima, J.E., Peres, L.E.P., Façanha, A.R., Canellas, L.P. (2005) Ácidos húmicos estimulam o desenvolvimento radicular através da via de transdução de sinal de auxina. *VI Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*, Rio de Janeiro: Embrapa Solos, p. 75-77.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A agricultura é uma atividade dependente dos processos ecológicos, mas os sistemas de manejo adotados vão de encontro às bases da Ecologia. Mesmo com a utilização exponencial de recursos não-renováveis para o aumento da produção de alimentos, o problema da fome persiste. Na realidade, o sistema de produção “moderno” adotado reflete uma imposição das relações econômicas guiadas pela lógica do lucro, cuja “voracidade arruinará a terra, deixando para trás apenas um deserto”. Mesmo antes do início do século XX, os nativos americanos assim alertaram o presidente dos EUA. Em sua carta, o índio da tribo *Duwamis*, afirmava: “Tudo quanto agride a terra, agride os filhos da terra. Não foi o homem que teceu a trama da vida: ele é meramente um fio da mesma. Tudo o que fizer a tram, a a si mesmo fará”. Na natureza, tudo está interligado e, nesse contexto, a matéria orgânica pode ser apresentada como a integradora dos processos ecológicos e parte fundamental da “trama da vida”. Os resultados apresentados neste trabalho contribuem para comprovação e importância da ação direta da matéria orgânica humificada (e.g. substâncias húmicas) sobre o crescimento das plantas. O conjunto dos dados fundamenta a tese da existência de um mecanismo para a bioatividade de ácidos húmicos onde moléculas com atividade hormonal presentes no seu arranjo supra-estrutural podem interagir com a célula vegetal, ativando os sistemas de transporte primários de H^+ e promovendo, assim, o desenvolvimento radicular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Bierman, P., Metzger, J.D., Lucht, C. (2005) Effect of vermicomposts produced from cattle, food waste and paper waste on growth and yield of peppers in the field. *Pedobiologia* 49: 297-306.
- Altieri, M. (2002) A evolução do pensamento agroecológico. In: Altieri, M. (ed.) *Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável*. Guaíba: Agropecuária, p. 21-51.
- Atiyeh, R.M., Lee, C.A., Edwards, C.A., Arancon, N.Q., Metzger, J.D. (2002) The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresourse Technology* 84:7-14.
- Bayer, C., Mielniczuk, J. (1999) Dinâmica e função da matéria orgânica. In: Santos, G.A., Camargo, F.A.O. (eds.) *Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Genesis, p. 13-16.
- Bertosa, B., Kojic'-Prodic, B., Wade, R.C., Ramek, M., Piperaki, S., Tsantili-Kakoulidou, A., Tomic, S. (2003) A new approach to predict the biological activity of molecules based on similarity of their interaction fields and the log P and log D values: application to auxins. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43:1532-1541.

- Blakely, L.M., Durham M., Evans T.A., Blakely, R.M. (1982) Experimental studies on lateral root-formation in radish seedling roots: I. General-methods, developmental stages, and spontaneous formation of laterals roots. *Bot. Gaz.* 143:341-352.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Briskin, D.P., Poole, R.J. (1983) Plasma membrane ATPase of red beet forms a phosphorylated intermediate. *Plant Physiology* 71:507–512.
- Cameron, R.S., Thornton, B.K., Swift, R.S., Posner, A.M. (1972) Molecular weight and shape of humic acids from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *J. Soil Sci.* 23:394-408.
- Canellas, L.P., Guridi, F., Santos, G.A., Rumjanek, V.M., Braz-Filho, R. (2001) Aumento da resolução de espectros de RMN ^{13}C com uso de $\text{KCl } 0,03 \text{ mol L}^{-1}$. *Química Nova* 24:131-132.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002a) 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., Santos, G.A., Moraes, A.A., Olivares, F.L., Rumjanek, V.M. (2000b) Avaliação das características de ácidos húmicos extraídos de resíduos urbanos I: métodos espectroscópicos (Uv-vis, IV, RMN ^{13}C -CP/MAS) e microscopia eletrônica de varredura. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 24:741-750.
- Canellas, L.P., Santos, G.A., Moraes, A.A., Rumjanek, V.M. (2000a) Avaliação das características de ácidos húmicos extraídos de resíduos urbanos II:

métodos termodegradativos (pirólise acoplada à cromatografia gasosa-espectrometria de massas). *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 24:751-754.

