

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CIÊNCIA DO SOLO**

**TESE**

**Metabolismo do Nitrogênio e Atividade de Bombas de  
Prótons em Raízes Transgênicas com Ácido Húmico e  
Simbiose Micorrízica Arbuscular**

**Wallace Luís de Lima**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



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

**METABOLISMO DO NITROGÊNIO E ATIVIDADE DE BOMBAS DE  
PRÓTONS EM RAÍZES TRANSGÊNICAS COM ÁCIDO HÚMICO E  
SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR**

**WALLACE LUÍS DE LIMA**

*Sob a Orientação da Professora*

**Sonia Regina de Souza**

*e Co-orientação dos Professores*

**Manlio Silvestre Fernandes**

**e**

**Ricardo Luis Louro Berbara**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências** em Agronomia, Área de  
Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2008

633.4

L732m

T

Lima, Wallace Luís de, 1975-

Metabolismo do nitrogênio e atividade de bombas de prótons em raízes trangênicas com ácido húmico e simbiose micorrízica arbuscular / Wallace Luís de Lima - 2008.

173. : il.

Orientador: Sonia Regina de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 131-152


1. Raízes (Botânica) - Teses. 2. Micorriza - Teses. 3. Manjerição - Raízes - Teses. 4. Plantas - Efeito do nitrogênio - Teses. I. Souza, Sonia Regina de, 1962-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

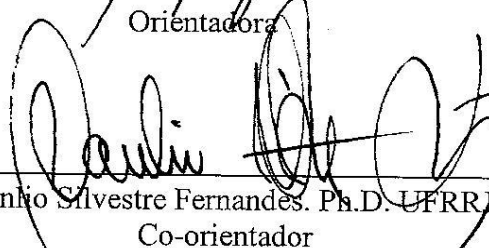
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**WALLACE LUIS DE LIMA**

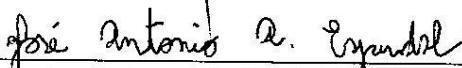
Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** em Agronomia.

TESE APROVADA EM 22/02/2008.

  
\_\_\_\_\_  
Sonia Regina de Souza. Dra. UFRRJ  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Manoel Silvestre Fernandes. Ph.D. UFRRJ  
Co-orientador

  
\_\_\_\_\_  
Gabriel de Araujo Santos. Ph.D. UFRRJ

  
\_\_\_\_\_  
José Antonio Azevedo Espíndola. Dr. Embrapa Agrobiologia

  
\_\_\_\_\_  
Altamiro Souza de Lima Ferraz Junior. Dr. UEMA

*A todos que me incentivaram e acreditaram na minha capacidade,  
especialmente à família que me acolheu, ao meu pai João Batista de Faria,  
à minha mãe Maria Madalena Resende de Faria,  
aos meus irmãos, amigos e entes queridos.*

*Dedico*

## **DIVULGAÇÃO DE SABERES**

Na verdade, necessitamos de textos simples para acompanhar e compreender os nossos próprios pensamentos, mormente quando se trata de idéias filosóficas que envolvem processos evolutivos e metas para alcançar que, muitas vezes, nos fogem às possibilidades de análise com o próprio raciocínio.

Allan Kardec (1804-1869)

## **LIÇÃO DE VIDA**

Existem as pessoas suaves, que sabem dosar a energia e tudo conseguem.

São criaturas que não falam muito, mas agem bastante.

Enquanto muitos ainda se encontram à mesa das discussões para a tomada de decisões, elas já se encontram a postos, agindo...

Aquele que é simples não tenta esconder o que é feio ou desperdício, porque em sua pureza esses traços inexistem.

Há realeza nas maneiras e graciosidade no comportamento, mas isto não rouba sua originalidade nem o compele à artificialidade!

## **O TEMPO**

Durante a busca da realização de seus sonhos procure tempo para fazer aquilo que mais gosta, estar com seus familiares, amigos e pessoas que lhe querem bem, porque para entender o valor de:

um ano: pergunte a um estudante que não passou nos exames finais.

um mês: pergunte a uma mãe que teve um filho prematuro.

uma semana: pergunte ao editor de uma revista semanal.

uma hora: pergunte aos apaixonados que estão esperando o momento do encontro.

um minuto: pergunte a uma pessoa que perdeu o trem, ônibus ou avião.

um segundo: pergunte a uma pessoa que sobreviveu a um acidente.

um milésimo de segundo: pergunte a uma pessoa que ganhou uma medalha de prata nas Olimpíadas.

O tempo não espera por ninguém, por isso valorize cada momento da vida, você irá apreciá-los ainda mais se puder dividi-los com alguém especial.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus por tudo.

À Universidade Federal Rural do Rio Janeiro pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES pelo apoio financeiro e ao CPGA-CS pela oportunidade.

Agradeço a minha orientadora, prof<sup>ª</sup>. Dra. Sonia Regina de Souza, pela sua orientação, ensinamentos neste desafio, pela sua compreensão e carisma durante estes anos “intermináveis” para conclusão deste trabalho. Muito obrigado.

Agradeço ao meu co-orientador, prof. Dr. Ricardo Luis Louro Berbara, pelos ensinamentos imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho. Foi um amigo incondicional. Obrigado por tudo.

Agradeço ao meu co-orientador prof. Dr. Manlio Silvestre Fernandes pela orientação e ensinamentos, sugestões e incentivo durante estes anos. Muito obrigado.

Agradeço ao prof. Dr. Gabriel de Araújo Santos pela orientação, enriquecendo muito este trabalho, principalmente pelo incentivo e pela sua amizade acima de tudo. Muito obrigado.

À minha família pela felicidade proporcionada e por sempre acreditar em mim, minha eterna gratidão pela compreensão, carinho, incentivo e pelo pouco tempo juntos durante a realização deste trabalho.

Ao meu pai Jerônimo Laurindo da Fonseca (*in memória*) e a minha mãe Maria Luz de Lima (*in memória*) que mesmo ausentes, eu tenho a certeza, que auxiliam nas minhas conquistas.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo pelo conhecimento e experiências transmitidos durante e após as aulas. Também pela convivência amigável. Obrigado.

Aos funcionários do Departamento de Solos pela amizade e cordialidade.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, pela troca de conhecimentos e experiências durante/após as aulas. Muito obrigado e sucesso a todos.

Aos amigos presentes e aos ausentes que contribuíram de certa forma, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Aos estagiários dos Laboratórios de Biologia do Solo/Matéria Orgânica e de Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ, que muito contribuíram na realização deste trabalho.

Agradeço aos pós-graduandos Mônica Malheiros, Natália Zatorre, Leandro Azevedo e Carlos Bucher, pelo auxílio nas coletas e análises laboratoriais. Muito obrigado.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Biologia dos Solos/Matéria Orgânica da UFRRJ, Hudson Guimarães, Sérgio Almeida, Leandro Figueiredo e Rafaell Lustrino, que contribuíram grandiosamente e não mediram esforços para a realização desta tese, sem os quais a realização deste trabalho seria comprometido. Muito obrigado.

Agradecimento especial à minha companheira Gisele pelo carinho, amizade, compreensão e grande colaboradora e incentivadora desta tese. Muito obrigado.

Aos companheiros de quarto, Sérgio André, Robson “Cadão”, Daian Albuquerque e Sérgio Ferreira que muito contribuíram na confecção desta tese e pelo companheirismo e bate-papo nestes anos de convivência. Valeu.

Aos amigos do alojamento da Pós-Graduação pela amizade e companheirismo. Obrigado e sucesso a todos.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.



## RESUMO GERAL

LIMA, Wallace Luís de. **Metabolismo do nitrogênio e atividade de bombas de prótons em raízes transgênicas com ácido húmico e simbiose micorrízica arbuscular**. 2008. 156f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

O objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos bioquímicos e morfológicos envolvidos na interação nitrogênio-micorrizas-ácido húmico (N-FMAs-AH) em raízes transformadas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.) crescidas “*in vitro*”. Para isso, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de ácido húmico, extraído de vermicomposto de esterco bovino, adicionado ao meio de cultivo das raízes, também foi avaliada a influência de concentrações distintas de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0 mmoles  $\text{L}^{-1}$ ), bem como a interação destes fatores em simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Foram realizados os seguintes experimentos: I) Produção e caracterização do ácido húmico; II) calibração da curva de resposta para ácidos húmicos, sendo avaliadas seis concentrações (10, 20, 40, 80, 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) no desenvolvimento de raízes transformadas de manjeriço aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR) realizada através de imagens digitais; III) avaliação das seis concentrações de AH aos 6 e 9 dias seguintes, em raízes de manjeriço e trevo; IV) Influência do  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0 mmoles  $\text{L}^{-1}$ ) em raízes de manjeriço e trevo após período de 72 horas em solução sem N e as avaliações realizadas às 0, 12, 24 e 48 seguintes horas; V) Influência da interação ácido húmico (10, 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) e  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0 mmoles  $\text{L}^{-1}$ ) em raízes de manjeriço e trevo aos 6, 9 e 15 DAR; VI) Influência da interação ácido húmico (20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH),  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0 mmoles  $\text{L}^{-1}$ ) e micorriza arbuscular *Glomus clarum* em raízes de manjeriço e trevo aos 30 DAR, sendo avaliado a atividade das bombas de prótons e no metabolismo do N (nos experimentos III, IV, V e VI). Foi observado que a concentração de 20  $\text{mg C L}^{-1}$  apresentou os melhores resultados no desenvolvimento das raízes e que concentrações superiores a 40  $\text{mg C L}^{-1}$  não proporcionaram indução significativas no desenvolvimento radicular. O AH influenciou, positivamente, a atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases,  $\text{V-H}^+$ -ATPases e  $\text{H}^+$ -PPases e no metabolismo do nitrogênio em ambas as raízes em todos os experimentos analisados. As raízes apresentaram maior influência da interação AH -  $\text{NO}_3^-$  na avaliação aos seis dias de contato para todas as avaliações realizadas, o que resultou em maiores teores de  $\text{N-NO}_3^-$  e N-amino no interior das células vegetais na avaliação de 9 dias. As raízes submetidas aos tratamentos com ácidos húmicos (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$ ), nas duas concentrações de nitrogênio apresentaram os maiores benefícios na atividade das bombas de prótons e no metabolismo do nitrogênio em todos os períodos de avaliação, confirmando a bioatividade dos ácidos húmicos. A adição de 20  $\text{mg C L}^{-1}$  estimulou a colonização de *Glomus clarum* e também na atividade das bombas de prótons ( $\text{P-H}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -PPase) e no metabolismo do nitrogênio nos tratamentos com baixas concentrações de nitrogênio (0,5 mmoles  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ ).

**Palavras chave:** Substâncias húmicas. Absorção radicular. Raízes em cabeleira.

## GENERAL ABSTRACT

LIMA, Wallace Luís de. **Nitrogen metabolism and proton pump activity in transgenics roots with humic acids and arbuscular mycorrhizal symbiosis**. 2008. 156f. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The objective of this study was to evaluate biochemical and morphologic aspects involved in the interaction nitrogen-mycorrhiza-humic acid (N-AMFs-HA) in transformed roots of basil (*Ocimum basilicum* L.) and clover (*Trifolium repens* L.) "in vitro". The effect of different concentrations of humic acid was evaluated, extracted of vermicompost of bovine manure, added to the root medium. The influence of different concentrations from N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was also evaluated (0.5 and 5.0 mmoles L<sup>-1</sup>) as the interaction of these factors with arbuscular mycorrhizal fungi (AMFs) symbiosis. The following experiments were developed: I) Production and characterization of humic acid; II) calibration of the curve for humic acids response with six concentrations (10, 20, 40, 80, 160 mg C L<sup>-1</sup> and control without HA) in the development of transformed roots of basil after 15, 30 and 45 days of growth (DAR) accomplished through digital images; III) evaluation of the six concentrations of HA in the 6 and 9 following days, in basil and clover roots; IV) Influence of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0.5 and 5.0 mmoles L<sup>-1</sup>) in roots of basil and clover after period of 72 hours in solution without N and the evaluations accomplished to the 0, 12, 24 and 48 following hours; V) Influence of the interaction humic acid (10, 20 mg C L<sup>-1</sup> and control without HA), and N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0.5 and 5.0 mmoles L<sup>-1</sup>) in basil and clover roots to the 6, 9 and 15 to DAR; VI) Influence of the interaction humic acid (20 mg C L<sup>-1</sup> and control without HA), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0.5 and 5.0 mmoles L<sup>-1</sup>) and arbuscular mycorrhiza *Glomus clarum* in basil and clover roots to the 30 DAR, with the activity of the proton pumps and the N metabolism (in the experiment III, IV, V and VI). It was observed that the concentration of 20 mg C L<sup>-1</sup> showed the best results in the development of the roots and higher concentrations of 40 mg C L<sup>-1</sup> didn't provide significant induction in the development of roots. The HA influenced, positively, the activity of P-H<sup>+</sup>-ATPases, V-H<sup>+</sup>-ATPases and H<sup>+</sup>-PPases and N metabolism in both roots in all experiments. The roots presented larger influence of the interaction HA - NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the evaluation after six days of contact for all the accomplished evaluations, which resulted in larger levels of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and N-amino inside the vegetable cells specially after 9 days. The roots submitted to the treatments with humic acids (10 and 20 mg C L<sup>-1</sup>), in two concentrations of nitrogen presented the largest benefits in the activity of the proton pumps and in N metabolism in all the evaluation periods. The addition of 20 mg C L<sup>-1</sup> stimulated the colonization of *Glomus clarum* and also in the activity of the proton pumps (P-H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase) and in the N metabolism in the treatments with low concentrations of nitrogen (0.5 mmoles L<sup>-1</sup> of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

**Key words:** Humic substances. Root absorption. Hairy roots.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier do ácido húmico (em intensidade de ondas  $\text{cm}^{-1}$ ) (as possíveis atribuições dos grupamentos funcionais referentes às letras de A a M são explicadas no texto)..... 33
- Figura 2.** Esquema do experimento realizado para avaliação dos efeitos proporcionados pela adição de ácido húmico (AH) (10; 20; 40; 80; 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) à solução de cultivo. As análises foram realizadas na montagem do experimento (dia zero), 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR). (MM= meio mínimo). ..... 42
- Figura 3.** Imagens digitalizadas das raízes transformadas de manjeriço submetidas aos diferentes tratamentos com ácido húmico (AH): 10, 20, 40, 80 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle (sem AH) obtidas no dia da montagem do experimento e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR). (n = 8). 46
- Figura 4.** Área radicular ( $\text{cm}^2$ ) das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM), enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem ácido húmico) nos dias de montagem do experimento e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR). Barras verticais indicam os erros padrões. (n = 8). Letras iguais no mesmo período de avaliação não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ..... 47
- Figura 5.** Comprimento radicular (cm) das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM), enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem ácido húmico) na montagem do experimento e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR). Barras verticais indicam os erros padrões. (n = 8). Letras iguais no mesmo período de avaliação não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 48
- Figura 6.** Correlação entre comprimento e área radicular das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM), submetidos as diferentes concentrações de ácido húmico (AH): controle (sem AH) (A), 10  $\text{mg C L}^{-1}$  (B), 20  $\text{mg C L}^{-1}$  (C), 40  $\text{mg C L}^{-1}$  (D), 80  $\text{mg C L}^{-1}$  (E) e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  (F) na montagem do experimento e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR) isoladamente (A, B, C, D, E, F), a junção de todos os tratamentos dentro dos períodos de avaliação (G) e a junção de todas as correlações em todos os períodos de avaliação (H). (n = 8). ..... 49
- Figura 7.** Área de modificação do pH rizosférico ( $\% \text{ cm}^2$ ) aos 30 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) modificado, enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) para a solução com indicador misto de pH na qual permaneceram por um período de cinco horas de contato. .... 50
- Figura 8.** Incremento na área radicular (%) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) modificado, enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) com as equações das regressões de 2º grau e os respectivos  $R^2$ . Barras verticais indicam os erros padrões. (n = 8). Letras iguais no mesmo período de avaliação não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 51
- Figura 9.** Incremento no comprimento radicular (% cm) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) modificado, enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem ácido húmico) com as equações das regressões lineares e os respectivos  $R^2$ . Barras verticais indicam os erros padrões. (n = 8). Letras iguais no mesmo período de avaliação não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 54

- Figura 10.** Correlação entre incremento do comprimento e área radicular das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM), submetidos as diferentes concentrações de ácido húmico, sendo: controle (sem AH) (A), 10 mg C L<sup>-1</sup> (B), 20 mg C L<sup>-1</sup> (C), 40 mg C L<sup>-1</sup> (D), 80 mg C L<sup>-1</sup> (E) e 160 mg C L<sup>-1</sup> (F) na montagem do experimento e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR) isoladamente (A, B, C, D, E, F), a junção de todos os tratamentos dentro dos períodos de avaliação (G) e a junção de todas as correlações em todos os períodos de avaliação (H). (n = 8)..... 56
- Figura 11.** Calibração da curva de resposta de ácido húmico para avaliar o crescimento radicular e área (A) e comprimento (B) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR) com as respectivas equações quadráticas e seus R<sup>2</sup> e a curva de regressão da área de modificação do pH rizosférico (C) com respectivo R<sup>2</sup> aos 30 dias após a repicagem (DAR), para a faixa de ácido húmico sugerida (10, 20, 40 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH). ..... 60
- Figura 12.** Calibração da curva de resposta de ácido húmico para avaliar o incremento radicular em área (A) e comprimento (B) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR) com as respectivas equações quadráticas e seus R<sup>2</sup>, para a faixa de ácido húmico sugerida (10, 20, 40 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH). ..... 61
- Figura 13.** Esquema do experimento realizado para avaliação dos efeitos proporcionados pela adição de ácido húmico (AH) (10; 20; 40; 80; 160 mg CL<sup>-1</sup> e controle sem AH) à solução de cultivo 30 dias após a repicagem (DAR) das raízes transformadas de manjeriço e trevo. As análises foram realizadas aos 6 e 9 dias após a montagem do experimento. (MM= meio mínimo)..... 67
- Figura 14.** Atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases (A e B), das V-H<sup>+</sup>-ATPases (C e D) e das H<sup>+</sup>-PPases (E e F) (μmolPi mg<sup>-1</sup>ptn min<sup>-1</sup>) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos 6 e 9 dias após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20; 40; 80; 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle). Detalhes nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 3..... 70
- Figura 15.** Teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (μmoles de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> de massa fresca) (A e B); atividade da nitrato redutase (μmoles N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca h<sup>-1</sup>) (C e D) e teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (μmoles N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos 6 e 9 dias após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20; 40; 80; 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 3. .... 72
- Figura 16.** Teores de açúcares solúveis (μmoles de açúcares solúveis g<sup>-1</sup> massa fresca) (A e B), de N amino livre (μmoles N amino livre g<sup>-1</sup> massa fresca) (C e D) e atividade da Glutamina Sintetase (ηmoles γ-glutamil g<sup>-1</sup> massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos 6 e 9 dias após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20; 40; 80; 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 3. .... 74
- Figura 17.** Esquema do experimento realizado para a avaliação da dinâmica de absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes transformadas de manjeriço e trevo cultivadas com 2,8 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> até os 30 dias após a repicagem (DAR) e submetidos, após 72 horas sem N, aos tratamentos com 0,5 ou 5,0 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As coletas foram realizadas às 0, 12, 24 e 48 horas seguintes..... 81
- Figura 18.** Atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases (A e B), das V-H<sup>+</sup>-ATPases (C e D) e das H<sup>+</sup>-PPases (E e F) (μmolPi mg<sup>-1</sup>ptn min<sup>-1</sup>) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) às 0, 12, 24 e 48 horas após um período de 72 horas sem N na solução, e submetidas a duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>). Detalhes nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 4..... 84

- Figura 19.** Teores de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\mu\text{moles de N-NO}_3^- \text{ g}^{-1}$  de massa fresca) (A e B); atividade da nitrato redutase ( $\mu\text{moles N-NO}_2^- \text{ g}^{-1}$  massa fresca  $\text{h}^{-1}$ ) (C e D) e teores de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\mu\text{moles N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$  massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriçao (A, C e E) e trevo (B, D e F) às 0, 12, 24 e 48 horas após um período de 72 horas sem N na solução, e submetidas a duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 4$ . ..... 86
- Figura 20.** Teores de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles de açúcares solúveis g}^{-1}$  massa fresca) (A e B), de N amino livre ( $\mu\text{moles N amino livre g}^{-1}$  massa fresca) (C e D) e atividade da Glutamina Sintetase ( $\eta\text{moles y-glutamil g}^{-1}$  massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriçao (A, C e E) e trevo (B, D e F) às 0, 12, 24 e 48 horas após um período de 72 horas sem N na solução, e submetidas a duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ). Detalhes no inserto na figura interna (C) com escala ajustada. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n=4$ . ..... 88
- Figura 21.** Esquema do experimento realizado para avaliação da atividade das bombas de prótons (P- $\text{H}^+$ -ATPase, V- $\text{H}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -PPase) e no metabolismo do nitrogênio nas raízes transformadas de manjeriçao e trevo cultivadas por 30 dias com 2,8  $\text{mmoles L}^{-1}$  até a montagem do experimento (30 DAR) no qual foram submetidas as diferentes concentrações de ácido húmico (10, 20  $\text{mg de C L}^{-1}$  e controle) e a duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ), sendo as análises realizadas aos 6, 9 e 15 dias seguintes. 94
- Figura 22.** Atividade das P- $\text{H}^+$ -ATPases ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjeriçao (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ . ..... 97
- Figura 23.** Atividade das V- $\text{H}^+$ -ATPases ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjeriçao (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Detalhes nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ . ..... 99
- Figura 24.** Atividade das  $\text{H}^+$ -PPases ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjeriçao (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Detalhes nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ . ..... 101
- Figura 25.** Teores de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\mu\text{moles de N-NO}_3^- \text{ g}^{-1}$  de massa fresca) nas raízes transformadas de manjeriçao (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ . ..... 102
- Figura 26.** Atividade da nitrato redutase ( $\mu\text{moles N-NO}_2^- \text{ g}^{-1}$  massa fresca  $\text{h}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjeriçao (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Detalhes nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ . ..... 104
- Figura 27.** Teores de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\mu\text{moles N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$  massa fresca) nas raízes transformadas de manjeriçao (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ . ..... 106

- Figura 28.** Teores de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles}$  de açúcares solúveis  $\text{g}^{-1}$  massa fresca) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ . ..... 108
- Figura 29.** Teores de N-amino livre ( $\mu\text{moles}$  N amino livre  $\text{g}^{-1}$  massa fresca) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ . ..... 110
- Figura 30.** Atividade da Glutamina Sintetase ( $\eta\text{moles } \gamma\text{-glutamil } \text{g}^{-1}$  massa fresca) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ . ..... 112
- Figura 31.** Formação, manutenção e funcionamento das estruturas fúngicas de *Glomus clarum* (*G.cla*) aos trinta dias após a repicagem (DAR) em raízes de trevo branco (*Trifolium repens* L.) (BERBARA, 1995) crescidas em placas Petri contendo meio mínimo (BÉCARD & FORTIN, 1988) enriquecido com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) com pH ajustado para 5,80. .... 119
- Figura 32.** Micélio extra-radicular de fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) *Glomus clarum* (*G.cla*) em raízes de trevo branco (*Trifolium repens* L.) (BERBARA, 1995) crescidas em placas Petri contendo meio mínimo (BÉCARD & FORTIN, 1988) com pH ajustado para 5,80 aos trinta dias após a repicagem (DAR). .... 120
- Figura 33.** Atividade das P- $\text{H}^+$ -ATPases (A e B), das V- $\text{H}^+$ -ATPases (C e D) e das  $\text{H}^+$ -PPases (E e F) ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) submetidas à interação de ácido húmico (20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH),  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ) colonizadas por *Glomus clarum* (*G.cla*) ou não (ñ col.). Detalhes nos insertos nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 4$ . ..... 121
- Figura 34.** Teores de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\mu\text{moles}$  de  $\text{N-NO}_3^- \text{ g}^{-1}$  de massa fresca) (A e B); atividade da nitrato redutase ( $\mu\text{moles N-NO}_2^- \text{ g}^{-1}$  massa fresca  $\text{h}^{-1}$ ) (C e D) e teores de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\mu\text{moles N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$  massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) submetidas à interação de ácido húmico (20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH),  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ) colonizadas por *Glomus clarum* (*G.cla*) ou não (ñ col.). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 4$ . ..... 123
- Figura 35.** Teores de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles}$  de açúcares solúveis  $\text{g}^{-1}$  massa fresca) (A e B), de N amino livre ( $\mu\text{moles}$  N amino livre  $\text{g}^{-1}$  massa fresca) (C e D) e atividade da Glutamina Sintetase ( $\eta\text{moles } \gamma\text{-glutamil } \text{g}^{-1}$  massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) submetidas à interação de ácido húmico (20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH),  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ) colonizadas por *Glomus clarum* (*G.cla*) ou não (ñ col.). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 4$ . 125
- Figura 36.** Colonização micorrízica (%) nas raízes transformadas de manjeriço (A) e trevo (B) aos 30 dias após a repicagem, submetidas aos tratamentos com ácido húmico (AH) (20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) e duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 4$ . ..... 127

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição elementar (% de C, H, N e O), das relações atômicas (C/N, H/C, O/C e $E_6/E_4$ ), grau de oxidação ( $\omega$ ) e acidez (total, carboxílica e fenólica) do ácido húmico extraído de vermicomposto utilizado nos experimentos. ....	31
<b>Tabela 2.</b> Principais atribuições das bandas de absorção dos espectros de infra-vermelho com transformada de Fourier (IV-TF) do ácido húmico (AH) de vermicomposto.....	34
<b>Tabela 3.</b> Composição do meio mínimo (MM) (BÉCARD & FORTIN, 1988) utilizado para o cultivo das raízes transformadas.....	42
<b>Tabela 4.</b> Meios utilizados para a avaliação do pH rizosférico.....	44
<b>Tabela 5.</b> Incremento na área radicular (% $\text{cm}^2$ ) em relação ao tratamento controle sem ácido húmico (100 %) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) modificado, enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 $\text{mg C L}^{-1}$ e controle sem ácido húmico) com seus respectivos erros padrões. (n = 8).....	52
<b>Tabela 6.</b> Incremento na área radicular (% $\text{cm}^2$ ) entre os períodos de avaliação de 0 a 15, de 15 a 30 e de 30 a 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 $\text{mg C L}^{-1}$ e controle sem ácido húmico) com seus respectivos erros padrões. (n = 8)..	53
<b>Tabela 7.</b> Incremento no comprimento radicular (% cm) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) modificado, enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 $\text{mg C L}^{-1}$ e controle sem ácido húmico) com seus respectivos erros padrões. (n = 8). ....	55
<b>Tabela 8.</b> Incremento no comprimento radicular (% cm) em relação ao controle sem ácido húmico (100 %) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM), enriquecido com ácido húmico (10, 20, 40, 80 e 160 $\text{mg C L}^{-1}$ e controle sem ácido húmico) com seus respectivos erros padrões. (n = 8). ....	57
<b>Tabela 9.</b> Incremento no comprimento radicular (% cm) entre os períodos de avaliação de 0 a 15, de 15 a 30 e de 30 a 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 $\text{mg C L}^{-1}$ e controle sem ácido húmico) com seus respectivos erros padrões. (n = 8)..	58
<b>Tabela 10.</b> Composição do meio mínimo (MM) modificado, utilizado para o cultivo das raízes transformadas de manjeriço e trevo, com as concentrações de $\text{N-NO}_3^-$ estudadas (0,5 e 5,0 $\text{mmol L}^{-1}$ ).....	82

## ABREVIACOES E SÍMBOLOS

H - Hidrognio  
H<sup>+</sup> - Próton  
ω - ndice de Oxidação  
μ - micro (em unidades de medidas)  
η - nano (em unidades de medidas)  
IH - ndice de Hidrofobicidade (resistência)  
IC - ndice de Condensação  
AH - cido Húmico  
AF - cido Fúlvico  
GS - Glutamina Sintetase  
GOGAT - Glutamato Sintase  
MM - Meio Mínimo  
MP - Membrana Plasmática  
NR - Nitrato Redutase  
NiR - Nitrito Redutase  
Pi - Fosfato Inorgânico  
PPi - Pirofosfato  
SH - Substâncias Húmicas  
ADP - Adenosina difosfato  
ATP - Adenosina trifosfato  
DAR - Dias Após Repicagem  
MOS - matéria orgânica do solo  
MOH - matéria orgânica humificada  
FMA - fungo micorrízico arbuscular  
E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> - ndice de Humificação  
RTs - raízes transformadas  
IV-TF - Infravermelho com Transformada de Fourier  
UV-Vis - Ultra-violeta Visível  
P-H<sup>+</sup>-ATPase - próton ATPase de membrana plasmática  
V-H<sup>+</sup>-ATPase - próton ATPase vacuolar  
H<sup>+</sup>-PPase - próton pirofosfatase vacuolar



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Metabolismo de Nitrogênio .....	4
2.2. Sistema de Absorção das Células - Bombas de Prótons (P-H <sup>+</sup> -ATPase; V-H <sup>+</sup> -ATPase e H <sup>+</sup> -PPase).....	6
2.2.1. P-H <sup>+</sup> -ATPase .....	8
2.2.2. V-H <sup>+</sup> -ATPase .....	9
2.2.3. H <sup>+</sup> -PPase.....	10
2.3. Raízes Geneticamente Modificadas: Sua Importância, Produção e Manutenção ....	10
2.4. Fungos Micorrízicos Arbusculares: Descrição e Histórico .....	13
2.4.1. Influência da disponibilidade de N e P na simbiose micorrízica.....	15
2.5. Matéria Orgânica do Solo: Formação, Estrutura e Caracterização .....	18
2.5.1. Dinâmica da absorção das frações solúveis da matéria orgânica.....	19
2.5.2. Papel das substâncias húmicas na absorção de íons da solução.....	20
2.5.3. Atividade biológica das substâncias húmicas.....	21
2.6. Influência das Substâncias Húmicas no Estabelecimento e Desenvolvimento da Simbiose Micorrízica.....	23
<b>CAPITULO I .....</b>	<b>24</b>
<b>PRODUÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO POR VERMICOMPOSTAGEM E SUA</b>	
<b>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESPECTROSCÓPICA.....</b>	<b>24</b>
RESUMO .....	25
ABSTRACT .....	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4. CONCLUSÕES .....	36
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>37</b>
<b>AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE RAÍZES TRANSFORMADAS DE</b>	
<b>MANJERICÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO HÚMICO ...</b>	<b>37</b>
RESUMO .....	38
ABSTRACT .....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1. Cultivo das Raízes Transformadas .....	42
2.2. Editoração de Imagens .....	43
2.3. pH Rizosférico.....	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
4. CONCLUSÕES .....	62

<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>63</b>
<b>INFLUÊNCIA DO ÁCIDO HÚMICO NA ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO E TREVO .....</b>	<b>63</b>
RESUMO .....	64
ABSTRACT .....	65
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
4. CONCLUSÕES .....	76
<b>CAPITULO IV.....</b>	<b>77</b>
<b>INFLUÊNCIA DO NITRATO NA ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO E TREVO .....</b>	<b>77</b>
RESUMO .....	78
ABSTRACT .....	79
1. INTRODUÇÃO.....	80
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	81
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	83
4. CONCLUSÕES .....	89
<b>CAPITULO V .....</b>	<b>90</b>
<b>INTERAÇÃO ÁCIDO HÚMICO - NITRATO NA ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO E TREVO .....</b>	<b>90</b>
RESUMO .....	91
ABSTRACT .....	92
1. INTRODUÇÃO.....	93
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	94
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	96
4. CONCLUSÕES .....	113
<b>CAPITULO VI.....</b>	<b>114</b>
<b>INTERAÇÃO ÁCIDO HÚMICO - NITRATO - MICORRIZA ARBUSCULAR NA ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO E TREVO..</b>	<b>114</b>
RESUMO .....	115
ABSTRACT .....	116
1. INTRODUÇÃO.....	117
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	118
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	119
4. CONCLUSÕES .....	128
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>129</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>130</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>153</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Na história da pesquisa científica com vegetais as raízes são, sem dúvida, o órgão das plantas menos estudado (WAISEL et al., 2002). Esta carência é surpreendente, uma vez considerada sua importância na sustentação física de plantas, na absorção de nutrientes e água, e nas interações planta-microrganismos, mas pode ser explicada pelas dificuldades metodológicas, sendo o solo o fator limitante, pela sua complexidade tridimensional e a sua variabilidade espaço-temporal (ZONTA et al., 2006). Entretanto, a cultura de raízes isoladas de plantas e o desenvolvimento da transferência de DNA de *Agrobacterium* para plantas visando à produção de raízes transformadas geneticamente constituem-se dois importantes campos de estudos (GUILLON et al. 2006; BERBARA & FONSECA, 1996; FLORES & CURTIS, 1992).

A possibilidade de utilização de raízes transformadas, também chamadas de raízes em cabeleira (hairy roots) cultivadas “*in vitro*” tem sido proposta para a ontogenia dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), para o estudo do processo de colonização radicular e, especificamente, para identificação dos compostos produzidos antes, durante e após o estabelecimento da simbiose (AZCON-AGUILAR & BAREA, 1991). O uso de culturas de FMAs nestas raízes também permite avaliar interações metabólicas. Esta estratégia possibilita minimizar os efeitos das variáveis ambientais envolvidas na simbiose permitindo estudar o efeito de alguns eventos separadamente, como é o caso das substâncias húmicas (SH).

Os meios nutritivos que são utilizados para o cultivo de vegetais em sistemas “*in vitro*”, no todo ou em partes, foram desenvolvidos para fornecerem os nutrientes essenciais para o crescimento das plantas, em quantidades e proporções adequadas, os quais representariam à fertilidade ideal dos solos. O nitrogênio (N) é o elemento requerido em maiores quantidades e o que mais frequentemente limita o crescimento. Sua deficiência resulta em raquitismo da planta, clorose gradual das folhas mais velhas, seguida por abscisão, dentre outras. A importância do N pode ser explicada uma vez que cerca de 90% do N-total das plantas encontram-se na forma orgânica e desempenha funções estruturais importantes como a de constituintes de macromoléculas, enzimas, proteínas, ácidos nucléicos e muitos outros constituintes celulares, incluindo membranas e diversos hormônios vegetais (WILLIAMS & MILLER, 2001).

No solo o N está disponível em diversas formas, incluindo  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , aminoácidos, peptídios solúveis e formas complexas insolúveis. Esta diversidade de formas é importante pela variedade de espécies de plantas que diferem entre si na preferência por fontes de N, absorvendo-o primariamente em formas inorgânicas como  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , via sistema radicular (WILLIAMS & MILLER, 2001). Em condições de solo fértil e neutro, a maior parte do nitrogênio absorvido pelas plantas está na forma nítrica, face à conversão do amônio a nitrato ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$ ) por bactérias nitrificadoras, já o  $\text{NH}_4^+$  torna-se disponível para as plantas somente após a mineralização do N, oriundo de resíduos orgânicos do solo, pela ação das bactérias amonificadoras (STEVENSON & COLE, 1999).

Apesar do  $\text{NO}_3^-$  ser mais móvel e, assim, prontamente disponível para as plantas, a sua disponibilidade pode ser reduzido pelos processos de denitrificação e lixiviação. Embora os íons  $\text{NH}_4^+$  sejam relativamente imóveis devido a sua atração por sítios de troca catiônica das partículas do solo, estes podem ser os mais disponíveis em solos com pH baixo e submetidos a maiores precipitações (STEVENSON & COLE, 1999). O  $\text{NO}_3^-$  necessita ser reduzido a  $\text{NH}_4^+$  antes de ser incorporado às cadeias carbônicas para síntese de aminoácidos e outros metabólitos. Normalmente, todo  $\text{NH}_4^+$  absorvido pelas plantas é rapidamente assimilado nas raízes. Entretanto, muito mais energia é requerida para a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  do que para  $\text{NH}_4^+$ .

O  $\text{NO}_3^-$  é considerado a fonte de N mineral mais importante para o crescimento das plantas em solos aeróbicos. As plantas adquirem  $\text{NO}_3^-$  da solução do solo, absorvendo-o através de transportadores específicos localizados na membrana plasmática (MP) das células da epiderme e do córtex da raiz. Uma vez no interior da célula, o  $\text{NO}_3^-$  pode ser reduzido ou estocado no vacúolo. O primeiro passo na redução é realizado no citossol pela enzima nitrato redutase (NR) produzindo nitrito, que entra no plastídeo (cloroplasto na parte aérea) e é reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela enzima nitrito redutase (NiR). O  $\text{NH}_4^+$  é transformado pelo sistema GS/GOGAT em aminoácido (glutamina/ glutamato) os quais servem como substrato para reações de transaminação para produzir os outros aminoácidos (TISCHNER, 2000).

O suprimento de N na forma de sais inorgânicos de  $\text{NH}_4^+$  para o cultivo de células, geralmente apresenta sintomas de toxidez (GAMBORG, 1970; GAMBORG & SHYLUK, 1970). Uma alternativa para o uso de  $\text{NH}_4^+$  como única fonte de N, é a utilização desse nutriente na forma de sal de um ácido orgânico, sendo indicado neste caso um ácido do Ciclo de Krebs, como o alfa-cetoglutarato ou o citrato (YATAZAMA & FURUHASHI, 1968; GAMBORG & SHYLUK, 1970; LINDSEY, 1998; SOUZA et al., 2002) apresentando um efeito diferencial sob o crescimento de células, dependendo da concentração usada, da fonte de N e do tipo de célula (FUKUNAGA et al., 1978).

O  $\text{NO}_3^-$ , fornecido como única fonte de N, apresenta uma excelente resposta de crescimento em várias culturas, sendo recomendado para tabaco (MATSUMOTO et al., 1971), trevo branco (SCHONTZ et al., 1989), brássica (LAINÉ et al., 1995) e forrageiras (ABREU & MONTEIRO, 1998). Porém, altas taxas de crescimento ocorrem em meio de cultura que fornece o suprimento de N através de uma mistura de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , quando consideradas concentrações adequadas na mistura. Numa solução onde a concentração de  $\text{NH}_4^+$  é alta (inibitória) e a concentração de  $\text{NO}_3^-$  é baixa, o crescimento vegetal pode ser favorecido quando a concentração de  $\text{NO}_3^-$  for aumentada (VALE et al., 1998; OJIMA & OHIRA, 1978; CALDAS & CALDAS, 1976). O meio MS de MURASHIGE & SKOOG (1962), que contém  $66 \text{ mg L}^{-1}$  de N- $\text{NO}_3^-$  e  $34 \text{ mg L}^{-1}$  de N- $\text{NH}_4^+$ , é um exemplo da mistura das duas fontes de N que é utilizada para o cultivo de células e tecidos vegetais em sistemas “*in vitro*” (SOUZA et al., 2007; SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2002).

Os estudos de assimilação de N em plantas superiores vêm sendo desenvolvidos em diferentes espécies vegetais com diversos objetivos, tais como: formas de N mais absorvidas; como diferentes fontes de N são assimiladas; quais as enzimas envolvidas na assimilação; a localização de cada uma dessas; os fatores que influenciam na atividade de cada enzima; os mecanismos que desencadeiam esses processos, dentre outros. As plantas utilizadas nestes trabalhos são, em sua maioria, cultivadas no solo e expostas a distintas influências ambientais. Outras técnicas utilizam o cultivo “*in vitro*”, com planta inteira ou apenas com raízes geneticamente transformadas (hairy roots) (GUILLON et al. 2006; SOUZA et al., 2002; BERBARA et al., 2001; BERBARA, 1995; BECARD & FORTIN, 1988; MUGNIER & MOSSE, 1987).

Dentre as diversas possibilidades de estudos com raízes transformadas de espécies vegetais, o seu cultivo também é proposto para a simbiose raiz-micorriza nas diferentes fases da associação em condições controladas. Porém, a propagação de raízes requer o uso de um meio de cultura específico para cada espécie, com um equilíbrio adequado dos nutrientes que o compõe, principalmente N, o que proporciona condições favoráveis para o seu crescimento.

O aumento da plasticidade da parede celular através da acidificação do apoplasto é fator fundamental para o crescimento e alongação da célula vegetal (COSGROVE, 1997). De acordo com este princípio, relacionado com a teoria do crescimento ácido, existe um aumento na extrusão de prótons pela  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática (MP), ativando enzimas específicas que atuam na plasticidade e alongamento celular (RAYLE e CLELAND, 1992). Este aumento da extrusão de prótons, teoricamente, pode afetar também as hifas fúngicas, proporcionando um

acrécimo em seu desenvolvimento e, conseqüentemente, uma maior taxa de colonização radicular, proporcionando melhorias na absorção de nutrientes e água para as plantas e conseqüentemente afetando positivamente na ativação da H<sup>+</sup>-ATPase da MP (RAMOS et al., 2005).

Alterações bioquímicas, no fungo e no hospedeiro, ocorrem não somente durante o desenvolvimento de arbúsculos, mas também durante o processo de colonização intraradicular de maneira geral. Evidências de alterações do metabolismo do fungo são dadas pela atividade e localização de H<sup>+</sup>-ATPases (CAVENDER et al., 1999), e atividade de fosfatase alcalina vacuolar (VARANINI et al., 1993). Estas enzimas são afetadas positivamente pela ação das substâncias húmicas (NANNIPIERI et al., 1993) e é possível que este efeito também proporcione melhoria para a formação da simbiose micorrízica.

O estudo da interação AH-fungos micorrízicos pode abrir uma nova frente de pesquisa para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos para a agricultura, uma vez que o efeito do AH sobre a colonização de raízes é um aspecto fundamental para a otimização da simbiose e a preparação de substratos mais eficientes, como alternativas para incrementar a absorção de nutrientes pelas plantas sem que haja a necessidade de suplementação com fertilizantes.

No conjunto das substâncias húmicas existe uma fração, que foi escolhida como objeto de estudo neste trabalho denominada de ácidos húmicos apresenta uma peculiaridade importante. São compostos humificados estáveis, ou seja, de difícil degradação, mas reativos. São considerados polieletrólitos de ácidos fracos que interagem com o meio circundante interferindo tanto nas propriedades químicas como nas físicas e ainda, sobre a atividade biológica do solo, porém a faixa de concentrações que melhor induzem benefícios para o desenvolvimento das culturas ainda permanece sem respostas conclusivas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos bioquímicos e morfológicos envolvidos na interação nitrogênio-micorrizas-ácido húmico em raízes transformadas (hairy roots) de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.). Para isso, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de ácido húmico, extraído de vermicomposto, adicionado ao meio de cultivo das raízes transformadas, também foi avaliada a influência de concentrações distintas de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>), bem como a interação destes fatores em simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Metabolismo de Nitrogênio

Os elementos provenientes da desintegração das rochas são captados pelas plantas a partir do solo, além daqueles obtidos diretamente da atmosfera (carbono sob a forma de dióxido de carbono) e da água do solo (hidrogênio e oxigênio). O nitrogênio (N) representa 78% da atmosfera terrestre, entretanto, a maioria dos seres vivos é incapaz de utilizar o nitrogênio atmosférico para sintetizar proteínas e outras substâncias orgânicas. (ao contrário do carbono e do oxigênio, o nitrogênio é muito pouco reativo do ponto de vista químico, e apenas algumas bactérias e algas azuis possuem a capacidade altamente especializada de assimilar o nitrogênio da atmosfera e convertê-lo numa forma que pode ser usada pelas células). A deficiência de nitrogênio assimilável constitui muitas vezes, o principal fator limitante ao crescimento vegetal.

O nitrogênio é constituinte de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, e participa direta e indiretamente de diversos processos nas plantas, dentre eles a divisão celular e a constituição de tecidos, das moléculas de clorofilas, citocromos e de proteínas e coenzimas, além de ser o elemento encontrado em maior quantidade nas plantas, depois do H, C e O, e ser constituinte de ácidos nucleicos responsáveis pela transferência da informação genética (ARIMA, 1995).

As plantas superiores são capazes de absorver o N tanto na forma orgânica (aminoácidos, uréia, citrato) como inorgânica (amônio e nitrato) (ABREU & MONTEIRO, 1998). O nitrato é prontamente absorvido e convertido a  $\text{NH}_4^+$  por enzimas e, em contato com esqueletos de carbono, forma as amidas e aminoácidos, passando então da forma inorgânica para a orgânica (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995).

A disponibilidade de N para os vegetais em sistemas naturais ocorre principalmente pela mineralização da matéria orgânica do solo (ciclagem de nutrientes), haja visto o pequeno conteúdo desse nutriente nos minerais do solo. Apesar disso, a maior parte do N do solo encontra-se em frações cuja mineralização é bastante lenta (húmus), sendo mineralizado (disponibilizado para a absorção pelas raízes) apenas 2 a 3% do N total do solo a cada ano. Esta fração mineralizável está ainda sujeita a perda por lixiviação, volatilização e denitrificação, além da imobilização e fixação por partículas do solo.

A capacidade de troca catiônica do solo faz com que o  $\text{NH}_4^+$  tenha pouca mobilidade no perfil, ao contrário do  $\text{NO}_3^-$ . Como no solo o  $\text{NH}_4^+$  é transformado em  $\text{NO}_3^-$  pelo processo de nitrificação, o  $\text{NO}_3^-$  torna-se a forma predominante de N para muitas plantas. Por sua alta mobilidade no solo, o N tem sido estudado intensamente com o propósito de maximizar a eficiência de seu uso. Para tanto, tem-se buscado reduzir sua perda no solo e melhorar sua absorção pelas plantas (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000).

Os fatores que afetam o crescimento da planta também influenciam a absorção e a assimilação do N (SMART & BLOOMM, 1993). Esse nutriente é absorvido e assimilado, por meio de processos com alto custo energético, em aminoácidos, proteínas e enzimas necessárias à síntese da massa seca. Embora a célula vegetal apresente elevada capacidade de armazenamento de nitrato no vacúolo, as quantidades estocadas são baixas quando comparadas com a demanda para o crescimento (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Tanto o nitrato quanto o amônio (presente em solução na forma do íon amônio) são prontamente utilizados pela planta, embora na maioria dos solos, o  $\text{NH}_4^+$  seja rapidamente oxidado a  $\text{NO}_3^-$  por bactérias nitrificadoras. O  $\text{NH}_4^+$  prevalece em solos ácidos com vegetação cujas raízes exudam inibidores do processo de nitrificação, como planícies de gramíneas e

florestas de coníferas. A nitrificação também é prejudicada em solos compactados ou alagados, em função da baixa disponibilidade de oxigênio. O  $\text{NH}_4^+$  do solo é resultante da fixação biológica de nitrogênio (FBN) ou da degradação da matéria orgânica.

Para absorver o  $\text{NO}_3^-$  existem dois sistemas de transporte na membrana celular: o de alta afinidade (HATS - high affinity transport system) e o de baixa afinidade (LATS - low affinity transport system) (GLASS et al., 2001; FORDE, 2000). O transporte através destes sistemas é regulado pela quantidade de nutriente disponível à planta. Os HATS funcionam quando a concentração de  $\text{NO}_3^-$  na solução (do solo ou nutritiva) é baixa, e os LATS, quando a concentração é alta.

O N transportado para o citossol está absorvido, porém ainda não foi assimilado. O N na planta pode ser distribuído por todas as partes, pois este nutriente é móvel nos vegetais. Esse fato confere a planta clorose nas folhas mais velhas, em condições de deficiência de N.

Uma vez no interior da célula, o  $\text{NO}_3^-$  absorvido pode ser reduzido a  $\text{NO}_2^-$  e depois a  $\text{NH}_4^+$ , armazenado no vacúolo ou exportado pelos vasos condutores para as regiões de consumo na parte aérea, porém, para ser assimilado deve ser reduzido a  $\text{NH}_4^+$ . Enquanto o  $\text{NH}_4^+$  absorvido já está na forma apta a ser incorporada a esqueletos de carbono deve ser rapidamente assimilado, ou seja, incorporado a uma molécula (esqueleto de carbono).

O processo de redução do  $\text{NO}_3^-$  ocorre no citossol, enquanto a incorporação em esqueletos de carbono do  $\text{NH}_4^+$  pode ocorrer no citossol ou nos cloroplastos e plastídios. Estes processos se dão em locais diferentes em função da localização das enzimas responsáveis. A redução do  $\text{NO}_3^-$  a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) inicia no citossol pela enzima nitrato redutase (NR). A elevada atividade da NR implica em grande demanda de poder redutor e na mobilização de esqueletos de carbono (SOUZA et al., 1999).

A NR é uma enzima de importância fundamental no processo de assimilação de N pelas plantas e tem atividade mais forte nas folhas durante o período luminoso. O estado típico de ativação na luz é de aproximadamente 70-90%, enquanto no escuro de 10-30%. No entanto, a luz não pode ser considerada um sinal direto para a ativação da enzima, pois sob contínua luz forte e baixa concentração de  $\text{CO}_2$ , a NR fica inativa, ou seja, a fotossíntese é necessária para a ativação da enzima NR e, provavelmente, os assimilados exportados do cloroplasto atuam como sinais (TAIZ & ZEIGER, 2004). Por outro lado, SANTI et al. (1995) observaram um aumento na quantidade de  $\text{H}^+$ -ATPases e alteração dos parâmetros cinéticos destas enzimas em plasmalema de raízes de milho crescidas no escuro quando expostas a nitrato. O fato de estas plantas terem sido crescidas no escuro, ou seja, com uma atividade muito baixa da nitrato redutase, em parte pode ter comprometido o estudo, visto que o processo de redução de  $\text{NO}_3^-$  consome os prótons absorvidos junto com o nitrato minimizando desta forma o efeito da acidificação do citossol, que se sabe induz as P-H<sup>+</sup>-ATPases.

O nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) produzido pela NR, é direcionado para o cloroplasto (plastídio) sendo reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela nitrito redutase (NiR). Em plantas  $\text{C}_4$  a NR e a NiR estão localizadas nas células do mesófilo e ausentes na bainha vegetal (VAUGHAN & CAMPBELL, 1988).

O  $\text{NH}_4^+$  absorvido pela planta ou proveniente da redução do nitrato é incorporado em uma molécula de glutamato pela enzima glutamina sintetase ( $\text{GS}_1$  no citossol e  $\text{GS}_2$  nos cloroplastos e plastídios) que transforma o glutamato (5C:1N) em glutamina (5C:2N). Em seguida, a enzima glutamato sintase (GOGAT) retira uma amina da glutamina e a transfere a uma molécula de  $\alpha$ -cetoglutarato (também conhecido como 2-oxoglutarato) (5C:0N), proveniente do ciclo de Krebs, sendo então produzidas duas moléculas de glutamato (5C:1N). Uma dessas moléculas pode voltar e ser utilizada na assimilação de outro  $\text{NH}_4^+$  e a outra utilizada em outras vias metabólicas.

Os processos de absorção, redução e assimilação de nitrogênio necessitam de energia, poder redutores e esqueletos de carbono, que em algumas situações estão limitantes na célula

(escuro, senescência, baixa taxa fotossintética, estresse etc). Nestas condições o nitrato absorvido pode ser enviado para outras células ou acumulado no vacúolo, para posterior utilização.