Canellas, L.P., Vellso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Guridi, F., Olivares, F.L., Santos, G.A., Braz-Filho, R. (2002b) Distribution of humified fractions and characteristics of the humic acids of an ultisol under cultivation of eucalyptus and sugar cane. *Terra* 20(4):371-381.

Canellas, L.P., Vellso, A.C.X., Santos, G.A., (2005) Modelos estruturais de substâncias húmicas. *In: Canellas, L.P., Santos, G.A., (eds.) Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, p. 47.

Canellas, L.P., Zandonadi, D.B., Médice, L.O., Peres, L.E.P., Olivares, F.I., Façanha, A.R. (2005) Bioatividade de substâncias húmicas – ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas. *In: Canellas, L.P., Santos, G.A., (eds.) Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, p. 238-239.

Caporal, F.R.; Costabeber, J.A. (1994) Por uma nova extensão rural: fugindo da obsolescência. *Reforma Agrária*:24(3,) 70-90.

Christian, M., Steffens, B., Schenck, D., Lüthen, H. (2003) The *diageotropica* mutation of tomato disrupts a signalling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. *Planta* 218:309–314.

Claussen, M., Lüthen, H., Böttger, M. Inside or outside? Localization of the receptor relevant to auxin-induced growth. (1996) *Physiologia plantarum* 98:861-867.

Cleland, R.E. (1995) Auxin and cell elongation. *In: Davies, P.J. (ed.) Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. The Netherlands:

Kluwer Academic Publishers, p. 214-225.

Coenen, C., Bierfreund, N., Lüthen, H., Neuhaus, G. (2002) Developmental regulation of H⁺-ATPase-dependent auxin responses in the *diageotropica* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiologia Plantarum*, 114, 461-471.

Conte, P., Piccolo, A. (1999) High pressure size exclusion chromatography (HPSEC) of humic substances. Molecular size, analytical parameters, and columns performance. *Chemosphere* 38:517–528.

Cosgrove, D.J. (1998) Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology* 118:333-339.

Cosgrove, D.J. (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:109-124.

Costabeber, J.A., Caporal, F.R. (2001) Referências tecnológicas para a agricultura familiar ecológica: a experiência da Região Centro-Serra do Rio Grande do Sul. In: Claro, S.A. (org.) *Referências Tecnológicas para a Agricultura Familiar Ecológica*. Porto Alegre: Emater/RS–Ascar, p. i-vii.

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

Davies, P.J. (1995) *Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 833p.

Dell'Agnola G., Nardi, S. (1987) Hormone-like effect and enhanced nitrate uptake induced by depolycondensated humic fractions obtained from *Allolobofora* and *A. caliginosa* faeces. *Biology and Fertility of Soils* 4:115–118.

- De Michelis, M.I., Spanswick, R.M. (1986) H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiology* 81:542-547.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Estelle, M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435:441-443.
- Engelbrecht, R., Von Wandruszka, R. (1994) Microorganization in dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.* 28:1934-1941.
- 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.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiology* 108:241-246.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology* 116:1487-1495.
- Fernández, X.S., Garcia, D.D. (2001) Desenvolvimento rural sustentável: uma perspectiva agroecológica. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável* 2(2):18-25.
- Frías, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Culiánez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and

induction by auxin in coleoptiles. *The Plant Cell* 8:1533-1544.

Giannini, J.L., Briskin, D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissues. *Plant Physiology* 84:613-618.

Gogarten, J.P., Fichmann, J., Braun, Y., Morgan, L., Styles, P., Taiz, S.L., DeLapp, K., Taiz, L. (1992) The use of antisense mRNA to inhibit the tonoplast H⁺-ATPase in carrot. *Plant Cell* 4:851-864.

Govindasmy, R., Chandrasekaran, S. (1992) Effect of humic substances on the growth, yield, and nutrient content of sugar cane. *The Science of Total Environment* 117/118:575-581.

Grisolia, C.K. (2005) Agrotóxicos. Mutações, câncer, e reprodução. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 392p.

Guminski, S. (1968) Present days view on physiological effects induced in plant organisms by humic compounds. *Soviet Soil Science* 9:1250-1255.

Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta* 185:527-537.

Hayes, M.H., Malcolm, R. (2001) Consideration of composition and aspects of the structures of humic substances. In: Hayes, M.H, Malcolm, R. (eds.) *Humic substances and chemical contaminants*. Madson: Soil Science Society of America, p. 3-39.

Hertel, R. (1995) Auxin binding protein 1 is a red herring. *Journal of Experimental Botany* 46:461-462.

- Hicks, G.R., Rayle, D.L., Lomax, T.L. (1989) The *diageotropica* mutant of tomato lacks high specific activity auxin binding sites. *Science* 245:52-54.
- Hofer, O., Greger, H., Robien, W., Werner, A. (1986) ^{13}C NMR and ^1H lanthanide induced shifts of naturally occurring alkalamides with cyclic amide moieties: amides from *Achillea falcata*. *Tetrahedron Letters* 42:2707-2716.
- Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gabel, M., Dröse, S., Zeeck, A., Altendorf, K., Wieczore, H. (2002) Concanamycin A, the Specific Inhibitor of V-ATPases, Binds to the V_o Subunit c. *The Journal of Biological Chemistry* 277(43):40544-40548.
- Jahn, T., Baluska, F., Michalke, W., Harper, J.F., Volkmann, D. (1998) Plasma membrane H^+ -ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiologia Plantarum* 104:311-316.
- Kageyama, A., Graziano, J.G. Produtividade e emprego na agricultura brasileira. (1983) In: Beluzzo, L.G. (ed.) *Desenvolvimento capitalista no Brasil*. São Paulo: Brasiliense.
- Katou, K., Okamoto, H. (1992). Symplast as a functional unit in plant growth. *Internatl. Rev. Cytol.* 142:263-304.
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., Forgac, M. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS* 545:76-85.
- Kögel-knaber, I., Zech, W., Hatcher, P.G. (1988) Chemical composition of the organic matter in forest soil II. The humus layer. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 151:331-340.

- Lal, R., Pirce, F. J. (1991) The vanishing resource, *In: Lal, R., Pirce, F. J. (eds.) Soil management for sustainability*. Ankeny: Soil and Water Conservation Society, p. 1-5.
- Lomax, T.L., Muday, G.K., Rubery, P.H. (1995) Auxin transport. *In: PJ Davies, (ed.) Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 509–530.
- Maeshima, M., Nakanishi, Y., Matsuura-Endo, C., Tanaka, Y., (1996) Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. *Journal of Plant Research* 109:119-125.
- Maeshima, M. (2000) Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:37-51.
- Marty, F. (1999) Plant Vacuoles. *The Plant Cell* 11:587–599.
- Masciandaro, G, Ceccanti, B, Garcia, C., (1999) Soil agro-ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores.Technol.* 59:199–206
- Mato, M.C., Olmedo, M.G., Méndez, J. (1972) Inhibition of Indoleacetic acid-oxidase by soil humic acids fractioned on sephadex. *Soil Biology and Biochemistry* 4:469-473.
- Maurel, C. (1997). Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:399–429.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y., Levy, A. (1997) A new model system for tomato genetics *The Plant Journal* 12:1465–1472.
- Mielniczuck, J., Bayer, C., Vezzani, F.M., Lovato, T., Fernandes, F.F., Debarba, L. (2003) Manejo do solo e culturas e sua relação com estoque de carbono e

nitrogênio do solo. *In: Curi et al., (eds.) Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa: SBCS, p. 209-248.

Moreno, J., L. (1996) *La Materia Orgánica en los Agrossistemas*. Madrid: Mundi-Prensa, 174.

Morsomme, P., Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:1-16.

Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F., Nardi, S. (1999) Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1303–1311.

Muday G.K., Lomax T.L., Rayle D.L. (1995) Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant *diageotropica*. *Planta* 195: 548-553.

Muscolo, A. Cutrupi, S., Nardi, S. (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biology and Biochemistry* 30:1199-1201.

Muscolo, A., Panuccio, A.R., Sidari, M., Nardi, S. (2005) The effects of humic substances on pinus callus are reversed by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Chemical Ecology* 31(3):577-590.

Nannipieri, P., Grego, S., Dell'Agnola, G., Nardi, S. (1993) Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. *In: Nannipieri, P (ed.): Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici e selvicolturali*. Bologna: Patron Editore, p.67-78.

Napier, R.M, David, K.M., Penot-Rechenmann, C. (2002) A short history of auxin-binding proteins. *Plant Molecular Biology* 49:339-348.