A mobilização do nitrato do vacúolo, retornando ao citossol, envolve a participação de um transportador de nitrato, do tipo simporte, com um próton e depende de um gradiente de potencial eletroquímico que é gerado por duas bombas de prótons presentes no tonoplasto: a V-H<sup>+</sup>-ATPase e a H<sup>+</sup>-Pirofosfatase (H<sup>+</sup>-PPase). O nitrato no citossol atua como um desacoplador das unidades V<sub>O</sub> e V<sub>1</sub> das V-H<sup>+</sup>-ATPase, deste modo esta enzima só atua bombeando prótons para o interior do vacúolo, na ausência de nitrato no citossol, o que permite, a saída de nitrato que esteja porventura acumulado no vacúolo. Essas enzimas existentes na plasmalema e no tonoplasto, assim como as H<sup>+</sup>-PPases no tonoplasto, viabilizam a absorção e remobilização de solutos e íons como o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (PALMGREN et al., 2001).

A NR é uma enzima passível de ativação e indução pelo substrato (nitrato na solução) e possui meia-vida curta (em torno de três horas). A diminuição no influxo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, e, portanto da quantidade de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no citossol, pode resultar em queda da atividade da NR. Deste modo, o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> armazenado nos vacúolos constitui-se em uma importante reserva, que pode ser posteriormente remobilizada e utilizada para o metabolismo nitrogenado da planta.

O nitrato absorvido pelas plantas pode ser translocado para a parte aérea, reduzido no citosol ou transportado para o vacúolo através de canais iônicos e um transportador do tipo antiporte (ANGELI et al., 2006; FERNANDES & SOUZA 2006). O movimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> do citosol para o vacúolo pode ser muito rápido, resultando numa depleção do seu conteúdo no citosol mesmo quando o conteúdo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na célula é elevado, sendo, portanto essa organela considerada como o “pool” de reserva desse nutriente na célula vegetal.

Foi encontrado em arroz, acúmulo de altos teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sem aumento correspondente no “pool” de N-amino livre ou no conteúdo de N-proteico, levando a propor a existência de um mecanismo de seqüestro de nitrato, para explicar o deslocamento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> do “pool” metabólico para o “pool” substrato. Resultados com *Brachiaria* sp. sugerem que em níveis mais elevados de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> aplicado no solo, pode haver absorção em excesso e acúmulo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na parte aérea (FERNANDES & FREIRE, 1976).

## **2.2. Sistema de Absorção das Células - Bombas de Prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase; V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase)**

Os nutrientes (íons) necessitam ser transportados da solução do solo para as raízes, onde serão absorvidos e, então, distribuídos por toda a planta, alcançando as membranas celulares e organelas. A absorção dos nutrientes, na forma de íons (passagem para o interior das células), pode ocorrer em uma das células da endoderme, através de sua superfície exposta, ou através de uma das células corticais ou ainda numa célula da epiderme. Esta absorção, através das membranas (que são formadas por dupla camada de fosfolipídios e incrustadas de proteínas), ocorre através de sítios específicos, de origem protéica (proteínas integrais da membrana), que permitem a passagem dos íons do meio externo para o interior das células. Essas proteínas integrais de membrana formam os três sistemas que atuam no transporte de íons: as bombas iônicas, os transportadores de íons e os canais iônicos (FERNANDES & SOUZA, 2006; TANNER & CASPARI, 1996).

O transporte através das membranas biológicas é um processo fundamental de energização celular (HAROLD, 1986) e é realizado através de um gradiente eletroquímico de prótons gerados pelas H<sup>+</sup>-ATPases da membrana plasmática das células (transportadores primários) quando removem prótons (H<sup>+</sup>) do citossol, o que proporciona uma força motriz (MICHELET & BOUTRY, 1995; MAESHIMA et al., 1994; SUSSMAN, 1994) criando desse modo diferenças de potenciais elétricos e de pH através da membrana plasmática.



Este gradiente é importante para muitas funções, incluindo a absorção de nutrientes e transporte até o citossol, a abertura dos estômatos, o carregamento do floema ou a absorção de íons pelas raízes (CAMONI et al., 2001; PALMGREN, 2001; FOX & GUERINOT, 1998), à manutenção do pH extracelular e intracelular (SMITH & RAVEN, 1979), e que sua regulação pode mediar uma série de respostas fisiológicas, exercendo papel central no crescimento e no desenvolvimento das plantas (MANTELIN & TOURAINE, 2004; STILES et al. 2003; SERRANO, 1984), que ocorre pelo aumento da plasticidade da parede celular (elongação celular) por meio da acidificação do apoplasto (COSGROVE, 1997), que é favorecido pela ação das expansinas que são enzimas que atuam em pH menor ou igual a 4,5 alterando a estrutura e ligações dos polímeros da parede celular (COSGROVE, 1998).

De acordo com este princípio, relacionado com a teoria do crescimento ácido, existe um aumento na extrusão de prótons pela  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática, ativando enzimas específicas que atuam na plasticidade e alongamento celular (RAYLE e CLELAND, 1992). Ainda é responsável pela manutenção da pressão de turgor e a tolerância à salinidade (MAESHIMA, 2000; PALMGREN, 1998; MICHELET e BOUTRY, 1995; SUSSMAN, 1994; SERRANO, 1988; LARSSON et al., 1987).

O sistema de transporte primário gera um gradiente de íons cujo potencial eletroquímico representa a energia armazenada. O retorno desses íons através da membrana sob seu gradiente eletroquímico é mediado por um segundo sistema transportador (transporte ativo via simporte ou antiporte) de modo que, a diminuição do fluxo de íons, seja aproveitado para realizar alguma atividade como, por exemplo, o transporte de outros solutos. A taxa destas atividades depende da taxa de fluxo atual, e sua capacidade depende do gradiente potencial estabelecido pelo sistema de transporte primário (SZE et al., 1999).

Entre as bombas iônicas as mais estudadas são as bombas iônicas de extrusão de prótons ( $H^+$ -ATPases). A extrusão de prótons ( $\pm 100$  íons  $s^{-1}$ ), conhecida como “transporte ativo primário”, é o mecanismo central no processo de nutrição mineral de plantas (GAXIOLA 2007; FRANÇA et al. 2006; FERNANDES & ROSSIELLO 1995), é um transportador unidirecional de íons, específico para prótons ( $H^+$ ), usa a energia metabólica (hidrólise de ATP) para o seu funcionamento, gerando um gradiente de potencial eletroquímico o que permite a entrada de espécies iônicas nas células, mesmo contra um gradiente de concentração. A transferência unidirecional de carga positiva ( $H^+$ ) gera eletronegatividade (interior mais negativo) denominada de força próton motriz.

O gradiente elétrico da membrana plasmática também determina a direção e extensão do fluxo passivo de íons por canais específicos. Por exemplo, muitos açúcares/prótons e de aminoácidos/prótons foram identificados em simporte (FISCHER et al., 1998). Em geral, o fluxo de cátions no citossol está de acordo com o potencial de Nernst, quando canais específicos de cátions se abrem, ânions eletrovalentes correspondentes extravasam para fora do citossol.

As bombas de prótons são proteínas abundantes, quando comparadas a outros transportadores. Esta abundância reflete a sua baixa velocidade de transporte ( $\sim 100$  íons  $segundo^{-1}$ ) comparada aos transportadores de íons ( $300$  a  $1000$  íons  $segundo^{-1}$ ) e aos canais ( $10^6$  a  $10^8$  íons  $segundo^{-1}$ ). Cada bomba de próton pode representar, na realidade, de 1 a 5% da proteína purificada da membrana. Estão distribuídas em vários tipos de membrana, destacando-se a membrana plasmática, o tonoplasto (membrana vacuolar), membrana do retículo endoplasmático e as demais endo-membranas. Por essa ampla ocorrência, as bombas de prótons viabilizam a absorção e remobilização de íons, como o nitrato (PALMGREN, 2001). Em função disso, podem ser estimuladas ou induzidas pelo mesmo ânion (SANTI et al., 1995).

As ATPases diferem quanto à bioquímica, organização das subunidades, mecanismo de reação e origem evolutiva (GAXIOLA et al, 2007, LUTSENKO e KAPLAN, 1995). A

manutenção de gradientes transmembrana depende da atividade primária de bombas eletrogênicas. Três bombas de prótons estão presentes nas células vegetais: H<sup>+</sup>-ATPases (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase) e H<sup>+</sup>-Pirofosfatases (H<sup>+</sup>-PPases) (SZE, 1985).

Na plasmalema, a bomba de extrusão de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase) atua tornando o interior da célula mais negativo e criando um gradiente de prótons entre o exterior e interior da célula (gradiente protoniônico). No tonoplasto foram identificadas bombas de prótons que atuam no sentido citoplasma→vacúolo, que são as V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPases, responsáveis pela formação de um gradiente protoniônico de dentro para fora (vacúolo→citoplasma) (KANE, 2006; SZE et al., 2002, DIETZ et al., 2001). Aparentemente, cada tipo de bomba primária é indispensável para a manutenção da homeostase celular, inclusive determinando a regulação do metabolismo de nitrogênio (KLUGE et al., 2003).

As H<sup>+</sup>-ATPases são enzimas que podem ser ativadas em resposta a distúrbios nutricionais e cuja expressão nas membranas pode ser regulada pelas condições ambientais e de desenvolvimento, que poderiam agir como um mecanismo de percepção da injúria (HERNANDEZ et al., 2002, YAN et al., 1992).

### 2.2.1. P-H<sup>+</sup>-ATPase

A P-H<sup>+</sup>-ATPase é uma bomba de prótons (H<sup>+</sup>) eletrogênica, isto é, gera um potencial, na membrana que desta forma, serve como suprimento primário de energia para a absorção de nutrientes para célula e manutenção do turgor celular (PALMGREN, 1991; SZE, 1985). Durante o ciclo catalítico, um aspartil fosfato intermediário é formado, conseqüentemente o seu nome de “tipo P” (PEDERSEN & CARAFOLI, 1987) e sua principal função é gerar um gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup>, provendo assim uma força motriz para ampliar a captação e efluxo de íons e metabólitos através da membrana plasmática (MORSOMME & BOUTRY, 1999).

Durante o ciclo catalítico, um aspartil fosfato intermediário é formado, conseqüentemente sua denominação “tipo P” (SERRANO, 1988; PEDERSEN & CARAFOLI, 1987) e sua principal função é gerar um gradiente próton - iônico direcionado para o interior da célula através da membrana plasmática, formando assim, uma força motriz para o transporte secundário de nutrientes ampliando a captação e efluxo de íons e metabólitos através da membrana plasmática (MORSOMME & BOUTRY, 1999; MICHELET & BOUTRY, 1995, PALMGREN et al., 1990; SERRANO, 1989; SZE, 1985). As ATPases “tipo P” formam uma grande família de proteínas de membrana as quais pareiam a hidrólise de ATP ao transporte ativo de cátions através das membranas celulares (MOLLER et al., 1996; LUTSENKO, 1995).

A H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática (MP), por exemplo, extrusa H<sup>+</sup> da célula gerando uma força próton-motriz com potencial membranar de -120 a -160 mV e um gradiente de pH de 1,5 a 2 unidades (exterior ácido), enquanto que as H<sup>+</sup>-ATPases vacuolares (V-ATPases) e a bomba de H<sup>+</sup> da pirofosfatase vacuolar (H<sup>+</sup>-PPase) acidificam o lúmen vacuolar e outros compartimentos das endomembranas (SZE et al., 1999).

Em plantas, a H<sup>+</sup>-ATPase da MP também participa em outras funções essenciais para o crescimento normal da planta como ativação do sistema de transporte secundário (MORSOMME & BOUTRY, 1999), tolerância à salinidade (JANICKA-RUSSAK & KLOBUS, 2007; FUGLSANG et al., 2006; MAATHUIS et al., 2003; BRESSAN et al., 1998;), regulação do pH intracelular (KURKDJIAN, 1989), expansão celular (COSGROVE, 1997; RAYLE & CLELAND, 1992), abertura dos estômatos e enchimento do floema (INOUE et al., 2005; PALMGREN, 2001; CAMONI et al., 2000), estresses de condições ambientais como temperatura (MARTZ et al., 2006; INOUE et al., 2005; LEE et al., 2004).

A dependência da H<sup>+</sup>-ATPase de acordo com o pH foi demonstrado em ensaios *in vitro* e varia de acordo com o tipo de isoforma (LUO et al., 1999) ou o estado de ativação da

H<sup>+</sup>-ATPase. Seu papel na manutenção do pH e no crescimento celular vem sendo discutido, mas não está claro como a H<sup>+</sup>-ATPase está envolvida na regulação do pH intracelular, que permanece constante em torno de pH 7,0 a 7,2 durante todo o crescimento da planta (GAXIOLA et al., 2001; KURKDJIAN, 1989). Como o pH ótimo para a H<sup>+</sup>-ATPase é levemente abaixo de 7,0, uma acidificação do citosol deve levar a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase e aumentar a extrusão de prótons e, conseqüentemente, a manutenção do citosol alcalinizado (MORSOMME & BOUTRY, 2000). Concomitante a este processo, ocorre acidificação do meio externo o que leva ao início do processo de expansão celular (RAYLE & CLELAND, 1992), um mecanismo conhecido por teoria do crescimento ácido, que deve estar associado a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase pelo hormônio auxina através de um mecanismo ainda não esclarecido (ZANDONADI et al., 2007; MORSOMME & BOUTRY, 2000; SZE, 1985).

Importante progresso tem sido alcançado em relação à identificação e organização dos genes das H<sup>+</sup>-ATPases, sua expressão, e também, a cinética e a regulação individual das isoformas de H<sup>+</sup>-ATPases (DEWITT & SUSSMAN, 1995; MICHELET & BOUTRY, 1995). Molecularmente, agora está claro que as H<sup>+</sup>-ATPases são codificadas por uma família de aproximadamente 10 genes (MORSOMME & BOUTRY, 1999).

### 2.2.2. V-H<sup>+</sup>-ATPase

A H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar (V-H<sup>+</sup>-ATPase) é uma proteína de transporte ativo primário localizada no tonoplasto e outros compartimento do sistema de endomembranas da célula da planta (GAXIOLA et al., 2007; SZE, 1985). A V-H<sup>+</sup>-ATPase utiliza a energia liberada durante a quebra do grupo  $\gamma$ - fosfato do ATP citosólico para bombear prótons para o lúmen vacuolar, criando assim um gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup>, que é a força motriz para uma variedade de transporte de íons e metabólitos, e energiza o transporte ativo secundário (RATAJCZAK, 2000). A principal funções da V-H<sup>+</sup>-ATPase são a homeostase do pH citosólico, que varia de 3-6 o seu pH, e a criação de um potencial de membrana vacuolar acrescido de 30mV e de uma força motriz para o transporte de soluto no vacúolo (SZE et al., 1999). O gradiente eletroquímico é usado pelo antiporte de próton para acumular cátions no interior do vacúolo, como Ca<sup>2+</sup>, reciprocamente, o gradiente elétrico conduz ânions para o interior do vacúolo através de canais, porém, o efluxo de ânions no citosol seria energeticamente desfavorável e deveriam depender do simporte de H<sup>+</sup> (HIRSCHI et al., 1996).

A distribuição onipresente das V-H<sup>+</sup>-ATPase em células eucarióticas indica que, essencialmente, a sua função vai além da energização iônica e do fluxo metabólico. A acidificação das vesículas pode ser um componente crítico na ligação de receptores e obrigatoriamente na dissociação de interações proteína-proteína. Por exemplo, em células de tabaco, a concanamicina A provoca a desorganização das proteínas solúveis vacuolares (DETTMER et al., 2006), refletindo assim a necessidade de uma V-H<sup>+</sup>-ATPase ativa no complexo de Golgi na seleção da própria proteína (VON DER FECHT-BARTENBACH et al., 2007; STROMPEN et al., 2005; MATSUOKA et al., 1997).

Estudos têm sugerido que mudanças nas funções da membrana plasmática de células das raízes estão primariamente envolvidas a diferentes tipos de estresses. Quando a planta sofre algum tipo de estresse há reduções na atividade das ATPases da MP (ANH et al., 2001) e, alguns dados evidenciam aumentos nas atividades de H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase vacuolares (KASAI et al., 1992). A H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar é uma enzima que pode ser ativada em resposta a distúrbios nutricionais e cuja expressão nas membranas pode ser regulada pela condições ambientais e de desenvolvimento, que deve agir como um mecanismo de percepção da injúria.

De acordo com DIETZ et al. (2001) as V-H<sup>+</sup>-ATPase tem um outro papel importante, que é o transporte de membrana como um mecanismo de detoxificação de metais pesados. Pouco se sabe sobre esta regulação das V-ATPases, mas a habilidade das plantas em se

adaptar e crescer em um ambiente variável sugere-se que V-ATPases estejam sujeitas à regulação por hormônios e por fatores ambientais, principalmente em condições de estresse (ZANDONADI et al., 2007; SZE et al., 1999). A regulação da expressão de subunidades da V-H<sup>+</sup>-ATPase por fitohormônio têm recebido algumas atenções.

Porém, a V-H<sup>+</sup>-ATPase é um complexo de pelo menos 10 subunidades e estão localizadas em compartimentos funcionalmente distintos dentro da célula. Assim, o regulamento da expressão de genes das V-H<sup>+</sup>-ATPase, síntese de enzima, e ativação poderia ser consideravelmente mais complexo que é o caso para a H<sup>+</sup>-ATPase da MP (KANE et al., 2006; DRORY & NELSON et al., 2006; IMAMURA et al., 2005; SZE et al., 2002). O pareamento de canais nos vacúolos revelou que, a relação desta junção em beterraba vermelha, a V-ATPase decresceu de 3,28 para 1,75 e quanto ao gradiente de pH entre o citoplasma (pH 7,6) e o vacúolo aumentou de 2,8 a 4,7 unidades (DAVIES et al., 1994). Estes resultados indicam que o pH de ambos os lados da membrana vacuolar poderiam regular a V-ATPase, inibindo parcialmente a bomba, demonstrando a capacidade dos vacúolos em acumular H<sup>+</sup> a pH 3,0 ou inferior (STEVENS & FORGAC, 1997).

### 2.2.3. H<sup>+</sup>-PPase

São encontrados principalmente em vegetais superiores, alguns protozoários, e em varias espécies de eubactéria e arquibactéria (MIMURA et al., 2004; DROZDOWICZ & REA, 2001). A H<sup>+</sup>-PPase vacuolar hidrolisa PPI. Nas plantas em diversas condições fisiológicas e de estresse, o pirofosfato pode assumir o papel de doador de energia metabólica da célula (BALTSCHIEFFSKY et al., 1999; STITT, 1998). No tonoplasto, a H<sup>+</sup>-PPase é funcional na energização dos sistemas de transporte secundário da membrana vacuolar, atuando também no controle da homeostase citoplasmática, em sincronismo com a V-H<sup>+</sup>-ATPase de tonoplasto (FUKUDA & TANAKA, 2006) e com a P-H<sup>+</sup>-ATPase de plasmalema (ZHANG et al., 2006; LI et al., 2005; SZE et al., 1999; REA et al., 1992).

Os vegetais possuem dois tipos filogeneticamente distintos de H<sup>+</sup>-PPases: tipo I que depende de K<sup>+</sup> do citosol para sua atividade e é moderadamente sensível a inibição por Ca<sup>2+</sup>, e tipo II que é insensível a K<sup>+</sup> mas extremamente sensível ao Ca<sup>2+</sup>. Em um estudo combinando análises filogenéticas e sítios orientados de mutagenêses, BELOGUROV & LAHTI (2002) demonstraram que a substituição de uma alanina na posição 460 por uma lisina converteu a H<sup>+</sup>-PPase K<sup>+</sup>-dependente numa forma K<sup>+</sup>-independente. Esta transição parece ser devido a uma substituição simples de K<sup>+</sup> com o grupo amônia (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) da lisina (BELOGUROV & LAHTI, 2002). Ambos os tipos de H<sup>+</sup>-PPase requerem Mg<sup>2+</sup> como um cofactor (DROZDOWICZ & REA, 2001; MITSUDA et al., 2001; MAESHIMA, 2000; DROZDOWICZ et al., 2000).

Em sistema vegetais, o pirofosfato (PPI) tem sido considerado um substrato alternativo ao ATP podendo ativar o metabolismo em condições de estresse energético, quando ocorre a depleção dos níveis de ATP citosólico (STITT, 1998).

Adicionalmente, pelo ATP ser a principal fonte energética das células, acreditava-se que a atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase fosse superior às H<sup>+</sup>-PPase. Certamente, o fosfato inorgânico (PPI) também é uma importante fonte de energia para as células das plantas, e a H<sup>+</sup>-PPase é uma bomba de H<sup>+</sup> onipresente e ativa (ZHEN et al., 1997; REA & POOLE, 1993).

## 2.3. Raízes Geneticamente Modificadas: Sua Importância, Produção e Manutenção

Culturas de órgãos e tecidos vegetais são técnicas que permitem o crescimento e a manutenção destes materiais em soluções nutritivas, sob condições axênicas. A produção destas culturas, *in vitro*, é uma idéia antiga (século XIX) e partiu do princípio de que as células vegetais teriam a habilidade de totipotência, ou seja, eles poderiam regenerar uma planta inteira.

Inicialmente, era fácil a tentativa de usar células vegetativas, mas dificultado em células já diferenciadas, como tecidos e órgãos, porque elas não cresciam e nem se dividiam.

Entretanto, WHITE (1934) estabeleceu uma cultura, próspera e de alta longevidade, de raízes extraídas de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (CANTO-CANCHÉ & LOYOLA-VARGAS, 1999) sendo muito importante para o estabelecimento de muitas outras culturas de raízes, tanto de famílias angiosperma como de gimnosperma. Embora existam muitas vantagens do cultivo de raiz sobre o de tecidos não-organizados, tais como sua habilidade biosintética em produzir metabólitos secundário ser superior aos calos e a suspensão celular, algumas dificuldades são associadas ao cultivo de raízes, como a dependência de auxina exógena, grande quantidade de inóculo requerido para crescimento adequado, raízes com poucas ramificações, e em muitos casos rendimentos de metabólitos inferiores às raízes de planta inteira (CANTO-CANCHÉ & LOYOLA-VARGAS, 1999).

A descoberta de fito-reguladores como auxina e citocinina tiveram grande influência nas culturas de tecido. O conhecimento da importância destes hormônios, e o efeito crítico da relação citocinina/auxina usados na diferenciação celular, conduzidos por STEWARD et al. (1958) para regenerar plantas inteiras a partir de células obtidas de raízes de cenoura, permitiram que as técnicas de cultura de órgãos e tecidos tivessem um significativo desenvolvimento (MAHESHARI, 1990).

Para a produção de metabólitos secundários vegetais podem ser utilizadas culturas *in vitro* de células, calos ou órgãos. Em geral, culturas de órgãos são melhores produtoras de metabólitos secundários que culturas menos organizadas, apesar do fato que culturas não-organizadas também poderem apresentar habilidade biosintética requerida para produção de metabólitos secundários sob determinadas condições de cultivo (CANTO-CANCHÉ & LOYOLA-VARGAS, 1999).

Para a cultura de raízes *in vitro* é necessária a obtenção e manutenção periódica de explantes de raízes de plantas inteiras ou de raízes formadas de células na superfície de calos. Um meio complexo contendo uma fonte de carbono, vitaminas e sais inorgânicos são usados como suporte para a sobrevivência da cultura. As culturas de raízes normalmente possuem baixos níveis de auxina endógena, essenciais para o seu crescimento, inferiores aos requeridos para sustentar um crescimento ativo e sua morfogênese. As raízes podem ser cultivadas em meio semi-sólido, contendo Agar, como também em meio líquido sob agitação no qual, normalmente, apresentam maior taxa de crescimento. Periodicamente são feitas manipulações das culturas (repicagem e troca de meio de cultura) para a manutenção das condições mínimas requeridas pelas raízes para crescimento indeterminado, sob condições assépticas.

Entretanto, o estudo em raízes é limitado, devido ao manuseio laborioso dessa parte do vegetal em condições controladas. A fim de suplementar algumas das desvantagens das culturas de raízes normais, foi estabelecido o sistema de raízes transformadas geneticamente (hairy roots) através de bactérias do gênero *Agrobacterium*, em especial *A. rhizogenes* e *A. tumefaciens*, que são bactérias do solo e os agentes patogênicos responsáveis pela proliferação excessiva de raízes em cabeleira ou de tumores no ponto de infecção.

Quando as células são infectadas por *A. rhizogenes*, o DNA de transferência (T-DNA) oriundo do plasmídeo bacteriano (indutor de raízes - Ri) é transferido, integrado e expresso na célula vegetal do hospedeiro (FLORES, 1992; ZAMBRYSKI et al., 1989). O vegetal infectado passa então a produzir enzimas responsáveis pela síntese de opinas, que são utilizadas pela *Agrobacterium* como fonte de energia, e de hormônios que alteram a produção e a sensibilidade das células vegetais a auxinas (e citocininas) provocando um desbalanço no metabolismo celular que passam, agora, a se propagar desordenadamente, induzindo alta proliferação de raízes adventícias de rápido crescimento na região de infecção. O processo de integração do T-DNA no genoma da planta faz do plasmídeo Ri, vetor importante para a

transferência de genes para as plantas. O processo de integração do T-DNA na célula vegetal é chamado de “transformação genética” e a raiz produzida, “raiz transgênica”.