Nardi, S., Panuccio, M.R., Abenavoli, M.R., Muscolo, A. (1994) Auxin-like effect of humic substances from faeces of *allolobophora caliginosa* and *a. rosea*. *Soil*

Biology and Biochemistry 26:1341-1346.

Nardi, S., Morari, F., Berti, A., Tosoni, M., Giardini, L. (2004) Soil organic matter properties after 40 years of different use of organic and mineral fertilizers. *Europ. J. Agronomy* 21:357-367.

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.

Nelson, N. (1992) The vacuolar H⁺-ATPase - One of the most fundamental ion pumps in nature *Journal of Experimental Biology* 172:19-27.

Nishi, T., Forgac, M. (2003) The vacuolar (H⁺)-ATPases – Nature`s most versatile proton pumps. *Nature* 3:94-103.

O'Donnell, R.W. (1973) The auxin-like effects of humic preparations from leonardite. *Soil Science* 116(2):106-112.

Odum, E.P. (1988) Ciclos Biogeoquímicos. *In: Odum, E.P. Ecologia*. Editora Guanabara Koogan, p. 111-133.

Oono, Y., Chiharu, O., Rahman A., Asppuria, E.T., Hayashi, K., Tanaka, A., Uchimiya, H. (2003) *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in arabidopsis root. *Plant Physiology* 134:1135-1147.

Orlov, D.S. (1975) Molecular parameters of humic acids. *Geoderma* 13:211-229.

Orlov, D.S. (1998) Organic substances of Russian soils. *Eurasian Soil Science* 31:946-953.

Palmgren, M.G., (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPase: powerhouses for

- nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 817-845.
- Palmgren, M.G., (1991) Regulation of plant plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Physiologia Plantarum* 83: 314-323.
- Pedersen, P.L., Carafoli, E (1987) Ion motive ATPases I. Ubiquity properties and significance to cell function. *Trends in Biochemical Science* 12:146-150.
- Piccolo, A., Conte P., Cozzolino, A. (1999) Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular associations of dissolved humic substances. *European Journal of Soil Science* 50:687-694.
- Piccolo, A. (1996a) Humus and soil conservation, *In: Piccolo, A. (ed.) Humic substances in terrestrial ecosystems*. Amsterdam: Elsevier, p. 225-264.
- Piccolo, A. (1996b) Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. *Chemosphere* 33:595-600.
- Piccolo, A. (1997) A New insights on the conformation structure of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Polish Chapter of International Humic Substances Society, Wroclaw*: p. 19-36.
- Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, 75:57-133.
- Pimentel, D., Resosudarmo H. P., Sinclair, K., Kuiz, D., McNair, M., Crist, S., Shpritz, L., Fitton, L., Saffouri, R., Blair, R. (1995) *Science*, 227:1117-1123.
- Pinno-Nunes, L.E. (2005) Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em microtomateiro (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM). Tese (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Piracicaba - São Paulo, Escola Superior

de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 86p.

Pinton, R., Cesco, S., Santi S., Varanini Z. (1997) Soil humic substances stimulate protons release by intact oat seedling roots. *Journal of Plant Nutrition*, 20:857-869.

Pinton, R.; Varanini Z.; Vizzoto G., Maggioni A. (1992) Soil humic substances affect transport-properties of tonoplasto vesicles isolated from oat roots. *Plant and Soil* 142:203-210.

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.

Rea, P.A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum* 71:131-141.

Rayle, D.L., Cleland, R. (1972) In-vitro acid-growth response-relation to in-vivo growth responses and auxin action. *Planta* 104:282-296.

Ruck, A., Palme, K., Venis, M. A., Napier, R. M., Felle, R. H. (1993) Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin-binding protein in the auxin stimulation of plasma-membrane current in *Zea mays* protoplasts. *The Plant Journal* 4:41-46.

Santos, G.A., Camargo, F.A.O. (1999) *Fundamentos da matéria orgânica do solo*. 1^a ed. Porto Alegre: Gênese, 491p.

Schnitzer, M. (1991) Soil organic matter: the next 75 years. *Soil Science* 151:41-58.

Schumacher, K., Vafeados, D., McCarthy, M., Sze, H., Wilkins, Thea, Chory, J.