A bactéria do gênero *Agrobacterium* vem sendo utilizada para a produção de uma ampla variedade de dicotiledôneas transformadas. As gramíneas, entretanto, são menos suscetíveis às transformações devido a diferenças no processo de resposta a infecção. Enquanto a maioria das plantas responde à infecção estimulando a divisão celular no ponto de infecção que é o mecanismo da regeneração de plantas a partir de explantes, os sítios de infecção em gramíneas acumulam compostos fenólicos e morrem. Apesar da *Agrobacterium* poder transferir T-DNA à gramíneas, as células transformadas não se dividem e portanto, não são usadas para a regeneração de plantas transformadas (FISK & DANDEKAR, 1993).

As raízes transformadas com o T-DNA do plasmídeo Ri podem ser prontamente subcultivadas *in vitro* como culturas axênicas de raízes. Esses “clones radiculares” são capazes de crescimento indefinido *in vitro* (SOUZA et al., 2002; BERBARA et al., 1995; FLORES, 1992). A partir destas culturas, plantas inteiras podem então ser regeneradas. Devido a maior sensibilidade das células transformadas a auxina endogenamente produzida, raízes transformadas apresentam taxas de crescimento várias vezes superiores às raízes não transformadas (JOUANIN et al., 1993; JULLIARD et al., 1993; ZAMBRYSKI et al., (1989). Partindo-se de um material inicial com apenas alguns miligramas (uma ou duas pontas de raízes de dois a três centímetros), uma típica raiz transformada pode produzir aumentos em sua biomassa de várias centenas de vezes em apenas 3-4 semanas (SOUZA et al., 2006, SOUZA et al., 2002; BERBARA, 1995). A síntese de metabólitos secundários por estas raízes é bastante estável e a taxa de produção destes compostos pode ser significativamente superior às encontradas em raízes não transformadas (FLORES & CURTIS, 1992; FLORES & FILNER, 1985).

As raízes transformadas oferecem uma grande contribuição para o entendimento de importantes eventos relacionadas à fisiologia de plantas e à trocas de sinais entre simbioses, como o registrado em fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) durante os processos de colonização e esporulação (DECLERCK et al., 2006; SOUZA et al., 2002; BERBARA et al., 1995). Os mecanismos genéticos e fisiológicos envolvidos nestes processos são, portanto, mais adequadamente estudados, pois os estádios de desenvolvimento dos simbioses podem ser monitorados *in vivo* por vários anos de forma não destrutiva. Como consequência, o uso de raízes transformadas como sistema modelo para o estudo de associações micorrízicas, vem se tornando cada vez mais comum (DECLERCK et al., 2006; LIMA, 2004; SOUZA et al., 2002; BÉCARD et al., 1992; BERBARA et al., 1995; FONSECA, 1994; BENHAMOU et al., 1994; SIMONEAU et al., 1994; BÉCARD & FORTIN, 1988; MUGNIER & MOSSE, 1987).

A possibilidade de utilização de raízes transformadas de espécies vegetais com dependência micorrízica tem sido proposta para a ontogenia dos esporos de FMAs (BERBARA et al., 1999), para o estudo do processo de colonização radicular e, especificamente, para a identificação dos compostos produzidos antes, durante e após o estabelecimento da simbiose (SOUZA et al., 2002; AZCON-AGUILAR & BAREA, 1991). O uso de culturas de FMAs nestas raízes possibilita minimizar os efeitos das variáveis ambientais envolvidas na simbiose, permitindo avaliar suas interações metabólicas.

Raízes transformadas vêm sendo usadas graças à possibilidade que elas oferecem de se controlar as interações que ocorrem com o meio circundante e entre plantas, bactérias diazotróficas e FMAs. Para tanto, é requerido o desenvolvimento de sistemas onde tais organismos possam ser mantidos.

Vários pesquisadores obtiveram recentemente esporulação de FMA em raízes transformadas cultivadas axenicamente em meio de cultura definido, permitindo assim a obtenção de culturas monospóricas de FMAs (DECLERCK et al., 2006; LIMA, 2004; SOUZA & BERBARA, 1997; BERBARA et al., 1995; BÉCARD & PICHÉ, 1992). Tal fato

tem possibilitado avanços substanciais em novos campos do conhecimento, superando um dos principais entraves ao uso de técnicas imunológicas e moleculares em trabalhos com FMAs que consistia na falta de um material puro, com estabilidade genética e fenotípica, o que permitirá o desenvolvimento de metodologias que servirão como ferramentas para estudos básicos e aplicados de micorrizas arbusculares.

Por outro lado, espera-se que estudos básicos, acerca dos mecanismos ligados as vias de fixação do carbono pelo hospedeiro, possibilitem aumentos na produção de esporos *in vitro*. O estímulo à esporulação é resultado de eventos provavelmente associados a mudanças nas taxas de produção e/ou na qualidade de exudados radiculares (GUILLON et al., 2006; BERBARA, 1995; FONSECA, 1994).

Portanto, variações no processo de fixação de carbono e/ou balanço hormonal induzidas pela planta durante o processo de senescência ou de estresse, devem ser objeto de futuros estudos e reflexões, como, por exemplo, mediante o uso de “raízes verdes” (RVs) (FLORES et al., 1993).

#### **2.4. Fungos Micorrízicos Arbusculares: Descrição e Histórico**

As micorrizas arbusculares (FMA) são associações simbiotróficas mutualistas entre as raízes da maioria dos vegetais superiores, aproximadamente 80% (TRAPPE, 1987, estudando 3% das angiospermas, além de também se associarem gymnospermas, pteridófitas e briófitas), e determinados fungos do solo sendo considerada a simbiose mais comum entre microrganismos e plantas (FORERO, 1996; SIEVERDING, 1991). Isto se deve ao fato dos FMAs terem se originado quando as primeiras plantas colonizaram o ambiente terrestre a pelo menos 460 milhões de anos (REDECKER et al., 2000) e os dois parceiros da simbiose terem evoluído em conjunto (REMY et al., 1994).

Esta simbiose tem se mostrado importante para o crescimento e estabilidade de comunidades vegetais (FRANCIS & READ, 1994), favorecendo a nutrição mineral, principalmente pela absorção de nitrogênio (N) e fósforo (P). Diversos autores destacam ainda que os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são de grande importância principalmente para as regiões tropicais (SIEVERDING, 1991; MORTON & BENNY, 1990; MOSSE, 1981), mas apresentam distribuição generalizada na maioria dos solos, desde os desérticos aos polares (ALLEN, 1991).

A simbiose micorrízica caracteriza-se pela presença de hifas, arbúsculos e/ou vesículas fúngicas colonizando a região do córtex das raízes das plantas hospedeiras e pela produção de hifas externas às raízes que se estendem a vários centímetros do solo, na rizosfera. Através do micélio os FMAs conectam raízes e solo, aumentando a absorção de nutrientes, água do solo e húmus pelas hifas, que podem ser consideradas uma “extensão” da raiz, explorando maior volume de solo (WIGAND & STEVENSON, 1997; BARROS & NOVAIS, 1996; MARSCHNER & DELL, 1994).

Entretanto os FMAs podem eventualmente, ter papel importante na agregação do solo (TISDALL, 1994); na arquitetura do sistema radicular (HETRICK, 1991); no estabelecimento de populações de microrganismos rizosféricos (NEWSHAM et al., 1995; FITTER & GARBAYE, 1994); na produção de antibióticos e hormônios (GOGALA, 1991); no aumento da tolerância de plantas contra ataques de fitopatógenos (NEWSHAM et al., 1995). O fungo, por sua vez, recebem das plantas os carboidratos e fatores de crescimento de que necessita, sendo ele incapaz de atacar, injuriar ou causar qualquer disfunção nas raízes, caracterizando assim a natureza mutualista da associação, despertando o interesse para a exploração comercial, visando a aumentar a produção de alimentos e reduzir custos financeiros e o impacto dos sistemas modernos de produção sobre o meio ambiente.

Por serem biotróficos obrigatórios, estes fungos precisam estabelecer associações efetivas com raízes metabolicamente ativas para que possam se desenvolver e se multiplicarem, o que vêm dificultando tanto estudos básicos como sua aplicação em escala comercial na agricultura, como a produção de um inóculo de qualidade, livre de impurezas (SYLVIA & JARSTFER, 1994).

O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante e a decorrente produção de raízes transformadas para cultivo “*in vitro*” têm possibilitado o monitoramento não destrutivo da simbiose micorrízica por longos períodos, suficientes para acompanhar o estabelecimento e desenvolvimento, desde a colonização radicular até a formação completa de novos esporos e, especificamente, para identificação dos compostos produzidos antes, durante e após o estabelecimento da simbiose (AZCON-AGUILAR & BAREA, 1991). O uso de culturas de FMAs nestas raízes também permite avaliar interações metabólicas (SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2002).

A possibilidade de monitoramento “*in vivo*” permite a observação e descrição de esporos e a formação de outras estruturas durante todo estágio da ontogenia destes fungos simbióticos. Os trabalhos pioneiros de multiplicação de FMAs *in vitro* foram desenvolvidos por MOSSE & HEPPER (1975 utilizando culturas de raízes de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) e trevo (*Trifolium pratense* L.) estabelecendo culturas de *Glomus mosseae* Nicolson & Gerd.

A visualização dos eventos iniciais da formação dos esporos pode fornecer algumas evidências que possam ajudar em estudos filogenéticos (SOUZA & BERBARA, 1997) e estima-se que um número indefinido de esporos viáveis, limpos e clonados possam ser obtidos ao longo dos anos, e que tais propágulos se constituirão em um importante acervo de origem conhecida à disposição da comunidade científica para os mais variados estudos.

O estímulo à esporulação é resultado de eventos provavelmente associados a mudanças nas taxas de produção e/ou na qualidade de exsudatos radiculares (BERBARA, 1995; FONSECA, 1994; PAULA & SIQUEIRA, 1990; ELIAS & SAFIR, 1987). Esses autores observaram, *in vitro*, que a esporulação é estimulada quando a raiz entra em estresse ou em processo de senescência. Isso indica que a esporulação é fortemente controlada pelo hospedeiro, através, provavelmente, de modificações no metabolismo do carbono e/ou em seu balanço hormonal. Tais resultados reforçam a hipótese de WILLIAMS (1992) sugerindo que estudos sobre processos de esporulação de FMA que não levem em conta o hospedeiro têm grandes chances de não apresentarem resultados significativos.

Vários pesquisadores obtiveram esporulação de FMA em raízes transformadas cultivadas axenicamente em meio de cultura definido, permitindo assim a obtenção de culturas monospóricas de FMAs (DECLERCK et al., 2006; BERBARA et al., 2006, BERBARA, 1995; BÉCARD & PICHÉ 1992), tal fato tem possibilitado avanços substanciais em novos campos do conhecimento. Assim, foi superado um dos principais entraves ao uso de técnicas imunológicas e moleculares em trabalhos com FMAs que consistia na falta de um material puro, com estabilidade genética e fenotípica. Culturas monospóricas de FMAs podem ser utilizadas para a extração de proteínas ou DNA, obtenção de antígenos espécie-específicos com baixa reação cruzada e desenvolvimento de "primers" específicos (GIOVANNETTI & GIANINAZZI-PEARSON, 1994; SIMON et al., 1993; SIMON et al., 1992), e estudos referentes a trocas de sinais entre os simbiotes durante os vários momentos da simbiose. A técnica de micorrização em raízes transformadas possibilita a obtenção deste material padrão inicial de alta pureza e conseqüentemente permitirá o desenvolvimento de metodologias que servirão como ferramentas para estudos básicos e aplicados sobre micorrizas.

Embora ainda existam dúvidas sobre os sinais que desencadeiam a esporulação dos FMA, há sugestões de que seja estimulada durante a senescência ou sob a influência de estresses sofridos pelo tecido vegetal. Essas hipóteses baseiam-se no fato de que durante o processo de



senescência a disponibilidade de metabólitos fornecidos pelo tecido vegetal ao fungo micorrízico tornam-se limitadas e diferenciadas, pois nesta fase o catabolismo torna-se intenso, visando à manutenção das atividades do vegetal. Durante esta fase há aumento da atividade das enzimas hidrolíticas, principalmente as proteases (SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2002).

O entendimento dos fenômenos que controlam a esporulação em sistemas micorrízicos permitirá, eventualmente, a produção de um meio de cultura onde FMAs possam ser multiplicados *in vitro* na ausência de raízes, retirando-se, com isso, um dos maiores obstáculos para sua utilização em larga escala na agricultura. Portanto, para se entender as associações micorrízicas são necessários estudos, não apenas sobre o sistema de produção *in vitro* com o uso de raízes transformadas geneticamente, mas também devem ser avaliadas as modificações metabólicas que ocorrem neste sistema de cultivo, já que elas podem influenciar a esporulação dos FMA.

Contudo, a biologia destes simbiontes ainda é pouco entendida (KARANDASHOV et al., 2000; TOMMERUP e KIDBY, 1980) devido à impossibilidade de cultivo da maioria destes fungos em meios de cultura, sob condições axênicas.

SIQUEIRA (1987) enumerou uma série de benefícios decorrentes no crescimento de fungos em cultura axênicas, dentre eles podem ser citados: a eliminação de hiperparasitas e microrganismos contaminantes que afetam os estudos "*in vitro*" e as respostas da planta à inoculação; permitir estudos básicos visando os mecanismos pelos quais eles favorecem o crescimento das plantas, dentre outros.

A germinação dos esporos transcorre com facilidade em cultivo axênico, no laboratório, simplesmente em ágar-água, ao que se deduz que não requer nenhum estímulo específico produzido pela planta ou outro organismo do solo (AZCON-AGUILAR & BAREA, 1991).

Os processos pelos quais os fungos iniciam a sua germinação ainda não são conhecidos. Mas, de acordo com SIQUEIRA (1987) o processo se inicia com a ativação de proteases inativas de membrana, que se iniciaria com a embebição dos esporos levando a modificações nas condições biofísicas das membranas, onde as enzimas proteolíticas seriam ativadas provocando a hidrólise de proteínas de reservas. Assim, haveria um aumento na quantidade de aminoácidos livres no citoplasma, necessários para a síntese de novas proteínas, com funções enzimáticas específicas, de acordo com uma precodificação genética contida no esporo, desencadeando assim todo o processo de germinação. BERBARA et al. (1996) identificou sítios de acidificação na superfície de esporos pré-germinados nos locais de emissão de hifas, sugerindo a necessidade de acidificação e maior atividade de bombas de extrusão de prótons.

#### **2.4.1. Influência da disponibilidade de N e P na simbiose micorrízica**

O N é um dos nutrientes mais limitantes para a produção agrícolas. Existem algumas indicações de que aumento dos níveis de N pode inibir a formação de micorrizas e afetar negativamente a população dos FMAs. Existem relatos que o  $\text{N-NH}_4^+$  em solução inibe mais as micorrizas que o  $\text{NO}_3^-$  (CAPRONI, 2001). Tem sido observado que os efeitos do N sobre os FMAs são variáveis com a localização e podem depender da disponibilidade de fósforo (SIEVERDING, 1991; HAYMAN, 1987). Contudo, nas regiões tropicais, o N no campo, raramente chega a ser inibitório, pois o que predomina é a sua deficiência (FRANCO & BALIEIRO, 2000).

O desenvolvimento do micélio nas raízes é influenciado diretamente pela fonte de N, onde a colonização de raízes de soja (*Glicine max* (L.) Merr.) fertilizadas com  $\text{NO}_3^-$  foi menor que as raízes fertilizadas com  $\text{N-NH}_4^+$  (BETHLENFALVAY et al., 1999). Num solo calcáreo, com pH acima de 8, a fertilização de plantas de sorgo (*Sorgum bicolor*) com  $\text{N-NH}_4^+$  resultou em uma porcentagem de infecção micorrízica ligeiramente mais alta que com a adubação de  $\text{N-NO}_3^-$ . E num solo ligeiramente ácido com pH menor que 7 a fonte de  $\text{N-NO}_3^-$  resultou em

uma porcentagem de infecção micorrízica ligeiramente superiores a fonte de  $\text{N-NH}_4^+$  (ORTAS et al., 1996).

A adição de doses elevadas de  $\text{N-NH}_4^+$ , na cultura de soja, em condições de deficiência e de bom suprimento de P, reduziu a taxa de colonização micorrízica (PAULA & SIQUEIRA, 1989). Os mesmos autores observaram que o N mineral não reduziu significativamente a germinação dos esporos de *Glomus macrocarpum*, mas reduziu o crescimento do tubo germinativo, enquanto a taxa de esporulação deste fungo foi crescente com a elevação da dose de N até 30 ppm, reduzindo-se nas doses mais elevadas.

As hifas micorrízicas têm a capacidade de aumentar a absorção de N e o transportar do solo ou da serrapilheira em decomposição para a planta devido ao aumento da área de superfície de contato (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1996). Algumas espécies de FMAs também contêm enzimas que quebram o N orgânico e contêm N-redutases que reduzem  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$  alterando as formas de N no solo (BAGGO et al., 2001; VARMA, 1995; GIANINAZZI-PEARSON & AZCON-AGUILAR, 1991). O mesmo autor ressalta, ainda, que em muitos ecossistemas, principalmente os florestais, uma grande fração do N disponível nos solos é o  $\text{NH}_4^+$  e não o  $\text{NO}_3^-$ .

A assimilação rápida de N inorgânico no local de absorção pode assegurar que as demandas internas sejam satisfatórias antes da transferência à planta hospedeira e também podem impedir a acumulação tóxica de íons de amônia. Recentemente, JIN et al. (2005) e GOVINDARAJULU et al. (2005) relataram que os FMAs benéficos transferem quantias significativas de N à planta hospedeira, provavelmente como amônia, o que também foi sugerido para as associação com ectomicorrizas (SELLE et al., 2005), mas, seria necessária uma capacidade reduzida de assimilação das células fúngicas intra-radiculares para sustentar a transferência de amônia, regulando o gene que codifica a enzima de assimilação da amônia, glutamina sintetase, na hifa do fungo em contato com as células radiculares em simbiose com FMAs (GOVINDARAJULU et al., 2005).

Em estudos prévios também enfatizaram um declínio nos níveis dos aminoácidos principais presentes junto com uma diminuição na atividade de enzimas fúngicas envolvidas na assimilação do N durante o processo de colonização micorrízica (BLAUDEZ et al., 1998). Entretanto, a transferência bem sucedida da amônia do fungo à planta também dependerá grandemente da falta de sistemas de recuperação da  $\text{NH}_4^+$  na membrana plasmática das células fúngicas intra-radiculares.

GOVINDARAJULU et al. (2005) relataram uma super-expressão de um gene fúngico *AMT* nas hifas intra-radiculares que codifica para um transportador de  $\text{NH}_4^+$ . A princípio, o  $\text{NH}_3^+$  poderia difundir para o exterior, através dos *AMTs*, quando sua concentração interna exceder àquela do meio (KHADEMI et al., 2004). Se os *AMTs* fossem altamente abundantes na membrana plasmática da hifa simbiótica isto resultaria num ciclo inútil (desnecessário) de N-inorgânico e provavelmente em transferência ineficiente de N.

Uma super-expressão de transportadores *Amts* do amônio na planta em simbiose com ectomicorrizas (entre o *Álamo* e *Amanita muscaria*) indicou que o amônio pode ser transferido diretamente do fungo à planta (SELLE et al., 2005). CHALOTE et al. (2006) ainda sugerem que uma maior atenção também deve ser dedicada aos canais não-específicos como as aquaporinas (LOQUE et al., 2005) ou os sistemas de cátion dependentes de gradiente elétrico (ROBERTS & TYERMAN, 2002) que também poderia contribuir para a importação da amônia do apoplasto interfacial ao citoplasma da célula da planta. Uma assimilação adicional de amônia nas células da raiz é aumentada pela atividade da glutamina sintetase na planta (BLAUDEZ et al., 1998).

A disponibilidade de C substrato deve ser considerado um fator essencial, ou possivelmente ATP, que é necessário para síntese de amido. Sob a disponibilidade de C, o grande fluxo de combinações de C para o compartimento fúngico assegura a assimilação de

N-inorgânico e a liberação adicional de N-orgânico através das células fúngicas (a via tradicional). Sob depleção de C, poderia a síntese de N orgânico ser imensamente diminuída, assim induzir a acumulação de grandes quantias de amônia livre. Sob estas condições, diminuiria o pool de aminoácido e uma consequência direta seria a repressão de proteínas sensível para depleção do N catabólico (por ex: Amt, glutamina sintetase, glutamato sintase, glutamato desidrogenase e urease). Sob estas condições a amônia, e não os aminoácidos, seria transferida à planta (GOVINDARAJULU et al., 2005; JIN et al., 2005).

Os resultados obtidos por GOVINDARAJULU et al. (2005) e JIN et al. (2005) não somente indicaram a ocorrência de uma via alternativa de transferência ao previamente estabelecido (via tradicional), mas também sugere que a relação simbiótica entre FMAs e plantas poderiam ter um papel muito mais significativo no ciclo mundial de N. Isto reforça a necessidade de estudos a campo para elucidar a importância dos FMAs para a nutrição de N das plantas.

O melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos na transferência de N entre os simbiontes micorrízicos também é crucial para compreender o regulamento do status de N e por prever mudanças potenciais nos ecossistemas, particularmente sob pCO<sub>2</sub> atmosférico alterado (GAMPER et al. 2005). No nível molecular, as características funcionais de *AMTs* fúngico os fazem os candidatos inadequados para o efluxo de amônia para fora da célula. Outros, ainda não identificados, mecanismos necessários para sustentar um efluxo significativo e controlado de N inorgânico do fungo para o apoplasto devem ser elucidados.

Segundo MARCHNER (1994) os principais efeitos da micorriza na nutrição de P residem nas elevadas taxas de absorção de P de fontes de baixa-solubilidade, decorrente da queda do pH da rizosfera normalmente cair na presença das micorrizas, o que leva a um aumento na solubilidade de P nos solos (MOHAMMAD et al., 2004).

Verificando que a concentração de fósforo externo tem pouco efeito na germinação e no tubo germinativo de *Gigaspora margarita*, TAWARAYA et al. (1996) e SCHACHTMAN et al. (1998) comprovaram que os baixos níveis de colonização observados em plantas crescidas em solos com alto conteúdo de fósforo, não são resultado da regulação direta da atividade dos fungos pelo fósforo do solo, e sim pela planta regulando a atividade do fungo. Segundo SIQUEIRA et al. (1984), a disponibilidade de fósforo controla a formação da simbiose de FMA em algum estágio depois que a germinação dos esporos tenha ocorrido.

Sabendo que o fósforo não tem efeito fungistático direto nos fungos micorrízicos, e que, os açúcares e os ácidos orgânicos são inibitórios a eles in vitro, sendo mais provável que o metabolismo do carbono do hospedeiro seja um dos fatores que controla a formação da micorriza indiretamente quando há o aumento da disponibilidade de fósforo no solo. A quantidade de açúcares e, provavelmente, outros compostos presentes nas células corticais provavelmente são os fatores que agem em algum estágio depois da germinação do esporo, inibindo a colonização.

Estes mesmos autores propuseram que, as hifas são impedidas de penetrar nas células epidérmicas ou, se elas penetram, são impedidas de se propagarem além do ponto de penetração pelo alto conteúdo de carboidrato (e/ou metabólitos) das células corticais. O fato de algumas combinações fungo-hospedeiro, mesmo sob alto nível de fósforo disponível, apresentar alta taxa de colonização, indica que o mecanismo de controle pode diferir para diferentes hospedeiros e fungos (SIQUEIRA et al., 1984).

Comparações de dois fungos sob as mesmas condições de deficiência de fósforo indicaram que diferenças na eficiência de absorção de fósforo e transferência para as plantas não são correlacionadas nem com a porcentagem de infecção das raízes e nem com a extensão do desenvolvimento dos arbúsculos, mas com diferenças no fluxo de nutrientes (SMITH et al., 1994).

## 2.5. Matéria Orgânica do Solo: Formação, Estrutura e Caracterização

Em 1936, WAKSMAN caracterizou a matéria orgânica do solo (MOS) como uma mistura complexa formada na maior parte pela degradação microbiológica dos tecidos dos vegetais. Para STEVENSON & COLE (1999) os constituintes orgânicos do solo podem ser reunidos em dois grandes grupos: I – Não humificados e II – Humificados. Os componentes da MOS não humificados incluem aqueles compostos orgânicos de estrutura química definida (tais como lipídeos, carboidratos, nucleotídeos, aminoácidos, hormônios, ácidos orgânicos, etc.), resíduos animais e vegetais parcialmente decompostos e pela biomassa microbiana. Os componentes da MOS humificados representam a maior porção, consistindo de substâncias húmicas (SH), sendo elas amorfas, hidrofílicas, ácidas, parcialmente aromáticas e quimicamente complexas que variam em peso molecular de poucas centenas até milhares (TAN, 2003; STEVENSON, 1994; THENG et al., 1989). As substâncias húmicas (SH) por sua vez, são convencionalmente subdivididas em ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e huminas em função da solubilidade (em qualquer meio aquoso, em meio básico, e a fração residual insolúvel, respectivamente) (SANTOS & CAMARGO, 1999).

A formação das SH, processo genericamente denominado de humificação, foi considerada primeiramente como uma seqüência de reações espontâneas de condensação entre vários pequenos compostos intermediários liberados durante a quebra enzimática das macromoléculas (STEVENSON, 1994). As teorias de humificação foram baseadas na observação de que constituintes bioquímicos simples (p.ex.: aminoácidos, fenóis, açúcares) condensados abioticamente (especialmente em condições de altas concentrações e temperaturas), produzem uma reunião extremamente complexa de moléculas, a qual exibe coloração escura e a maioria das características físico-químicas da MOS, tais como, polifuncionalidade, flexibilidade estrutural e carga líquida negativa. Às reações de condensação são incluídas as reações de Maillard (caramelização) entre carboidratos e aminoácidos (ou proteínas) para formar produtos escuros, de caráter aromático (STEVENSON, 1994; SANTOS & CAMARGO, 1999).

Houve algumas mudanças nos paradigmas que balizaram o entendimento da humificação, decorrentes do avanço de uma série de métodos e técnicas de estudo da MOS (CANELLAS & SANTOS, 2005; SANTOS & CAMARGO, 1999). Por exemplo, as frações da matéria orgânica humificada (MOH) baseadas nas características de solubilidade (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina), não podem ser diretamente relacionadas com a taxa de ciclagem dos microrganismos, como as frações isoladas fisicamente, utilizando-se as propriedades de tamanho ou densidade moleculares (CANELLAS & SANTOS, 2005; TAN, 2003; HEDGES & OADES, 1997). O tamanho da molécula é pelo menos tão importante quanto o estado químico (refletido pela solubilidade em meio básico ou ácido) na determinação da reatividade da matéria orgânica.

A degradação da MOS parece ser um processo menos complexo do que se esperava, durante o qual grupos ou subunidades estruturais relativamente mais resistentes são seletivamente preservados (CANELLAS et al., 2001) e concentrados nas diversas frações de tamanho (CAYET & LINCHTFOUSE, 2001).

As substâncias húmicas são macromoléculas de alto peso molecular, sem fórmula molecular definida e geralmente composta de cadeias aromáticas e alifáticas, grupos cetônicos, fenólicos, enólicos, entre outros, que também estão presentes no vermicomposto (SANTOS & CAMARGO, 1999).

As substâncias húmicas (SH) desempenham um papel importante na qualidade dos sistemas agrícolas, pois interferem na disponibilidade de nutrientes para as plantas, são fontes de energia para os microrganismos do solo, influenciam de maneira decisiva nas

características químicas, físicas e biológicas do solo (MIELNICZUK, 1999) e exercem efeitos diretos sobre o desenvolvimento das culturas (STEVENSON & COLE, 1999). A relação entre estrutura e função das SH é objeto de crescente interesse nas pesquisas e cada vez mais são utilizados métodos precisos de análise química estrutural para tentar melhor compreender suas propriedades (CHUCOV, 2000; CANELLAS, 1999).

Muitas das funções importantes das substâncias húmicas permanecerão obscuras, até que a natureza química destas substâncias seja elucidada. É de conhecimento que a composição química das SH inclui muitos grupamentos aromáticos que interagem entre si, e com cadeias alifáticas, dando origem a outras macromoléculas de diferentes pesos moleculares. Considerando que a gênese das substâncias húmicas envolve combinações de várias reações e uma grande variação de compostos químicos, o que torna muito difícil uma definição clara na composição destas substâncias (HAYES, 1997). Muitos dos métodos clássicos para entender a natureza das substâncias húmicas estão baseados na sua composição elementar, mas os resultados obtidos representam uma aglomeração de moléculas o que torna impossível derivar fórmulas empíricas precisas destes dados (HAYES et al., 1989).

Os ácidos húmicos (AH) compõem a fração das substâncias húmicas solúveis em meio alcalino e insolúvel em meio fortemente ácido, definidos genericamente como macromoléculas orgânicas de massa molecular relativamente elevada e de coloração escura (THENG et al., 1989; SANTOS, 1984). Estruturalmente, os ácidos húmicos apresentam quatro grandes sub-unidades formadas por (i) longas cadeias alquílicas, (ii) polissacarídeos e compostos nitrogenados, (iii) derivados aromáticos e (iv) grupamentos carboxílicos. A composição dessas sub-unidades estruturais difere substancialmente entre os diferentes tipos de solos e cobertura podendo ser usada como um marcador das modificações do ambiente, apresentando uma maior importância como indicador ambiental (ZECH et al., 1997).

O grau de evolução dos ácidos húmicos indica a extensão do processo de humificação com aumento de massa molecular e com grau de complexidade estrutural. Os parâmetros físico-químicos mais comuns que norteiam o conceito de evolução dos ácidos húmicos (e das substâncias húmicas em geral, são:

- a diminuição do grau de oxigenação, ou seja, diminuição no conteúdo de grupamentos  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{OH}$  e  $\text{OCH}_3$  (KÖGEL-KNABER et al., 1997);
- a diminuição da absorvância nos AH mais evoluídos (TAN, 2003; KUMADA, 1987);
- a maior razão  $E_4/E_6$  (humificação) que se relaciona inversamente com o menor grau de evolução dos ácidos húmicos apresentando valores entre 2 e 5 (KONONOVA, 1966) com a diminuição do teor de radicais livres do tipo quinonas,
- o aumento do conteúdo de C elementar com a evolução (SCHNITZER & KHAN, 1978).

Os ácidos húmicos influenciam a fertilidade do solo por meio de uma melhoria geral das condições químicas e físicas para a atividade biológica tendo, além disso, substâncias ativas fisiologicamente (NARDI et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007; RODDA et al., 2006 a e b; FAÇANHA et al., 2002; CANELLAS et al., 2001; SONNTAG, 1995; STEVENSON, 1994; GUMINSKI et al., 1968) podendo influenciar também a biota rizosférica, particularmente os FMAs.

### **2.5.1. Dinâmica da absorção das frações solúveis da matéria orgânica**

A matéria orgânica é o principal agente cimentante para a agregação das partículas do solo, formando os agregados que controlam os suprimentos de água e ar para o crescimento das raízes e fornece resistência à erosão. A matéria orgânica afeta o pH do solo e é, em sistemas naturais, a maior fonte de nutrientes para as plantas, podendo assim influenciar direta

ou indiretamente no desenvolvimento e na eficiência das micorrizas (LIMA, 2004; STEVENSON & COLE, 1999; MARTIN et al., 1999).

Recentes investigações na absorção de SH, com pesos moleculares diferentes, pelas raízes das plantas proveram novas perspectivas (NARDI et al, 2007; NARDI et al., 2002). Quando raízes de ervilha foram cultivadas a temperaturas metabólicas na presença de substâncias húmicas, de baixo peso molecular, radioativas, as frações húmicas foram transportadas por uma extensão além da parede celular, além disso, foi determinado que 70% da radioatividade estavam presentes nas frações. Isto estava em contraste com o valor de 25% recuperados nas substâncias húmicas radioativas, de alto peso molecular (VAUGHAN, 1986).

Quando raízes de ervilha foram cultivadas a baixas temperaturas e na presença de duas frações húmicas lábeis, apenas a fração de alto peso molecular foi absorvida pelas raízes. Estes resultados reforçam a hipótese de que as raízes podem absorver as substâncias húmicas de qualquer peso molecular, evidenciando que a absorção das substâncias húmicas de baixo peso molecular é dependente no componente ativo de transporte (VAUGHAN, 1986). As substâncias húmicas de baixo peso molecular absorvidas pelas raízes foram transportadas até a parte aérea, mas as quantidades transportadas não foram superiores a 10-12% do total absorvido (VAUGHAN, 1986). Estes resultados foram confirmados por MUSCOLO & NARDI (1999), utilizando frações das substâncias húmicas de baixo e alto peso molecular conjugadas com isotiocianato fluorescente. Estes autores demonstraram ainda que apenas SH de baixo peso molecular interagiram com a membrana plasmática em culturas de células de cenoura.

### **2.5.2. Papel das substâncias húmicas na absorção de íons da solução**

A eficiência de absorção e utilização dos nutrientes é otimizada pelos FMAs, em parte pela extensão do volume de solo explorado por sua rede micelial que pode se estender de nove a doze centímetros além da superfície rizosférica (HARRISON, 2002; CAMEL et al., 1991), e em outra parte, por modificações fisiológicas da planta ainda pouco estudadas (BERBARA et al., 2006; HARRISON, 2005; KARANDASHOV & BUCHER, 2005; ZHU & MÜLLER, 2003; VAN AARLE et al., 2003; RELIG et al., 2002; BERBARA et al., 1995).

A influência do húmus do solo na absorção de íons, em geral no crescimento de plantas, foi estudado por vários pesquisadores (VARANINI & PINTON, 2001; CLAPP et al., 2001; CHEN & AVIAD, 1990; VAUGHAN & MALCOM, 1985). Os efeitos das substâncias húmicas na absorção de íons, presentes na solução do solo, parece ser mais seletiva e variável em relação à sua concentração e ao pH do meio, do que de outros fatores (NARDI et al., 2007; NARDI et al., 2002).

A fração ácido húmico também aumentou a capacidade de absorção de fosfato, mas retardou a absorção de cloreto (VAUGHAN & McDONALD, 1971). Além disso, foi relatado que SH de alto e de baixo peso molecular (ALBUZIO, 1986) e as frações ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF) podem afetar a absorção de  $N-NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  e de  $K^+$  em mudas de cevada e aveia (MAGGIONI et al., 1987). O efeito estimulatório mais proeminente das substâncias húmicas concentra-se na absorção de  $N-NO_3^-$  pelas raízes, embora isto só se torne evidente após várias horas de exposição (NARDI et al., 1991).

O efeito das substâncias húmicas na absorção pelas raízes não é facilmente explicável, devido a complexidade e natureza química desconhecida destas substâncias. Além disso, os efeitos descritos nos diversos trabalhos são de difíceis comparações, porque utilizaram substâncias húmicas com características diferentes (devido à origem do solo e dos métodos de extração). É possível que as substâncias húmicas possam apresentar efeitos diferentes em função do tipo de planta e que algumas destas podem resultar, diretamente ou indiretamente, em uma modulação na absorção de íons. Neste sentido, uma linha principal de evidência,

utilizando dois inibidores, um de transcrição (6-metilpurina) e de tradução (ciclo-hexamida), mostrou que o ácido húmico estimulou a síntese de proteína de transporte em raízes de cevada no nível de mensageiro de transcrição (DELL' AGNOLA & FERRARI, 1971; DELL' AGNOLA, 1981). Este mecanismo demonstrou que as substâncias húmicas, de alto e de baixo peso molecular, estimulada pelo  $\text{NO}_3^-$  promoveram a expressão de proteínas do seu transportador específico (VAUGHAN et al., 1985), e que também resultou na modificação dos parâmetros cinéticos (CACCO et al., 2000).

Entretanto, os efeitos das substâncias húmicas, de baixo e de alto peso molecular, na absorção de  $\text{NO}_3^-$  também poderiam ser explicadas considerando que estas substâncias podem apresentar função de fito-hormônio específicos (QUAGGIOTTI et al., 2004; NARDI et al., 1988; DEEL'AGNOLA & NARDI, 1987; CACCO & DEEL'AGNOLA, 1984), ou que eles induzem modificações do genoma estimulando a expressão de alguns genes (ATTINÀ et al., 1992). Foi observado por NARDI et al. (2000b) que só as substâncias húmicas de baixo peso molecular, juntamente com a atividade semelhante de giberilina, poderiam aumentar a absorção de  $\text{NO}_3^-$ , enquanto elas inibiram fortemente a atividade de ATPases microssomal e a extrusão de prótons ( $\text{H}^+$ ) através das raízes, da mesma maneira quando era utilizado giberilina. Os mecanismos sugeridos podem explicar por que o efeito estimulatório das substâncias húmicas de baixo peso molecular na absorção  $\text{NO}_3^-$  requer maiores períodos de incubação devido a uma indução tardia (NARDI et al., 2002; FAÇANHA et al., 2002).

Outras evidências são propostas pela hipótese de que as substâncias húmicas de baixo peso molecular pudessem interagir com o transporte de proteínas (adequado), principalmente na modulação de absorção de  $\text{NO}_3^-$ . Esta regulação é reforçada pela observação de que as substâncias húmicas de baixo peso molecular podem alcançar o apoplasto e interagir com a membrana plasmática das raízes (VAUGHAN, 1986) e de células de culturas de cenoura (MUSCOLO & NARDI, 1999). A primeira evidência para um efeito das substâncias húmicas está na atividade de proteínas (bombas de prótons) e o estímulo na atividade de  $\text{K}^+$ -ATPase (semelhante ao  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática) de frações microssomais (NARDI et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007; RODDA et al., 2006 a,b; NARDI et al., 2002; PINTON et al., 1992; MAGGIONI et al., 1987; NARDI et al., 1991).

Resultados semelhantes também foram obtidos mostrando que o ácido húmico estimulou a extrusão de prótons (vanadato-sensível) através das raízes, embora este aumento só foi obtido após 2-4 horas de incubação (PINTON et al., 1997). Não obstante, este efeito tem sido interpretado como consequência de um estímulo direto do AH na bomba de prótons ( $\text{H}^+$ -ATPase). Substâncias húmicas de baixo peso molecular também poderiam estimular a atividade de  $\text{H}^+$ -ATPase de vesículas isoladas da membrana plasmática (VARANINI et al., 1993), determinando assim um aumento no gradiente de prótons de substâncias eletro químicas, e que poderiam ser, pelo menos em parte, responsáveis pelo estímulo da absorção de  $\text{NO}_3^-$  (PINTON et al., 1999).

### **2.5.3. Atividade biológica das substâncias húmicas**

A matéria orgânica humificada (MOH) exerce efeitos diretos sobre o crescimento e metabolismo das plantas incluindo diversos processos metabólicos como respiração, teor e atividade de proteínas etc (STEVENSON & COLE, 1999; MUSCOLLO et al., 1993; NARDI et al., 1991). VAUGHAN & MALCOLM (1985) resumiu estes efeitos denominando-os, genericamente, de atividade biológica das substâncias húmicas (SH).

NANNIPIERI et al. (1993) resumiram os efeitos das substâncias húmicas (SH) sobre o metabolismo das plantas como sendo 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 nucleicos, (v) do efeito seletivo sobre a síntese protéica, e (vi) do aumento ou inibição da atividade de enzimas.

Diante de efeitos tão diversos, os alvos para estudos da interação substâncias húmicas-planta são difíceis de serem estabelecidos, particularmente devido à natureza complexa da estrutura das SH e da diversidade bioquímica dos vegetais. As  $H^+$ -ATPases de membrana plasmática por exemplo que são enzimas chaves na absorção de nutrientes influenciando o metabolismo e a adaptação de plantas ao meio ambiente, podem ser consideradas como alvos sensíveis para a identificação de respostas da atividade biológica das SH. Desta forma estas enzimas podem também evidenciar a influência das SH na formação e desenvolvimento das associações micorrízicas.

A redução do pH do apoplasto é também dependente da atividade das  $H^+$ -ATPases que acoplam o transporte de  $H^+$  através da membrana plasmática à hidrólise de ATP (adenosina trifosfato). Estas enzimas geram o gradiente eletroquímico necessário para o transporte de íons e moléculas inorgânicas através das membranas, além de participar de outras funções essenciais ao crescimento da planta (ARANGO et al., 2003), tais como, tolerância a salinidade (JANICKA-RUSSAK & KLOBUS, 2007), regulação do pH intracelular (KLYCHNIKOV et al., 2007) e expansão celular (MORSOMNE & BOUTRY, 2000; MAESHIMA, 2000). O alongamento celular é favorecido pela ação das expansinas que são enzimas que atuam em pH menor ou igual a 4,5 alterando a estrutura e ligações dos polímeros da parede celular (COSGROVE, 1998).

Em ensaios *in vitro* foram observados estimulação da  $H^+$ -ATPase vacuolar pelas SH de baixo peso molecular extraídas de solo (NARDI et al., 2002; VARANINI et al., 1993). Anteriormente, foi verificado um efeito similar de SH extraídas de coprólitos de minhocas sobre a  $H^+$ -ATPase, estimulada por  $K^+$ , na membrana plasmática obtida de milho (NARDI et al., 1991). Além disso, em ensaios *in vivo* também foi observada estimulação da atividade da  $H^+$ -ATPase e da absorção de  $NO_3^-$  em plântulas de milho tratadas com substâncias húmicas solúveis em água extraídas de turfas (PINTON et al., 1999). Entretanto, NARDI et al. (2000), encontraram forte inibição da  $H^+$ -ATPase estimulada por  $K^+$  também obtida de membrana plasmática isolada de milho, porém tratado com substâncias húmicas de baixo peso molecular. Estas discrepâncias encontradas na atividade de  $H^+$ -ATPases foram relacionadas às diferenças encontradas nas concentrações e na natureza química das SH testadas (NARDI et al., 2000).

Efeitos tardios, após a aplicação de matéria orgânica no solo, são mostrados em parte, na atividade da membrana plasmática (MP), influenciando positivamente a absorção de alguns nutrientes da solução do solo, em particular o nitrato ( $NO_3^-$ ) (NARDI et al., 2002). Os efeitos no metabolismo intermediário são menos compreendidos, embora pareça que as substâncias húmicas (SH) possam influenciar positivamente a respiração e a fotossíntese das plantas. As substâncias húmicas também parecem exibir uma atividade fito-hormonal, mas não está claro se esta atividade esteja ligada à estrutura química destas substâncias (NARDI et al., 2002), ou se depende de hormônios de origem microbiana ligados a estas estruturas.

Embora as substâncias húmicas, em particular as de baixo peso molecular, sejam absorvidas pelas raízes e translocadas para a parte aérea das plantas, e então, poderiam modificar ativamente o seu metabolismo (MUSCOLO & NARDI, 1999; VAUGHAN & MALCOM, 1985). Os efeitos destas substâncias são observados, principalmente, nas membranas celulares, promovendo a absorção de nutrientes pelas raízes (VARANINI & PINTON, 1995; VISSIER, 1986), ou no crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando como fito-hormônio (NARDI et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007; NARDI et al., 1996; VAUGHAN & MALCOM, 1985).



## 2.6. Influência das Substâncias Húmicas no Estabelecimento e Desenvolvimento da Simbiose Micorrízica

Os efeitos dos ácidos húmicos (AH) sobre as micorrizas ainda é pouco estudado. Entretanto já foi observado acréscimo na densidade de esporos em solos quando submetidos à incorporação de matéria orgânica (ZAMBOLIM et al., 1992), provavelmente devido ao favorecimento da aeração e aumento do desenvolvimento radicular. JOHNSON (1998) verificou que a colonização micorrízica era favorecida por aumentos no conteúdo de matéria orgânica do solo. Em pastagens, MARTIN et al. (1999) detectaram que ao acrescentar matéria orgânica, os efeitos benéficos dos FMAs nativos de áreas do cerrado sobre o crescimento das plantas foram mais expressivos. Entretanto, o uso de substrato com grandes proporções de matéria orgânica humificada (MOH), ou de MOH com grande quantidade de nutrientes principalmente o nitrogênio (PEREIRA et al., 1996) e fósforo (SAGGIN-JUNIOR et al., 1994), pode inibir a colonização micorrízica e diminuir a resposta à inoculação (SILVA et al., 1993).

As raízes finas e as hifas de FMAs próximas à matéria orgânica estão em posição vantajosa para absorver nutrientes liberados na sua decomposição. Em um experimento de laboratório foi observado que as hifas de FMAs crescem em direção à matéria orgânica e se beneficiam dos nutrientes liberados a partir dela e que em alguns casos a presença da matéria orgânica é importante para a formação de micorrizas (JANOS, 1987). A colonização micorrízica de raízes de leucena (*Leucaena leucocephala*) e algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Glomus etunicatum*, em rejeito de mineração de cobre, só foi possível com adição de matéria orgânica (SAGGIN-JÚNIOR et al., 2000a). A simbiose com FMAs promoveu um significativo aumento no teor de P destas plantas quando houve alguma adição de esterco ao rejeito (SAGGIN-JÚNIOR et al., 2000b). A colonização micorrízica, a densidade de propágulos e a densidade de esporos apresentaram correlações positivas com a matéria orgânica, em áreas de recuperação após mineração de carvão (GOULD et al., 1996).

Em outros casos foram observados efeitos negativos na formação da micorriza. CARRENHO et al. (2000) observaram que a matéria orgânica quando avaliada isoladamente não exerceu efeito sobre a colonização de raízes de sorgo, milho e amendoim e quando adicionada junto com o fósforo deprimiram a colonização radicular em solos sem calagem.

A matéria orgânica exerce papel importante na distribuição dos FMAs nos ecossistemas. Em regiões áridas incluindo desertos e pastagens, onde os solos apresentaram baixo conteúdo de matéria orgânica, os FMAs são abundantes (ALLEN et al., 1995). É provável que a matéria orgânica, em baixas concentrações no solo, estimule a micorrização e em condições de acúmulo de matéria orgânica no solo, a farta disponibilidade de nutrientes não representem vantagens para as micorrizas (STEVENSON & COLE, 1999).

Frações mais leves da matéria orgânica, contendo compostos fenólicos (ex.: ácido p-cumárico e p-hidroxibenzóico) em concentrações de até 0,25 mmol L<sup>-1</sup> estimularam a colonização micorrízica na cevada e no sorgo (FRIES et al., 1997). O uso de matéria orgânica combinada com a inoculação de micorrizas permite obter substratos mais eficientes para mudas de café que apresentam indicadores morfológicos e fisiológicos semelhantes às mudas obtidas com adubação mineral completa (GURIDI, 2000). No entanto, ainda são insuficientes as informações acumuladas sobre a relação substâncias húmicas-micorrizas-plantas.

## **CAPITULO I**

# **PRODUÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO POR VERMICOMPOSTAGEM E SUA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESPECTROSCÓPICA**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir ácido húmico (AH) por vermicompostagem e caracterizá-lo, química e espectroscopicamente, para fins de estudo. Esterco fresco de bovinos, após pousio de 20 dias, foi coletado e condicionado em anéis de concreto com minhocas (*Eisenia foetida*) por 70 dias até a completa transformação do material. O AH foi extraído conforme procedimento adotado pela sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS) e seco por liofilização para caracterização. A composição elementar é uma das propriedades mais estáveis dos ácidos húmicos e permite sugerir o grau de evolução desta fração da matéria orgânica. Os teores de C, H, N e O do ácido húmico estão dentro dos limites normalmente encontrados nas substâncias húmicas alcalino solúveis (ácido húmico e ácido fúlvico) que foram de  $47,0 \pm 0,1$ ;  $4,87 \pm 0,01$ ;  $3,02 \pm 0,03$  e  $45,1 \pm 0,03$  respectivamente, juntamente com as relações atômicas C/N, O/C, H/C que foram de  $15,6 \pm 0,1$ ;  $0,96 \pm 0,02$ ;  $0,104 \pm 0,005$ , respectivamente, caracterizando um material estável porém, pouco humificado ( $E_4/E_6$ ), devido ao rápido processo de transformação, com caráter mais aromático e no estado reduzido ( $\omega$ ). O espectro de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) foi importante para caracterizar as bandas de absorção dos diferentes grupos funcionais presentes na molécula de AH e suas possíveis atribuições. A vermicompostagem utilizando minhocas *Eisenia foetida* se apresenta como um sistema tecnológico de baixo custo e de rápida transformação de resíduos orgânicos, esterco bovino, em compostos de alto valor nutricional para as plantas, com altas concentrações de substâncias estáveis, as substâncias húmicas.

**Palavras chave:** Substâncias húmicas. Adubo orgânico. *Eisenia foetida*.

## ABSTRACT

The objective of this study was to produce humic acid (HA) from vermicomposting and to characterize it, chemistry and espectroscopically. Fresh bovine manure was collected and conditioned in concrete rings with earthworms (*Eisenia foetida*) for 70 days until the complete transformation of material. Extraction of HA follow procedures adopted by the international humics substances society (IHSS). It was dried and liofilized for characterization. The elementary composition suggest the degree of evolution of this fraction of organic matter. The levels of C, H, N and humic acid were inside of the limits usually found in the soluble alkaline humics substances (humic acid and fulvic acid) which were  $47.0 \pm 0.1$ ;  $4.87 \pm 0.01$ ;  $3.02 \pm 0.03$  and  $45.1 \pm 0.03$  respectively. The atomic relation C/N, O/C, H/C were  $15.6 \pm 0.1$ ;  $0.96 \pm 0.02$ ;  $0.104 \pm 0.005$ , respectively, characterizing a stable material although not much humified ( $E_4/E_6$ ), due to the fast transformation process, with more aromatic radicals in the reduced state ( $\omega$ ). The infrared spectrum with transformed Fourier protocol (IV-TF) was important to characterize the bands of absorption of different functional grouping in the HA molecule. The vermicomposting using earthworms *Eisenia foetida* comes as a technological system of low cost and fast transformation of organic residues, manure bovine, composed of high nutritional value for the plants, with high concentrations of stable substances, the humics substances.

**Key Words:** Humics substances. Organic fertilizer. *Eisenia foetida*.

## 1. INTRODUÇÃO

A fertilidade dos sistemas agrícolas foi considerada, principalmente a partir da segunda metade do século XX, como a capacidade do solo de fornecer nutrientes às plantas em quantidades satisfatórias, e que o balanço negativo entre o estoque de nutrientes e a necessidade das culturas deveria ser suprido com a adição de fertilizantes minerais vinculado ao processo industrial de insumos. Essa concepção, levada ao extremo, gerou o que ficou conhecido como Revolução Verde que, apesar das conquistas obtidas na produtividade também acarretou sérias conseqüências, desde a exclusão social de pequenos agricultores até a degradação ambiental e a não sustentabilidade dos agrossistemas. Conseqüentemente, um dos problemas centrais do século XXI é a obtenção da sustentabilidade da produção agrícola que procura o melhor aproveitamento dos resíduos produzidos nas propriedades tanto de origem vegetal como animal.