- (1999) The *Arabidopsis det3* mutant reveals a central role for the vacuolar H⁺-ATPase in plant growth and development. *Genes and Development* 13:3259–3270.
- Sesmou, K. (1992) A organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas: uma visão a partir de dentro *in*: Comeford, J.P. (trad.) *A fome no mundo: The ecologist versus FAO*. Rio de Janeiro: AS-PTA, p.11-31.
- Simpson, A.J. (2002) Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Res. Chem.* 40:572-582.
- Singh, R.B. (2000) Environmental consequences of agricultural development: a case study from the green revolution state of Haryana, India. *Agriculture Ecosystems and Environment* 82:97-103.
- Sondergaard, T. E., Schulz, A., Palmgren, M. G. (2004) Energization of Transport Processes in Plants. Roles of the Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology* 136:2475–2482.
- Steffens, B.; Feckler, C.; Palme, K.; Christian, M.; Böttger, M., Lüthen, H. (2001) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *The Plant Journal* 27:591-599.
- Stevenson, F.J. (1994) Biochemistry of the formation of humic substances. *In*: Stevenson, F.J, (ed.) *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*. 2. ed. New York: John Wiley e Sons Inc., p. 188–211.
- Sze, H. (1985) H⁺-translocating ATPases: advances using membranes vesicles. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 175-208.
- Sze, H., Ward, J. M., Lai, S., Perera, I. (1992) Vacuolar-type H⁺-translocating ATPases in plant endomembranes: subunit organization and multigene families. *Journal of Experimental Biology* 172:132-135.

- Taiz, L. (1992) The plant vacuole. *Journal of Experimental Biology* 172:113-122.
- Taiz, L. Zeiger, E. (2002) Auxins, *In: Taiz, L., Zeiger, E. (eds.) Plant Physiology*. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 543-589.
- Tanford, C. (1980) *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*. New York: Wiley.
- Toledo, V.M. (2002) Agroecología, sustentabilidad y reforma agraria: la superioridad de la pequeña producción familiar. *Agroecología e Desenvolvimento Rural Sustentável* 3:27-36.
- Tomic, S., Gabdoulline, R.R., Kojic'-Prodic', B., Wade, R.C. (1998) Classification of auxin plant hormones by interaction property similarity indices. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 12:63–79.
- Tu, S., Naghashi, G., Brouillette J.N (1987) Proton pumping kinetics and origin of nitrate inhibition of tonoplast-type H⁺-ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 256(2):625-637.
- Varanini, Z., Pinton, R., De Biase, M.G., Astolfi, S., Maggioni, A. (1993) Low molecular weight humic substances stimulate H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant and Soil* 153:61-69.
- Vaughan, D., Malcolm, R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological process. *In: Vaughan, D., Malcolm, R.E. (eds.), Soil Organic Matter and Biological Activity*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 37–75.
- Vaughan, D., Malcom, R.E., Ord, B.C. (1985) *In: Vaughan, D., Malcom, R.E. (eds.), Soil Organic Matter and Biological Activity*. Dordrecht: Martinus Kijhoff/Junk W, p. 78-108.

- Vesper, M.J., Kuss, C.L. (1990) Physiological evidence that the primary site of auxin action in maize coleoptiles is an intracellular site. *Planta* 182:486-491.
- Vivan, J.L. (1998) *Agricultura e florestas: Princípios de uma interação vital*. Guaíba: Agropecuária, 207 p.
- Wang, Y., Leigh, R.A., Kaestner, K.H., Sze, H. (1986) Eletrogenic H⁺-pumping pyrophosphatase in tonoplast vesicles of oat roots. *Plant Physiology* 81:497-502.
- Went, F.W. (1928) Wushstoff und wachstum. *Rec. Trav. Need.* 25:1-116.
- Wershaw, R.L. (1993) Model for humus in soil and sediments. *Environmental Science and Technology* 27(5):814-816.
- White, P.J. (1995) Bafilomycin A1 is a non-competitive inhibitor of the tonoplast H⁺-ATPase of maize coleoptiles. *Journal of Experimental Botany* 45:1397-1402.
- Zandonadi, D.B., Rodda, M.R.C., Marques Jr., R.B., Façanha, A.R., Canellas, L.P. (2003) Bioatividade de ácidos húmicos fracionados em sephadex. *V Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*, Curitiba, p. 44-46.
- Zazimalova, E., Napier, R.M. (2003) Points of regulation for auxin action. *Plant Cell Rep.* 21:625-634.