Com base nesta visão, busca-se otimizar a relação entre plantas, microrganismo benéficos e matéria orgânica do solo nos quais os diversos componentes podem ser manejáveis em busca de um equilíbrio ou otimização de um efeito. O entendimento de aspectos bioquímicos e morfológicos dessa relação enfatiza um dos aspectos mais relevantes para a agricultura que é a utilização de tecnologias limpas para a agricultura brasileira e que contribuirão ao melhor aproveitamento dos recursos do solo, sendo economicamente viável, tecnicamente possível, ecologicamente correta e socialmente justa.

O destino dos resíduos de plantas e animais, comumente denominados de matéria orgânica do solo, tanto a longo como em curto prazo é um objeto de estudo da biogeoquímica, iniciado no princípio do século XX através dos trabalhos de WAKSMAN (1936) e sendo considerada há milênios como o principal fator da fertilidade do solo devido a sua influência positiva sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (MIELNICZUK, 1999; OROZCO et al., 1996; ALBANELL et al., 1988) e exercem efeitos diretos sobre o desenvolvimento vegetal (NARDI et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007; RODDA et al., 2006 a, b; STEVENSON & COLE, 1999; TOMATI et al., 1995) afetando diretamente na produtividade das culturas (BACA et al., 1995). Nos últimos anos a sua utilização vem ganhando grande destaque em diversos sistemas de produção, principalmente em pequenas propriedades, sendo uma prática complementar e alternativa à adubação com fertilizantes sintéticos que, normalmente, não se considera o potencial de nutrientes no substrato nas adubações orgânicas por não haver precisão do teor de elementos químicos presentes.

A fertilidade dos solos geralmente é fortemente relacionada às características moleculares da fração alcalino solúvel do carbono orgânico, as substâncias húmicas (SH). Esta fração, ao mesmo tempo é dinâmica, refletindo mudanças no uso do solo, e também é uma das frações responsáveis pelo acúmulo da matéria orgânica no solo. O húmus ou matéria orgânica humificada fabricado pela natureza, é o resultado da transformação biológica de detritos vegetais e animais. É um processo lento e demorado na qual as folhas secas, flores, galho, restos de animais, enfim todos os detritos que são depositados no solo vão se decompondo pela ação da umidade e dos microorganismos nele existente, até formar uma massa escura. Este processo pode ser acelerado através da adoção de práticas da vermicompostagem na qual a ação das minhocas altera qualitativa e quantitativamente a composição dos materiais orgânicos e conseqüentemente das substâncias húmicas (LOUREIRO et al., 2007; AQUINO et al., 2005; AQUINO et al., 1992). O material humificado apresenta como vantagens maior disponibilidade de nutrientes, a capacidade de troca catiônica, a agregação das partículas do solo e a capacidade de retenção de água BÜNEMANN et al., 2004; WALLACE, 1994; AQUINO et al., 1992).

As substâncias húmicas (SH) representam a maior parte da matéria orgânica estável do solo e desempenham um papel importante na qualidade dos sistemas agrícolas. A relação entre estrutura e função das SH é objeto de crescente interesse nas pesquisas e cada vez mais são utilizados métodos precisos de análise química estrutural para tentar melhor compreender suas propriedades (CANELLAS & SANTOS, 2005; CHUCOV, 2000; CANELLAS, 1999). O objetivo deste trabalho foi produzir ácido húmico (AH) por vermicompostagem e caracterizá-lo, química e espectroscopicamente, para fins de estudos metabólicos com raízes transformadas cultivadas *in vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção do ácido húmico foi coletado esterco fresco de bovinos, criados sob manejo orgânico, após pousio de 20 dias, até atingir temperatura inferior a 35°C. Aproximadamente 200 L deste esterco foram acondicionados em anéis de concreto juntamente com 200 minhocas (*Eisenia foetida*) e cobertos com palha seca para sombrear e manter a umidade do ambiente. Os anéis de concreto (0,50 m de altura e 0,80 m de diâmetro) foram instalados na área do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA-Fazendinha Agroecológica, km 47), localizada no município de Seropédica - RJ. No fundo de cada anel foi colocada uma camada de cinco cm de pedra britada coberta com sombrite 70%, o que permitiu a drenagem do excesso de água nos anéis. A concentração química do esterco antes da vermicompostagem era em g Kg<sup>-1</sup> de 433,4 de C; 16,2 de N; 5,0 de P; 23,1 de K; 14,1 de Ca e 8,0 de Mg, com teor de umidade de 64,5% e relação C/N de 26,8.

Após a humificação do material, o que levou 70 dias, o vermicomposto foi peneirado para retirada das minhocas e deixado secar à sombra para posterior extração do ácido húmico, conforme procedimento adotado pela sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS) descrito por SWIFT (1996) com adaptações de BENITES et al. (2003) e caracterizado física e quimicamente (DICK et al., 1999).

O ácido húmico foi extraído com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, na razão vermicomposto:extrator de 1:10 (v/v) permanecendo em repouso por 16 horas, sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub>. A separação do ácido húmico foi conseguida por sua precipitação através da diminuição do pH da solução até 1,0 com HCl 6 mol L<sup>-1</sup>. Novamente foi solubilizado e precipitado por mais duas vezes, alterando-se o pH e lavando-o com água destilada. Em seguida, adicionou-se 200 mL de uma solução aquosa diluída contendo HF 0,25 mol L<sup>-1</sup> e HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> agitando a amostra por 8 horas. Em seguida, o ácido húmico foi separado do resíduo por decantação e sifonação, sendo o excesso de íons retirado através de diálise contra água deionizada. O extrato contendo o AH alcalino solúvel foi seco por liofilização e realizada sua caracterização química e físico-química.

A determinação da composição elementar foi realizada com analisador automático Perkin Elmer 2400 em amostras de 10 mg de AH em duplicata. A quantificação de carbono presente no AH foi realizada em triplicata como descrito por KONONOVA (1982). O conteúdo de oxigênio (O<sub>2</sub>) foi determinado por diferença, descontado o teor de cinzas obtido com a incineração de três amostras do AH em mufla a 700°C.

A acidez total foi obtida em amostras de 50 mg de AH diluídas em 20 ml de Ba(OH)<sub>2</sub> 0,125 mol L<sup>-1</sup> preparado com água fervida (sem CO<sub>2</sub> dissolvido). O ar dos frascos foi deslocado por vácuo e o sistema submetido à agitação por 24 horas em temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada, separando-se resíduos precipitados que foram lavados com água fervida. O filtrado foi titulado potenciométricamente até pH 8,4 com HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> e a acidez calculada conforme SCHINITZER & GUPTA (1965).

Para a determinação da acidez carboxílica, amostras com 50 mg de AH foram diluídas em 40 ml de água sem CO<sub>2</sub> e 10 ml de Ca(OAc)<sub>2</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>. O sistema foi submetido a agitação por 24 horas, à temperatura ambiente, sendo a suspensão obtida filtrada e o resíduo precipitado lavado com água sem CO<sub>2</sub>. O filtrado foi titulado potenciométricamente até pH 9,8 com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e realizado um cálculo para determinação da acidez carboxílica, conforme SCHINITZER & GUPTA (1965).

A relação E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>, que avalia o grau de humificação dos AH, foi obtida através da razão da absorvância na região do ultra-violeta visível (UV-Vis) de uma solução do AH (4 mg em

10 mL de  $\text{NaHCO}_3$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) em absorvância de 465 nanômetros (nm) ( $E_4$ ) e 665 nm ( $E_6$ ), em três repetições.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) do tipo III (STEVENSON, 1994; STEVENSON & GOH, 1971) do ácido húmico foram obtidos na faixa de intensidade de ondas (número de ondas  $\text{cm}^{-1}$ ) de  $400 \text{ cm}^{-1}$  até  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando-se pastilhas com 1 mg de AH em 100 mg de KBr (TAN, 1995), com correção da linha base para absorção igual a zero em  $4000 \text{ cm}^{-1}$  e posteriormente em  $2000 \text{ cm}^{-1}$ .

O índice de hidrofobicidade (IH), que avalia a resistência, foi estabelecido através da relação alifáticos/polissacarídeos (estiramento C-H do grupamento hidrofóbico  $-\text{CH}_3$  alifático) e estiramento C-O de grupamentos hidrofóbicos de polissacarídeos.

O índice de condensação (IC) foi estabelecido pela razão aromático/alifáticos (grupamentos aromáticos, quinonas e/ou carboxilatos) e estiramento C-H do grupamento hidrofóbico  $-\text{CH}_3$  alifático.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição elementar é uma das propriedades mais estável dos ácidos húmicos (RICE & MACCARTHY, 1991) e permite sugerir o grau de evolução desta fração da matéria orgânica. É aceito que com o aumento do grau de evolução das substâncias húmicas ocorra aumento no teor de carbono (C) e nitrogênio (N) nestas substâncias (KONONOVA, 1982). Os dados de composição elementar (% de carbono-C, hidrogênio-H, nitrogênio-N e oxigênio-O), das relações atômicas (C/N, H/C, O/C e E<sub>6</sub>/E<sub>4</sub>), grau de oxidação ( $\omega$ ) e de acidez (total, carboxílica e fenólica) do ácido húmico extraído de vermicomposto de esterco bovino são apresentados na Tabela 1. Os teores de C, H, N e O do ácido húmico estão dentro dos limites normalmente encontrados nas substâncias húmicas alcalino solúveis (ácido húmico e ácido fúlvico) (CANELLAS & SANTOS, 2005; TAN, 2003; ORLOV, 1995; BRAVARD & RHRIGI, 1991; SCHNITZER & KHAN, 1978).

O teor de C presente na molécula de AH estudado (Tabela 1) é comparável aos índices encontrados na fração de ácido fúlvico (AF) (STEVENSON, 1994), sugerindo um baixo grau de evolução deste AH, que é um produto da rápida transformação da matéria orgânica submetida ao processo de vermicompostagem utilizando minhocas, que atuam como aceleradoras no processo de decomposição. Segundo OROZCO et al. (1996) a atividade das minhocas no processo de vermicompostagem pode promover a obtenção de um produto final com baixa relação C/N, maior capacidade de troca catiônica e maior quantidade das substâncias húmicas. Embora a relação C/N não possa ser utilizada como indicador absoluto da maturação do composto, pois depende do material de origem, é um dos índices mais utilizados, e define sua qualidade agrônômica (BERNA et al., 1996).

**Tabela 1.** Composição elementar (% de C, H, N e O), das relações atômicas (C/N, H/C, O/C e E<sub>6</sub>/E<sub>4</sub>), grau de oxidação ( $\omega$ ) e acidez (total, carboxílica e fenólica) do ácido húmico extraído de vermicomposto utilizado nos experimentos.

Propriedade	Ácido Húmico (AH)
C (%)	47 ± 0,1 <sup>1</sup>
H (%)	4,87 ± 0,01
N (%)	3,02 ± 0,03
O (%)	45,1 ± 0,03
C/N	15,6 ± 0,10
O/C	0,96 ± 0,02
H/C	0,104 ± 0,005
E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub> (grau de humificação)	6,87
$\omega$ (grau de oxidação)	-0,76
Acidez Total (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	454,76
Acidez carboxílica (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	337,50
Acidez fenólica (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	305,36

<sup>1</sup> Erro padrão da média

É possível que a eficiência de assimilação de C pelas minhocas e, conseqüentemente, o estímulo à atividade microbiana e que as minhocas mortas decompõem-se muito rapidamente liberando, aproximadamente, 12% de N no meio (BARLEY, 1961), o que pode levar a algumas variações das formas inorgânicas de N durante a vermicompostagem, o que pode explicar a alta concentração de N no ácido húmico estudado (Tabela 1).

O valor de um fertilizante orgânico pode ser avaliado em função do conteúdo de matéria orgânica humificada sendo que o esterco bovino que passou pelo processo de vermicompostagem tem seu conteúdo de matéria orgânica humificada (ácidos fúlvicos, húmicos e humina) acrescido em até 30% (AQUINO et al., 1992). SOARES e CAVALHEIRO (2004) observaram que as minhocas apresentam em seu metabolismo a capacidade de promover a degradação do material original, concentrando os nutrientes, aumentando de três a onze vezes o teor de fósforo assimilável, de potássio e magnésio trocáveis no solo, e ainda eleva de cinco a dez vezes o teor de nitratos e em 30% o de cálcio, reduzindo a acidez do solo.

As relações atômicas C/N, H/C e O/C são freqüentemente utilizados para identificar substâncias húmicas de diferentes procedências e acompanhar suas mudanças estruturais nos diferentes ambientes (STEELINK, 1985).

De uma maneira geral, compostos com relação C/N entre 10 e 15 são considerados relativamente estáveis (TAN, 2003; BERNA et al., 1996), o que significa que a decomposição da matéria orgânica está em equilíbrio entre a síntese e a acumulação de novos materiais. A relação atômica C/N obtida no AH estudado foi de  $15,6 \pm 0,1$  o que o caracteriza como sendo um composto estabilizado. Os menores valores da relação C/N nos AH indicam maior estabilidade química desta fração humificada.

Segundo FLAIG (1975) a insolubilização do fenol e a condensação das quinonas, principais precursores das substâncias húmicas, é resultante das reações mediadas por compostos nitrogenados e que, por conseqüência, ocorre acumulação de N ocorre durante o processo do humificação. O aumento do conteúdo de N na molécula é um indicador do processo de evolução dos AH, evidenciando a presença de transformações químicas mais intensas (KUMADA, 1987). No processo do humificação, há um aumento de reações de condensação (acoplamento de moléculas pela perda de água e pela adição de átomos de C e diminuição dos teores de O e H) (STEVENSON, 1994).

A relação atômica O/C, que é um indicador do grau de humificação, determinada no AH estudado foi de  $0,96 \pm 0,02$  e esta alta relação, provavelmente, é devido ao rápido processo de obtenção do ácido húmico (vermicompostagem). Para RICE & MACCARTHY (1991) a relação atômica O/C nas substâncias húmicas varia de 0,08 a 1,20 e que, os ácidos húmicos mais evoluídos, apresentam valores para a relação O/C entre 0,421 e 0,657 e é considerado o melhor parâmetro para se diferenciar entre os tipos de compostos húmicos (ácidos fúlvico e húmico) (STEELINK, 1985). TAN (2003) relata que as relações N/C são igualmente adequadas para tal diferenciação, que é considerada, freqüentemente, como um índice do processo de decomposição de resíduos orgânicos.

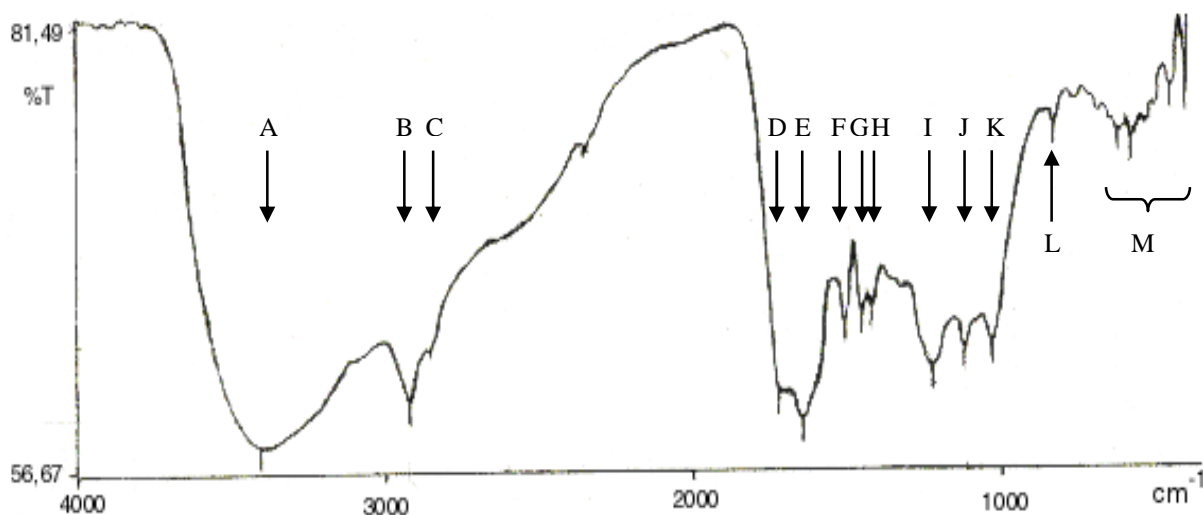
As relações atômicas H/C das substâncias húmicas, geralmente, variam entre 0,08 a 1,85 (RICE & MACCARTHY, 1991; ORLOV, 1985; STEELINK, 1985) e é considerada como uma medida indireta das características estruturais dos AH que, quanto menor o valor da relação, mais acentuado é o caráter aromático do carbono. No ácido húmico estudado foi determinada uma relação H/C de  $0,104 \pm 0,005$  que está de acordo com os valores comumente encontrados nas substâncias húmicas.

O símbolo  $\omega$  se refere ao valor da oxidação interna nas substâncias húmicas e é considerado importante para estudar sua formação (TAN, 2003). O valor de  $\omega$  quando negativo se refere às substâncias no estado reduzido e significa a presença excessiva de átomos de hidrogênio (H) nas substâncias e quando positivo significa que as substâncias estão

no estado oxidado, ou seja, substâncias que contêm oxigênios (O) adicionais. TAN (2003) postula que o valor de  $\omega$  varia entre um mínimo de -4 e um máximo de +4, correspondendo à formação de grupamentos CH e CO, respectivamente. No ácido húmico estudado o valor de  $\omega$  determinado foi de -0,76.

A análise de UV-Vis é amplamente utilizada na caracterização das substâncias húmicas (SH). A razão  $E_4/E_6$  pode ser usada como parâmetro do grau de humificação. Há uma relação inversa entre a razão e o grau de humificação das substâncias húmicas (SH) e a massa molecular, portanto, era de se esperar uma relação direta entre os valores da razão  $E_4/E_6$  e os valores da relação atômica H/C uma vez que a presença de estruturas alifáticas confere valores maiores para a relação atômica indicando menor grau de humificação. CHEN et al. (1977) demonstraram que o parâmetro mais relacionado com a razão  $E_4/E_6$  foi a massa molecular das SH, sendo esta relação maior que a sua composição elementar. A relação  $E_4/E_6$  do AH estudado foi de 6,87, sendo este valor freqüentemente encontrado para a fração de ácido fúlvico, caracterizando o material como pouco humificado.

Na Figura 1 é apresentado o espectro de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) do ácido húmico do tipo III (STEVENSON, 1994; STEVENSON & GOH, 1971) que foi utilizado para caracterizar as possíveis atribuições dos grupamentos funcionais no AH obtido de vermicomposto.



**Figura 1.** Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier do ácido húmico (em intensidade de ondas  $\text{cm}^{-1}$ ) (as possíveis atribuições dos grupamentos funcionais referentes às letras de A a M são explicadas no texto).

Foi observada uma banda de absorção na região de  $3407,8 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 1 A), que pode ser atribuída a estiramentos axiais ( $\nu$ ) de ligações -OH e, possivelmente, grupos -NH de aminas alifáticas podem estar combinadas. A largura da banda de absorção é consequência das interações dos sistemas -OH através de pontes de hidrogênio (H) entre diferentes moléculas (pontes intermoleculares) e na mesma molécula (intramolecular). Assim, a presença de bandas de absorção menos definidas e mais alargadas nesta região indica a formação mais intensa de pontes de hidrogênio intramoleculares, o que pode caracterizar maior complexidade estrutural.

A banda de absorção em  $2925,0 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 1 B), utilizada para determinar o índice de hidrofobicidade (IH) e o índice de condensação (IC), é atribuída a estiramento simétrico ( $\nu_s$ ) de ligações C-H em  $\text{CH}_2$  alifáticos e a banda de absorção em  $2853,8 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 1 C) pode ser atribuída a estiramentos assimétricos ( $\nu_{as}$ ) de grupamentos C-H de  $\text{CH}_2$  alifáticos.

A banda de absorção em 1723,1  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 1 D) pode ser atribuída a estiramento de grupos C=O de ácido carboxílico com possíveis atribuições de C=O de ésteres. As bandas em 1646,8 e em 1510,6  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibrações axiais de grupos C=C de alquenos (Figura 1 E) e vibrações do anel aromático (C=C) (Figura 1 F), respectivamente.

As bandas de absorção em 1457,6 e em 1422,1  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas para deformações angulares ( $\delta$ ) de grupos  $(\text{CH}_2)_n$ , sendo  $n=3$  (Figura 1 G) e de grupos  $-\text{CH}_2$  de carbonilas (Figura 1 H), respectivamente.

As bandas observadas em 1224,2; 1123,3 e 1033,6 podem ser atribuídas a estiramentos C-O de ésteres saturados associados a restos de polissacarídeos (Figura 1 I), a estiramentos C-O associado à estrutura de álcoois secundários (Figura 1 J) e a estiramentos C-O associados à álcoois primários (Figura 1 K), respectivamente.

A banda de absorção em 829,9  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 1 L) pode ser atribuída a deformações angulares de -H contínuos “para” substituintes a anéis substituídos. As bandas de absorção observadas na faixa inferior a 600  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 1 M) podem ser atribuídas a possíveis impurezas de carbonatos inorgânicos associados a metais.

As possíveis atribuições das bandas de absorção dos espectros de IV-TF do ácido húmico de vermicomposto estão apresentadas na Tabela 2. A região entre 1300 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  é denominada como região de “impressão digital” da molécula, podendo ser usada para comparações inequívocas entre diferentes ácidos húmicos (GARCÉS, 1987), indicando que diferentes fontes de matéria orgânica podem produzir compostos de mesma natureza química.

**Tabela 2.** Principais atribuições das bandas de absorção dos espectros de infra-vermelho com transformada de Fourier (IV-TF) do ácido húmico (AH) de vermicomposto.

Bandas de absorção (ondas $\text{cm}^{-1}$ )	Prováveis atribuições
A 3407,8	$\nu$ -OH (ponte de H) e/ou -NH livres
B 2925,0	$\nu_s$ $\text{CH}_2$ alifáticos
C 2853,8	$\nu_{as}$ $\text{CH}_2$ alifáticos
D 1723,1	$\nu_{as}$ C=O de ácido carboxílico e/ou ésteres
E 1646,8	vibrações axiais C=C de alquenos
F 1510,6	vibrações de C=C do anel aromático
G 1457,6	$\delta$ de $(\text{CH}_2)_n$ : $n=3$
H 1422,1	$\delta$ de $-\text{CH}_2$ de carbonila
I 1224,2	$\nu_{as}$ C-O de ésteres associados a polissacarídeos
J 1123,3	$\nu_{as}$ C-O associado a álcoois secundários
K 1033,6	$\nu_{as}$ C-O associados a álcoois primários
L 829,9	$\delta$ de -H contínuos “para” substituintes a anéis substituídos
M < 600	possíveis impurezas de carbonatos inorgânicos associados a metais

$\nu$  = estiramento axial;  $s$  = simétrico;  $as$  = assimétrico;  $\delta$  = deformação angular

Apesar da espectroscopia de IV ser utilizada amplamente para análise qualitativa, a técnica também pode ser aplicada à análise semi-quantitativa de alguns grupamentos funcionais, principalmente os oxigenados. FREIXO (2000), determinou o índice de hidrofobicidade (IH) e o índice de condensação (IC) do ácido húmico, a partir da relação obtida pela integração da área de banda correspondente aos grupamentos alifáticos (C-H) pelos grupamentos polares (C-O). O ácido húmico estudado demonstrou um IH de 0,989 o que determina ser um material bastante resistente à degradação oxidativa, isto porque os grupamentos alifáticos são mais hidrofóbicos e menos suscetíveis a oxidação, quando comparados com os polissacarídeos. Assim, quanto maior esta relação maior será a resistência do ácido húmico à degradação.

O índice de condensação (IC) representa a relação entre grupamentos aromáticos e alifáticos. Os grupamentos aromáticos caracterizam moléculas mais condensadas enquanto os alifáticos se referem às moléculas com cadeias saturadas. Quanto maior o valor obtido do IC, maior o grau de humificação e estabilidade dos compostos. No ácido húmico estudado foi determinada uma relação de 0,994 mostrando ser um material pouco humificado, por ser oriundo de uma vermicompostagem rápida, e representa baixa estabilidade dos compostos presentes. Esses dados reforçam a análise de composição elementar e de espectroscopia na região do UV-visível.

#### 4. CONCLUSÕES

A composição elementar é uma das propriedades mais estável dos ácidos húmicos e permite sugerir o grau de evolução desta fração da matéria orgânica.

O espectro de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) foi importante para caracterizar as bandas de absorção dos diferentes grupamentos funcional presentes na molécula de AH e suas possíveis atribuições.

A vermicompostagem utilizando minhocas *Eisenia foetida* se apresenta como um sistema tecnológico de baixo custo e de rápida transformação de resíduos orgânicos, esterco bovino, em compostos de alto valor nutricional para as plantas, com altas concentrações de substâncias estáveis, as substâncias húmicas.

## **CAPITULO II**

### **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO HÚMICO**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido húmico no crescimento de raízes transformadas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), foram utilizadas diferentes concentrações de AH, 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 mg C L<sup>-1</sup> e controle (sem AH);, ao meio de cultivo para calibração da curva de resposta, com coletas aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem. As raízes foram crescidas *in vitro* em meio mínimo (MM), com pH ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave a 121 °C e a 1,5 atmosferas (162 kPa) por 15 minutos. As avaliações de crescimento, incremento e pH rizosférico foram realizadas através de imagens digitais após editoração. Na avaliação da área radicular (cm<sup>2</sup>) foram observadas diferenças estatísticas apenas a partir de 45 dias após a repicagem, onde o tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> foi superior apenas ao tratamento controle. O tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> proporcionou o maior comprimento radicular (cm) em todas as épocas de avaliação, exceto para os tratamentos 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup> aos 15 dias, e também apresentou o melhor incremento em área radicular em relação aos demais tratamentos em todas as épocas de avaliação (15, 30 e 45 dias), mas não houve diferenças estatísticas aos tratamentos com 10 e 40 mg C L<sup>-1</sup> nos períodos avaliados. Através da equação da curva de calibração foi determinado que a concentração de 26 mg C L<sup>-1</sup> aos 15 e 30 dias e 25 mg C L<sup>-1</sup> aos 45 dias foram as melhores concentrações para indução do crescimento (área radicular) e para o comprimento radicular as concentrações mais responsivas foram 24; 22 e 23 mg C L<sup>-1</sup> aos 15, 30 e 45 dias, respectivamente. Nos períodos de 0 a 15, 15 a 30 e de 30 a 45 dias, as raízes tiveram um incremento médio em área de 517,33; 124,63 e 82,22% e no comprimento de 677,82; 94,95 e 55,68, respectivamente. Os resultados indicam que a estimativa da área de cobertura (exploração) e do comprimento do sistema radicular foi suficiente para sugerir que existe bioatividade no ácido húmico, promovendo um crescimento radicular superior ao tratamento controle (sem AH) na medida em que se aumentou sua concentração no meio de cultivo das raízes transformadas e que a melhor época para avaliação dos benefícios da adição do ácido húmico ao meio de cultivo das raízes crescidas “*in vitro*”, quanto ao desenvolvimento radicular, foi até aos 30 dias, devido ao seu maior incremento.

**Palavras chave:** Substâncias húmicas. Crescimento radicular. Curva de calibração.



## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of humic acid in the growth of transformed roots of basil (*Ocimum basilicum* L.). There were used different concentrations of humic acid, 10.0; 20.0; 40.0; 80.0 and 160.0 mg C L<sup>-1</sup> and control (without AH) with samples made after 15, 30 and 45 days. The roots were grown *in vitro* in minimum media (MM), with pH adjusted for 5.8 before the sterilization in autoclave to 121 °C and 1.5 atmospheres (162 kPa) for 15 minutes. The evaluations of growth, increment and rizospheric pH were accomplished through digital images after editorial editing. In the evaluation of root area (cm<sup>2</sup>) statistical differences were only observed after 45 days in the treatment with 20 mg C L<sup>-1</sup>. The treatment with 20 mg C L<sup>-1</sup> provided the largest radicular length (cm) in all the evaluations, except for the treatments 80 and 160 mg C L<sup>-1</sup> which after 15 days also presented the good increment of root area in relation to the other treatments in all the evaluation times (15, 30 and 45 days). There were not statistical differences to the treatments with 10 and 40 mg C L<sup>-1</sup>. Through the equation of the calibration curve it was determined that the concentration of 26 mg C L<sup>-1</sup> after 15 and 30 days and 25 mg C L<sup>-1</sup> after 45 days were the best concentrations for induction of the growth (radicular area). For the radicular length the most responsive concentrations were 24, 22 and 23 mg C L<sup>-1</sup> after 15, 30 and 45 days, respectively. In the periods from 0 to 15, 15 to 30 and from 30 to 45 days, the roots had an increment in area of 517.33; 124.63 and 82.22% and in the length of 677.82; 94.95 and 55.68, respectively. The results indicate that the estimate of the covering area (exploration) and of the length of the radicular system may suggest that bioactivity exists in the humic acid, promoting a higher radicular growth

**Key Words:** Humic substances. Roots growth. Calibration curve.

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura é a primeira atividade profissional desenvolvida pela espécie humana, a qual tinha por objetivo apenas produzir para sua alimentação. Antes da agricultura, todo o alimento era coletado na natureza. Primeiramente, a alimentação era à base de frutas, folhas verdes, brotos e raízes. Com o passar do tempo as aldeias, como eram chamados os lugares onde viviam os humanos, começaram a criar e reservar alguns locais (as roças) para cultivarem as plantas que serviriam de alimento. Esse sistema de agricultura, chamado de agricultura tradicional, tem como principal característica a produção diversificada, o que fornecia para as pessoas uma alimentação bastante variada e era realizada tendo como base o manejo dos materiais disponíveis nas propriedades rurais. Dentre esses materiais, destacam-se aqueles de origem orgânica (esterco, restos de cultura, composto, etc.) que possibilitam melhorias na qualidade do solo e da produtividade vegetal.

Embora o índice de matéria orgânica em solos tropicais represente aproximadamente 1% da massa do solo, o húmus (matéria orgânica humificada) é uma das frações mais importantes destes solos evidenciando ser uma fonte de nutriente de liberação lenta (SKJEMSTAD et al., 1998) que do ponto de vista da sustentabilidade dos sistemas de produção, a aplicação dos resíduos orgânicos, unicamente como forma de restabelecer o balanço de nutrientes do solo, tornou-se uma função de menor importância e pouco eficiente, sendo então necessário estabelecer a sincronia na liberação de nutrientes com a necessidade das plantas (BÜNEMANN et al., 2004) já que pode afetar diretamente o metabolismo e crescimento das plantas (VAUGHAN & MALCOLM, 1985) pela liberação de moléculas bioativas como a auxina (ATIYEH et al., 2002; BOTTOMLEY, 1917) influenciando significativamente a produção (BACA et al., 1995),

Entretanto, os vermicompostos, produtos da origem da atividade enzimática de minhocas, apresentaram uma aceleração na transformação da matéria orgânica em húmus resultando num material com grandes quantidades de substâncias húmicas (ácido fúlvico, ácido húmico e humina), com menor relação C/N, maior capacidade de troca catiônica (ELVIRA et al., 1998; ALBANELL et al., 1988) e fitormonais (ATIYEH et al., 2002; ATIYEH et al., 2000; TOMATI et al., 1995) permitindo a rápida liberação de nutrientes para os vegetais. Entretanto, as informações da aplicação destes vermicompostos ao solo e sobre o crescimento radicular das culturas são escassos e ainda requerem um consentimento por parte dos agricultores quanto à sua produção e utilização.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos proporcionados ao crescimento de raízes transformadas de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.) após a adição de diferentes concentrações de ácido húmico, 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 mg C L<sup>-1</sup> e controle (sem AH), ao meio de cultivo para calibração da curva de resposta em diferentes épocas, aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

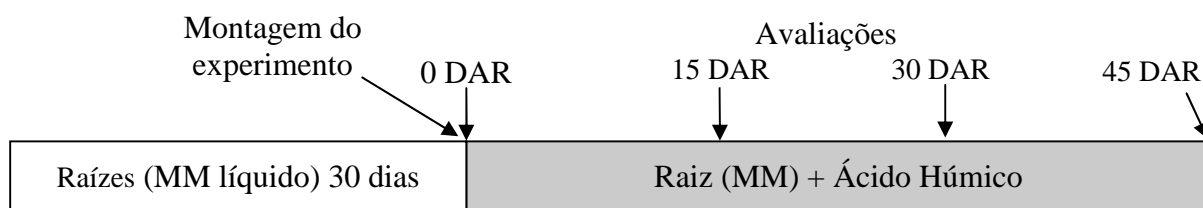
As concentrações de ácido húmico, mensuradas a partir do teor de carbono (C) elementar presente em sua estrutura, foram determinadas através de levantamentos dos teores totais de ácido húmico (AH) em diversas classes de solos no Estado do Rio de Janeiro sob diversas formas de cobertura, desde pastagens degradadas a áreas sob mata atlântica intactas (RAPOSO et al., 2004). Após este levantamento foram determinadas seis concentrações de ácido húmico a serem utilizadas neste experimento, por estarem dentro da faixa de concentração de ácido húmico mais representativa nos solos estudados. As seis concentrações de AH determinadas, mensuradas a partir do teor de carbono, foram: 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 160,0 mg C L<sup>-1</sup> e controle (sem AH). Os valores de AH obtidos estão dentro da faixa de concentrações citadas nas literaturas que variam até 500 mg C L<sup>-1</sup> (ATIYEH et al., 2002; GURIDI, 2000; FRIES et al., 1997) e que valores acima desta concentração podem apresentar efeito inibitório sobre o desenvolvimento das raízes (ATIYEH et al., 2002; CHEN & AVIAD, 1990).

O ácido húmico utilizado foi proveniente de uma rápida vermicompostagem, 70 dias, utilizando minhocas *Eisenia foetida*. Foi extraído conforme procedimento adotado pela sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS) descrito por SWIFT (1996) com adaptações de BENITES et al. (2003) e caracterizado quimicamente (DICK et al., 1999) e por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) (TAN, 1995; STEVENSON, 1994; STEVENSON & GOH, 1971). Os teores de C, H, N e O do ácido húmico foram de 47,0 ± 0,1; 4,87 ± 0,01; 3,02 ± 0,03 e 45,1 ± 0,03 respectivamente, juntamente com as relações atômicas C/N, O/C, H/C que foram de 15,6 ± 0,1; 0,96 ± 0,02; 0,104 ± 0,005, respectivamente, caracterizando um material estável porém, pouco humificado (E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>), devido ao rápido processo de transformação, com caráter mais aromático e no estado reduzido ( $\omega$ ) (descrito no Capítulo I).

As raízes transformadas de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.) (NICOMEDES JUNIOR, 2003) foram multiplicadas em erlenmeyers contendo meio MM líquido por um período de 30 dias antes da montagem do experimento, este procedimento proporcionou a padronização das raízes. Na montagem do experimento, foram repicados dois segmentos de ápices radiculares, com cinco centímetros (cm) de comprimento, em placas Petri contendo meio mínimo (MM) semi-sólido (conforme descrito no item 2.1).

Para a avaliação dos efeitos (benefícios) proporcionados pela adição de ácido húmico ao meio de cultivo das raízes transformadas foi quantificado o crescimento radicular em área (cm<sup>2</sup>) e comprimento (cm) e o seu incremento em relação ao tratamento controle, em todas as épocas de avaliação. Foi utilizada a metodologia de editoração de imagens digitais de acordo com LIMA et al. (2006) descrita no item 2. 2.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) num esquema fatorial 6x4, sendo seis concentrações de ácido húmico (AH) em quatro épocas distintas (montagem do experimento (dia zero), aos 15, 30 e 45 dias após a montagem do experimento) (Figura 2), em oito repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo software estatístico Sisvar (FERREIRA, 1998), e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p≤0,05).



**Figura 2.** Esquema do experimento realizado para avaliação dos efeitos proporcionados pela adição de ácido húmico (AH) (10; 20; 40; 80; 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) à solução de cultivo. As análises foram realizadas na montagem do experimento (dia zero), 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR). (MM= meio mínimo).

## 2.1. Cultivo das Raízes Transformadas

Para a calibração da curva de resposta dos teores de carbono (presente no ácido húmico) na solução de cultivo foram avaliados a área e o comprimento de raízes transformadas (RTs) de manjerição roxo (*Ocimum basilicum* L.) (NICOMEDES JUNIOR, 2003) crescidas *in vitro* em meio mínimo (MM) (BÉCARD & FORTIN, 1988) (Tabela 3), com pH ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave a 121 °C e a 1,5 atmosferas (162 kPa) por 15 minutos.

**Tabela 3.** Composição do meio mínimo (MM) (BÉCARD & FORTIN, 1988) utilizado para o cultivo das raízes transformadas.

Reagente	mg L <sup>-1</sup>	Reagente	mg L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	731,00	Aminoácidos	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	288,00	Mio Inositol	50,00
KNO <sub>3</sub>	80,00	Glicina	3,00
KCl	65,00	Ácido Nicotínico	0,50
NaFeEDTA	8,00	Tiamina.HCl	0,10
MnCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	6,00	Pirodoxina.HCl	0,10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,80		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,65	Fonte de Carbono	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,50	Sacarose	10000
KI	0,75		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,13	Agente solidificante	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0024	Gel Gro *	3000

\* Reagente utilizado para solidificar o meio de cultura para cultivo das raízes *in vitro*.

## 2.2. Editoração de Imagens

Para avaliação do desenvolvimento radicular (área em cm<sup>2</sup> e do comprimento em cm) das raízes transformadas foi utilizada a metodologia de editoração de imagens digitais proposta por LIMA et al. (2006). Resumidamente, com uma câmera digital de 5.0 Mega pixels foram capturadas imagens das placas Petri com resolução de 1280 x 960 pixels, 16,7 milhões de cores (24 Bits), no formato JPEG, utilizando a mesma altura da câmara e o mesmo zoom (automático). Junto à placa Petri, em uma posição uniforme, no momento da digitalização, foi colocada uma escala quadriculada de tamanho conhecido como referência para extrapolação da medida da área e comprimento radicular (Anexo 2).

Para o processamento das imagens visando a avaliação da taxa de crescimento foi utilizado o software “Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo” 3.0 (SIARCS<sup>®</sup> 3.0) (JORGE & CRESTANA, 1996). Para ser possível a análise das imagens no SIARCS<sup>®</sup> foi necessária a modificação das imagens para um formato aceito pelo software conforme metodologia descrita por OLIVEIRA et al. (2003). Assim, a definição das imagens foi reduzida de 16,7 milhões para 256 cores, e os arquivos transformados do formato JPEG para o formato bitmap (BMP).

O desenvolvimento (crescimento) das raízes foi acompanhado através de imagens capturadas das placas Petri nos dias das avaliações e as medidas da estimativa do tamanho real das raízes em cm<sup>2</sup> para área e em cm para comprimento não sendo necessário o uso de equações.

Para o incremento da área (% cm<sup>2</sup>) e do comprimento radicular (% cm) foi realizado o cálculo conforme a equação 1 em todas as épocas de avaliação (Montagem do experimento, 15, 30 e 45 dias).

*Equação 1*

$$\text{Incremento radicular (\%)} = \frac{\text{tamanho final} - \text{tamanho inicial}}{\text{tamanho inicial}} \times 100$$

Com este procedimento foi possível a avaliação da porcentagem de crescimento nos períodos avaliados em relação ao tamanho inicial das raízes no dia da montagem do experimento.

Para se avaliar os efeitos do ácido húmico em relação ao tratamento controle, foi adotada a equação 2, considerando que o desenvolvimento normal das raízes fosse o tratamento sem ácido húmico (controle) e que este desenvolvimento fosse 100% em todas as épocas.

*Equação 2*

$$\text{Correlação (\%)} = \frac{\text{tamanho final com AH} - \text{tamanho final do controle}}{\text{tamanho final do controle}} \times 100 + 100$$

Com este procedimento foi possível a comparação da correlação dos efeitos (benefícios) proporcionados pela adição de ácido húmico à solução de cultivo das raízes transformadas.

Para avaliar o incremento das raízes transformadas entre os períodos de avaliação foi realizado conforme a equação 3.

*Equação 3*

$$\text{Incremento entre períodos (\%)} = \frac{\text{tamanho das raízes no período avaliado}}{\text{tamanho das raízes no período anterior}} \times 100 - 100$$

Com este procedimento foi possível a comparação do incremento radicular entre os períodos avaliados (Zero a 15, 15 a 30 e de 30 a 45 dias).

### 2.3. pH Rizosférico

Para a avaliação do pH rizosférico foi medida, em duas épocas distintas (montagem do experimento e 5 horas após o contato raiz-solução), a área de acidificação e/ou alcalinização na interface das raízes em duas soluções distintas, solução de controle e solução com inibidor vanadato (que inibe a atividade das bombas de prótons da membrana plasmática). A solução controle utilizada continha um indicador misto de pH (Tabela 4) (RÖMHELD et al., 1984), adquirindo uma tonalidade amarelada quando ácidos e arroxeadas quando alcalinos (Anexo 3). O pH das soluções foi ajustado para 6,0 com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , adquirindo uma tonalidade avermelhada, e foi armazenado por um dia para garantir a não interferência de possíveis contaminações na mudança da coloração do meio.

**Tabela 4.** Meios utilizados para a avaliação do pH rizosférico.

Reagentes	Controle	Vanadato
Agar (p:v)	$7,5 \text{ g L}^{-1}$	$7,5 \text{ g L}^{-1}$
Azul de bromocresol	$0,06 \text{ g L}^{-1}$	$0,06 \text{ g L}^{-1}$
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	-	$1,0 \text{ mmol L}^{-1}$
$\text{K}_2\text{SO}_4$	$2,5 \text{ mmoles L}^{-1}$	$2,5 \text{ mmoles L}^{-1}$
$\text{CaSO}_4$	$1,0 \text{ mmol L}^{-1}$	$1,0 \text{ mmol L}^{-1}$

Foram coletados segmentos de raízes, com aproximadamente 10 cm de comprimento, com auxílio de uma pinça anatômica, evitando ao máximo provocar injúrias, e lavadas em água destilada corrente com pH ajustado para 6,0 sob peneira plástica com diâmetro de 1 milímetro (mm). Em seguida, foram secadas em papel absorvente e acondicionadas nas placas Petri contendo os meios com indicador misto de pH.

Para a avaliação da área de mudança do pH rizosférico foi utilizada a metodologia de editoração de imagens proposta por LIMA et al. (2006). As imagens das raízes foram obtidas no momento do acondicionamento das raízes no meio com indicador misto de pH e cinco horas após este acondicionamento.

Para o cálculo da área de mudança do pH rizosférico utilizou-se a equação 4.

*Equação 4*

$$\text{Área de acidificação (\%)} = \frac{\text{área acidificada final} - \text{área inicial da raiz}}{\text{área inicial da raiz}} \times 100$$

Com este procedimento foi possível avaliar a diferença na área de atuação entorno das raízes através da modificação do pH da solução após um intervalo de 5 horas.

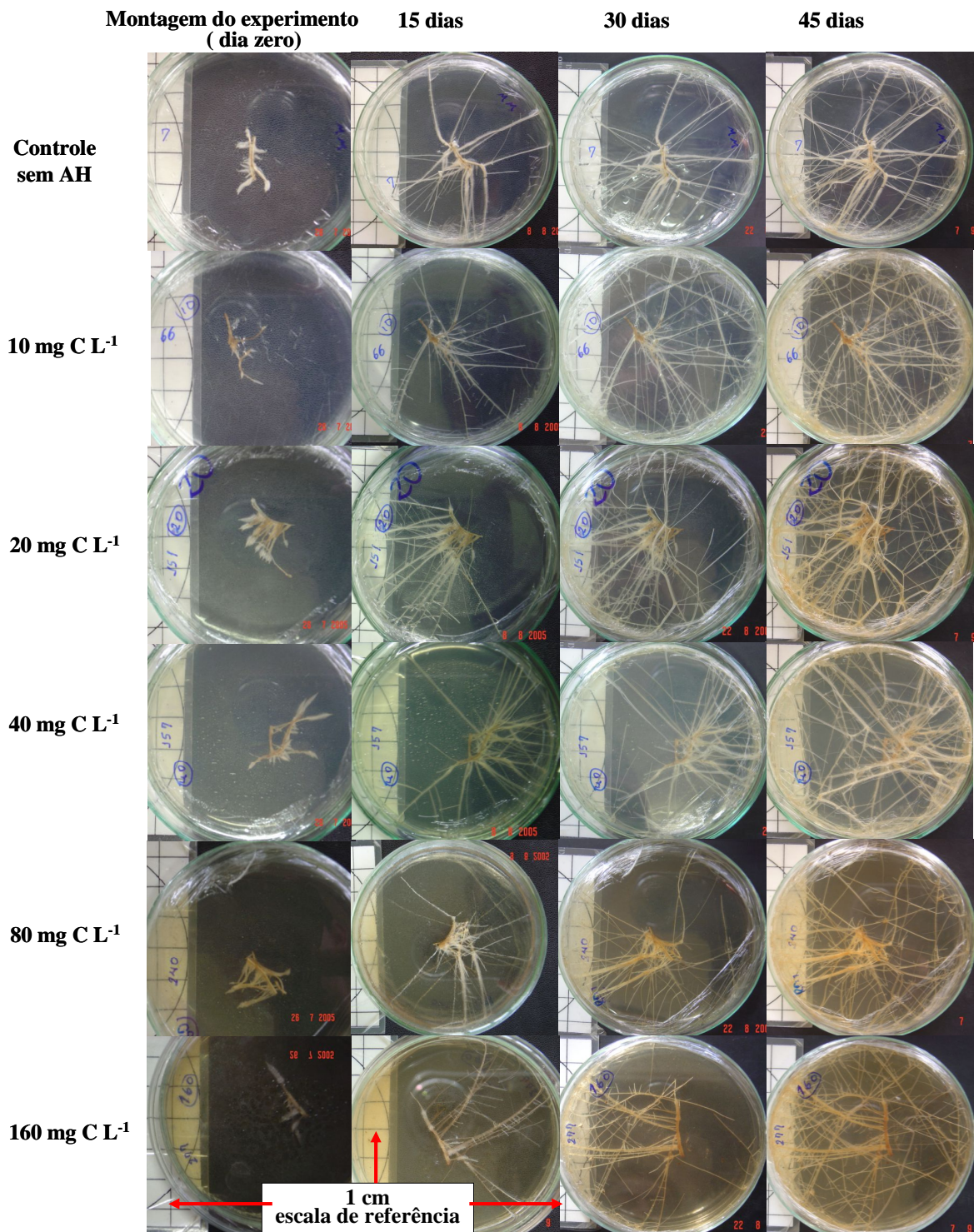
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de vermicomposto como fonte de substâncias húmicas apresenta algumas vantagens tais como sua fácil obtenção, fonte renovável de matéria orgânica, apresenta grande capacidade de estimulação do crescimento vegetal (NARDI et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007; RODDA et al., 2006 a,b; QUAGGIOTTI et al., 2004; LIMA, 2004; NARDI et al., 2002; FAÇANHA et al., 2002; MASCIANDARO et al., 1999) e portanto, contribuir para recuperação de áreas degradadas e possibilitando a adaptação das plantas à ambientes de baixa fertilidade.

Para o acompanhamento da influência do ácido húmico no desenvolvimento das raízes de manjeriço foram obtidas as imagens no experimento foram digitalizadas na montagem do experimento (dia zero) e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR) (Figura 3).

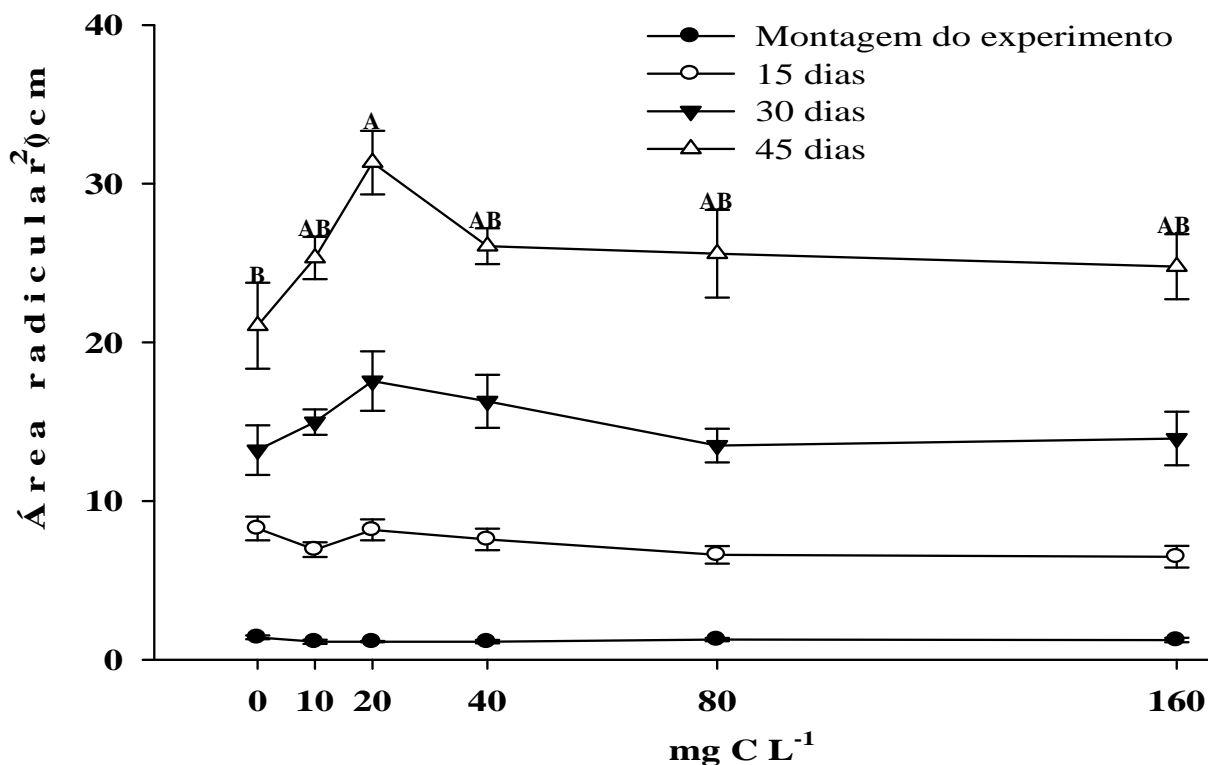
Do ponto de vista da sustentabilidade dos sistemas de produção, a manutenção de altos teores de matéria orgânica no solo, como forma de restabelecer o balanço de nutrientes, tornou-se de grande importância atualmente, e a sincronia da liberação de nutrientes, oriundos da matéria orgânica, com a necessidade das plantas tornou-se uma das metas mais importante a serem alcançadas (BÜNEMANN et al., 2004) a fim de minimizar a entrada de adubos químicos e, conseqüentemente, viabilizar os custos de produção. Entretanto, a carência de estudos para a determinação das concentrações ótimas nos diversos sistemas de cultivo para a calibração da curva de resposta continua a ser um desafio para a ciência do solo. Tais concentrações serão discutidas neste experimento em raízes transformadas crescidas “in vitro” e poderão servir como base para futuros trabalhos a campo.

Na avaliação do desenvolvimento em área ( $\text{cm}^2$ ) de raízes transformadas de manjeriço em diferentes concentrações de ácido húmico (10, 20, 40, 80 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$ ) e controle (sem ácido húmico) foram observadas diferenças significativas somente a partir de 45 dias após a repicagem, onde o tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  foi superior ao tratamento controle (sem ácido húmico), mas não houve diferenças entre os demais tratamentos (Figura 4). Estes resultados evidenciam que os benefícios no crescimento em área das raízes podem necessitar de maiores períodos de tempo para que possam ser significativos.



**Figura 3.** Imagens digitalizadas das raízes transformadas de manjeriço submetidas aos diferentes tratamentos com ácido húmico (AH): 10, 20, 40, 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle (sem AH) obtidas no dia da montagem do experimento e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR). (n = 8).



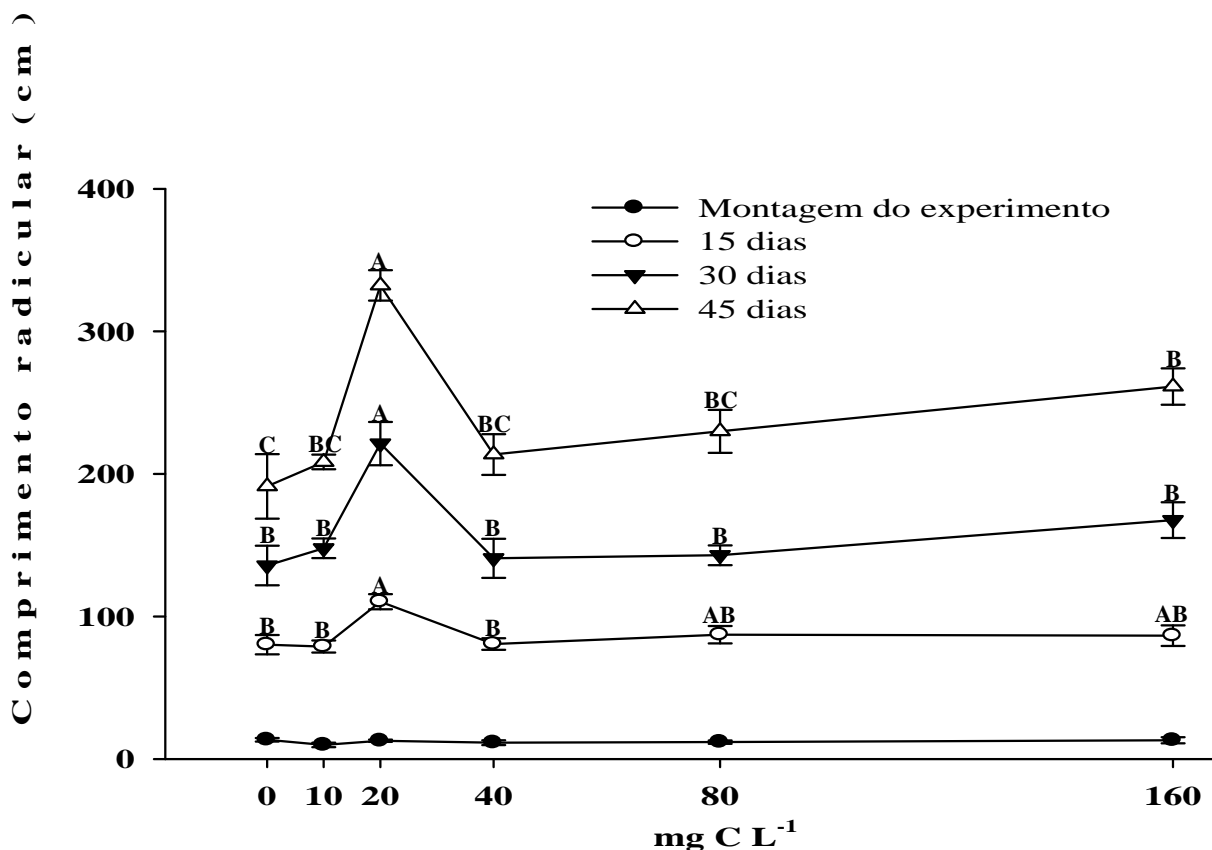


**Figura 4.** Área radicular ( $\text{cm}^2$ ) das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM), enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem ácido húmico) nos dias de montagem do experimento e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR). Barras verticais indicam os erros padrões. ( $n = 8$ ). Letras iguais no mesmo período de avaliação não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para a avaliação do comprimento radicular as imagens após editoração para a estimativa da área radicular passaram por um afinamento realizado pelo próprio software (SIARCS), tendo suas medidas calculadas em cm (Figura 5).

O tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  proporcionou o maior desenvolvimento em comprimento radicular quando comparado aos demais tratamentos em todas as épocas de avaliação, exceto para os tratamentos 80 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  aos 15 dias de crescimento (Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Nas avaliações aos 30 e 45 dias o tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  foi significativamente superior aos demais tratamentos. Estes resultados enfatizam a superioridade dos benefícios da concentração de 20  $\text{mg C L}^{-1}$  a solução de cultivo, a partir da segunda época de avaliação (30 dias), apresentando quase o dobro do crescimento em comparação ao tratamento controle (sem AH) o que pode resultar em grandes benefícios aos vegetais na exploração (absorção) de nutrientes e água do meio, acarretando em maiores produtividades.

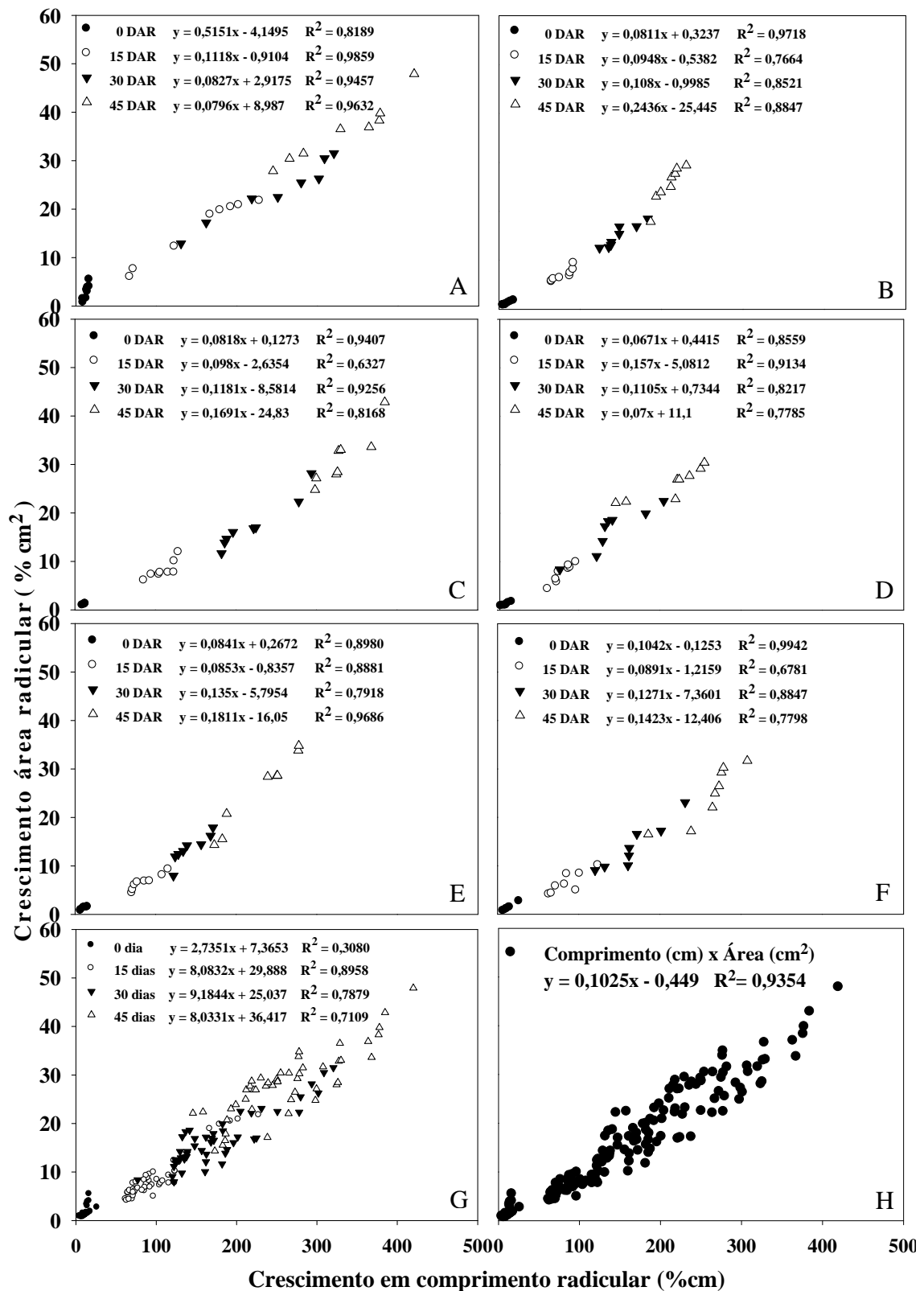
A correlação entre o comprimento e a área radicular dos diferentes tratamentos com ácido húmico (10, 20, 40, 80 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$ ) e controle (sem AH) nos quatro períodos de avaliação (montagem do experimento, 15, 30 e 45 dias) foram positivas e altas (Figura 6). Na montagem do experimento (dia zero) a menor correlação foi observada no tratamento controle (sem AH) com  $R^2$  de 0,8189 (Figura 6 A) e a maior correlação foi encontrada no tratamento de 160  $\text{mg C L}^{-1}$  com  $R^2$  de 0,9942 (Figura 6 F). Nas avaliações posteriores (15 e 30 dias) o tratamento controle (sem AH) apresentou as maiores correlações entre comprimento e área radicular, sendo  $R^2$  de 0,9859 e 0,9457, respectivamente. Aos 45 dias foi a segunda maior correlação com  $R^2$  de 0,9632 propiciando um desenvolvimento mais homogêneo das raízes.



**Figura 5.** Comprimento radicular (cm) das raízes transformadas de manjerição crescidas em meio mínimo (MM), enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem ácido húmico) na montagem do experimento e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR). Barras verticais indicam os erros padrões. (n = 8). Letras iguais no mesmo período de avaliação não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

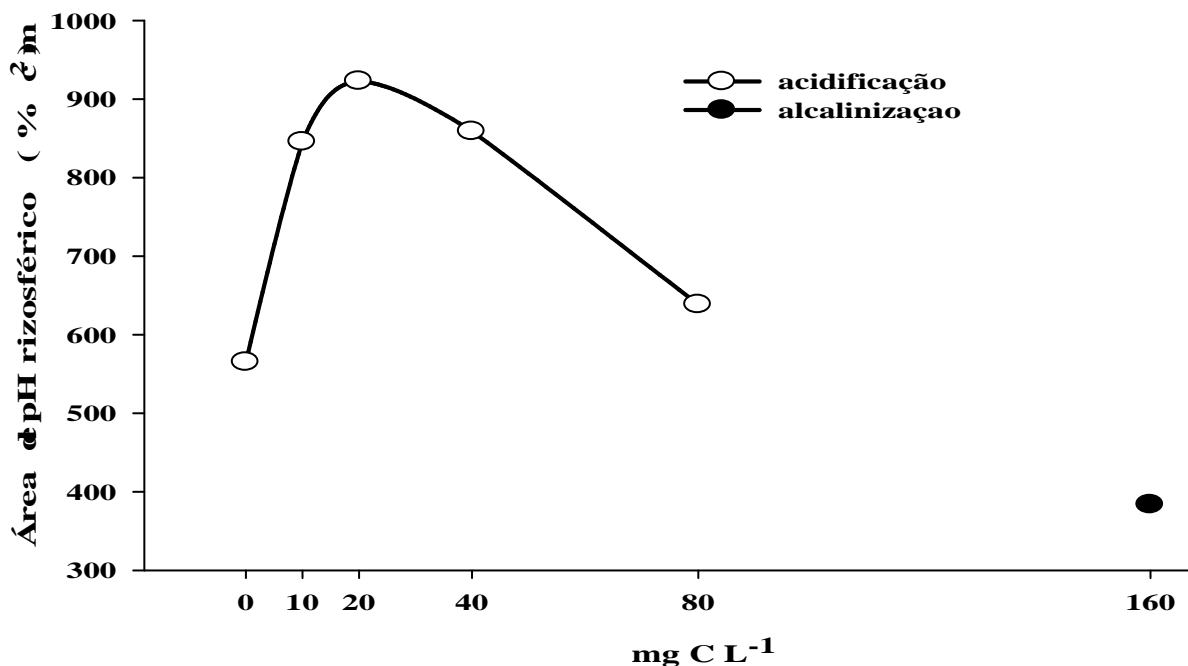
As menores correlações determinadas nos períodos foram observadas no tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,6327$ ) aos 15 dias (Figura 6 C), no tratamento com 80 mg C L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,7918$ ) aos 30 dias (Figura 6 E) e no tratamento com 40 mg C L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,7785$ ) e com 160 mg C L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,7798$ ) aos 45 dias (Figura 6 D e F). A menor correlação encontrada no tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> aos 15 dias pode ser consequência da maior indução na formação de sítios mitóticos e de raízes laterais pré-emergidas nesta concentração de ácido húmico como relatado por CANELLAS et al. (2002), resultando em comprimento radicular maior que a área radicular (Figura 4 e Figura 5). As menores correlações encontradas nos tratamentos com 80 e 40 mg C L<sup>-1</sup> aos 30 e 45 dias podem ser em decorrência de uma indução (adaptação) de crescimento radicular mais tardia (Figura 5) proporcionada pelas altas concentrações de ácido húmico no meio de cultivo.

A correlação do comprimento e área radicular com todos os tratamentos de ácido húmico (10, 20, 40, 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup>) e controle (sem AH) nas avaliações da montagem do experimento ( dia 0), aos 15, aos 30 e aos 45 dias foram de 0,3080; 0,8958; 0,7879 e 0,7109 respectivamente, (Figura 6 G) e a correlação geral determinada nos períodos avaliados foi de 0,9354 resultando uma uniformidade de desenvolvimento radicular (área e comprimento) das raízes submetidas aos tratamentos com ácido húmico (Figura 6 H).



**Figura 6.** Correlação entre comprimento e área radicular das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM), submetidos as diferentes concentrações de ácido húmico (AH): controle (sem AH) (A), 10 mg C L<sup>-1</sup> (B), 20 mg C L<sup>-1</sup> (C), 40 mg C L<sup>-1</sup> (D), 80 mg C L<sup>-1</sup> (E) e 160 mg C L<sup>-1</sup> (F) na montagem do experimento e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR) isoladamente (A, B, C, D, E, F), a junção de todos os tratamentos dentro dos períodos de avaliação (G) e a junção de todas as correlações em todos os períodos de avaliação (H). (n = 8).

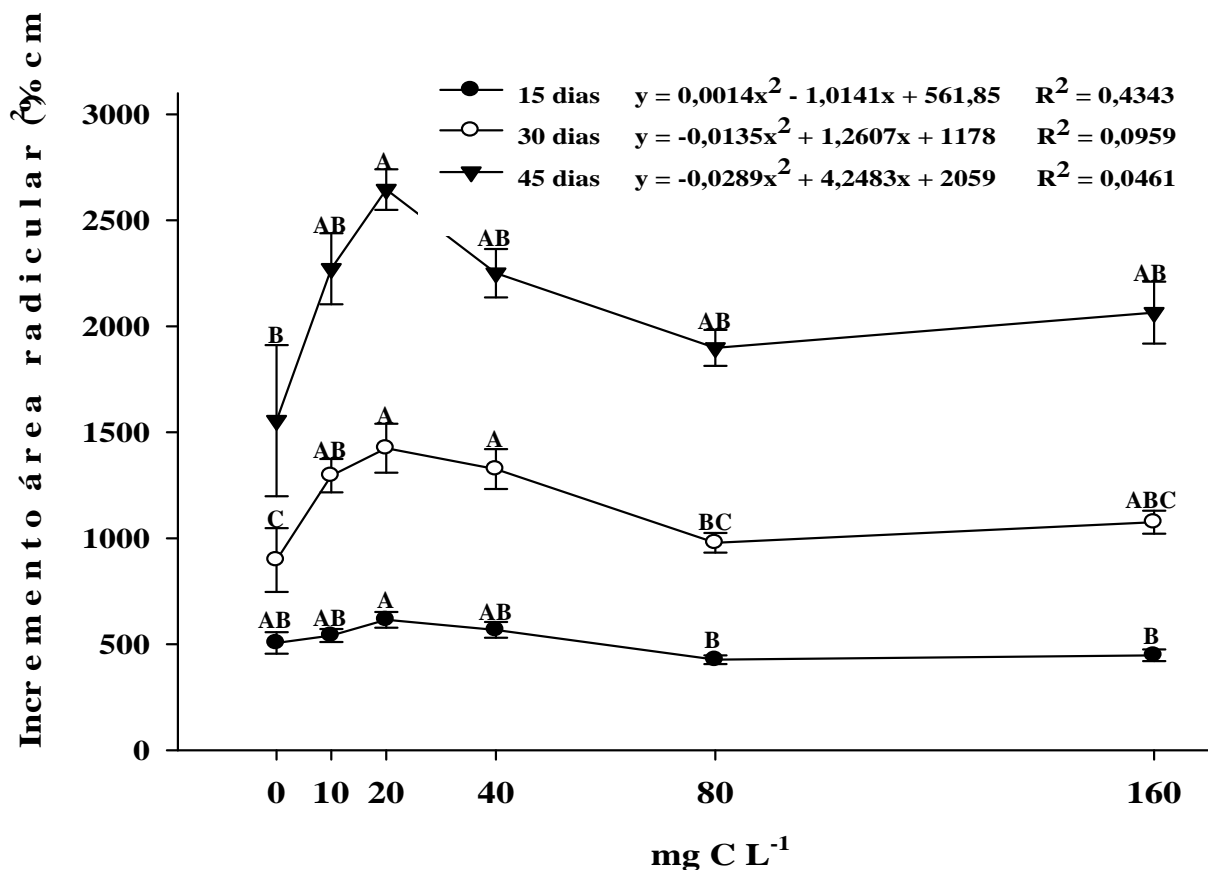
Um dos possíveis fatores que pode explicar a resposta não significativa na indução do crescimento radicular, até a avaliação de 30 dias, com o aumento das concentrações de ácido húmico na solução de cultivo é a transição do pH rizosférico. As concentrações de ácido húmico induziram aumentos na área de acidificação em relação ao tamanho da raiz, até a adição da concentração de 20 mg C L<sup>-1</sup> e decresceu com as concentrações de 40 e 80 mg C L<sup>-1</sup>. Na concentração de 160 mg C L<sup>-1</sup> foi observado uma alcalinização da rizosfera (Figura 7) o que pode ser uma resposta adaptativa das raízes ao meio de cultivo com alta concentração de ácido húmico e que esta alcalinização do pH na rizosfera provocou alterações na absorção de íons da solução acarretando em menor desenvolvimento radicular.



**Figura 7.** Área de modificação do pH rizosférico (% cm<sup>2</sup>) aos 30 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) modificado, enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) para a solução com indicador misto de pH na qual permaneceram por um período de cinco horas de contato.

O incremento radicular (Figura 8) foi importante para a verificação do aumento no crescimento radicular entre os períodos avaliados levando em consideração o tamanho inicial dos explantes radiculares que neste caso apresentaram-se homogêneos (Figura 4 e Figura 5), e que o desenvolvimento foi influenciado apenas pelos tratamentos com ácido húmico.

O tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> apresentou o melhor incremento em área radicular em relação aos demais tratamentos em todas as épocas de avaliação (15, 30 e 45 dias), mas não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com 10 e 40 mg C L<sup>-1</sup> nos períodos avaliados (Figura 8). O tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> foi estatisticamente superior aos tratamentos com 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup> na primeira avaliação (15 dias), aos tratamentos controle e 80 mg C L<sup>-1</sup> na segunda avaliação (30 dias) e apenas ao tratamento controle na terceira avaliação (45 dias), evidenciando ser a concentração mais benéfica para o desenvolvimento das raízes. O tratamento controle apresentou o menor incremento em área radicular a partir da segunda avaliação (30 e 45 dias) (Figura 8).



**Figura 8.** Incremento na área radicular (%) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) modificado, enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) com as equações das regressões de 2º grau e os respectivos R<sup>2</sup>. Barras verticais indicam os erros padrões. (n = 8). Letras iguais no mesmo período de avaliação não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O incremento em área radicular submetido ao tratamento com 10 mg C L<sup>-1</sup> foi estatisticamente superior apenas ao tratamento controle (sem AH) somente no segundo período de avaliação (30 dias). O tratamento com 40 mg C L<sup>-1</sup> também apresentou incremento em área radicular superior aos tratamentos controle (sem ácido húmico) e com 80 mg C L<sup>-1</sup> aos 30 dias de avaliação (Figura 8).

Além dos benefícios de aumento na área radicular, as raízes que receberam ácido húmico na solução nutritiva tiveram um desenvolvimento mais homogêneo, o que pode ser constatado quanto ao erro padrão das amostras (Figura 8 e Tabela 5) que sempre foram superiores no tratamento controle (sem ácido húmico) em todas as épocas avaliadas.

Foram avaliados os incrementos proporcionados pela adição do AH ao meio de cultivo entre os períodos avaliados (0-15, 15-30 e 30-45 dias), em relação aos incrementos obtidos no tratamento controle (sem ácido húmico) calculados pela equação 3, o qual consideramos que representasse o desenvolvimento normal das raízes sendo aqui representado com o valor 100% em todos os períodos de avaliações (Tabela 5) com seus respectivos erros padrões.

**Tabela 5.** Incremento na área radicular (% cm<sup>2</sup>) em relação ao tratamento controle sem ácido húmico (100 %) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjerição crescidas em meio mínimo (MM) modificado, enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem ácido húmico) com seus respectivos erros padrões. (n = 8).

Ácido húmico (mg C L <sup>-1</sup> )	Incremento na área radicular (%)					
	0-15 dias		0-30 dias		0-45 dias	
	(%)	erro padrão	(%)	erro padrão	(%)	erro padrão
<b>0</b>	100,0AB	10,1	100,0 C	16,8	100,0 B	22,9
<b>10</b>	106,9AB	6,0	144,4ABC	8,8	146,1AB	10,8
<b>20</b>	121,6A	7,4	158,8A	12,9	170,1A	6,2
<b>40</b>	112,2AB	7,3	147,8AB	10,5	144,7AB	7,3
<b>80</b>	84,4 B	4,0	109,1 BC	5,2	122,0AB	5,5
<b>160</b>	88,5 B	5,4	119,9ABC	6,1	132,7AB	9,4
<b>CV</b>		19,3		23,5		24,8

Letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

No primeiro período de avaliação (de 0 a 15 dias) o tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> foi significativamente superior aos tratamentos com 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup>, mas não apresentando diferença para os demais tratamentos. No segundo período de avaliação (de 0 a 30 dias) o tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> foi superior aos tratamentos com 80 mg C L<sup>-1</sup> e ao tratamento controle (sem AH) e o tratamento controle também foi inferior ao tratamento com 40 mg C L<sup>-1</sup> mas não diferindo dos demais tratamentos. No terceiro período de avaliação o tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> foi superior apenas ao tratamento controle (sem AH), mas não ocorrendo diferença entre os demais tratamentos. Estes resultados reforçam a hipótese de que a concentração de 20 mg C L<sup>-1</sup> foi a mais benéfica para o desenvolvimento das raízes (relação benefício/custo), desde os momentos iniciais do contato raiz-ácido húmico (AH).

Os incrementos na área radicular entre os períodos avaliados de 0 a 15, de 15 a 30 e de 30 a 45 dias, calculados pela equação 5, apresentaram diferenças estatísticas apenas no primeiro e segundo período (Tabela 6). No primeiro período de avaliação (de 0 a 15 dias) apenas o tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> foi estatisticamente superior aos tratamentos com 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e não havendo diferenças entre os demais tratamentos. No segundo período de avaliação (de 15 a 30 dias) todos os tratamentos com ácido húmico foram estatisticamente superiores ao tratamento controle (sem ácido húmico). No terceiro período de avaliação, o possível esgotamento de nutrientes na solução de cultivo, principalmente nos tratamentos que apresentaram maior crescimento inicial (até 30 dias) pode ter ocasionado a não diferenciação estatística entre os tratamentos.

**Tabela 6.** Incremento na área radicular (%  $\text{cm}^2$ ) entre os períodos de avaliação de 0 a 15, de 15 a 30 e de 30 a 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem ácido húmico) com seus respectivos erros padrões. (n = 8).

Ácido húmico ( $\text{mg C L}^{-1}$ )	Incremento na área radicular entre os períodos avaliados					
	0-15 dias		15-30 dias		30-45 dias	
	$\text{cm}^2$	erro padrão	$\text{cm}^2$	erro padrão	$\text{cm}^2$	erro padrão
<b>0</b>	506,1 AB	50,9	73,6 B	17,0	65,8 <sup>(ns)</sup>	9,8
<b>10</b>	541,1 AB	30,6	139,0 A	4,0	74,9	5,2
<b>20</b>	615,2 A	37,4	130,3 A	6,1	90,0	8,7
<b>40</b>	567,8 AB	36,8	133,0 A	5,1	76,0	17,1
<b>80</b>	427,2 B	20,4	130,0 A	7,3	96,4	11,0
<b>160</b>	447,8 B	27,3	142,2 A	6,5	90,9	9,5
<b>CV</b>	19,3		19,9		37,1	

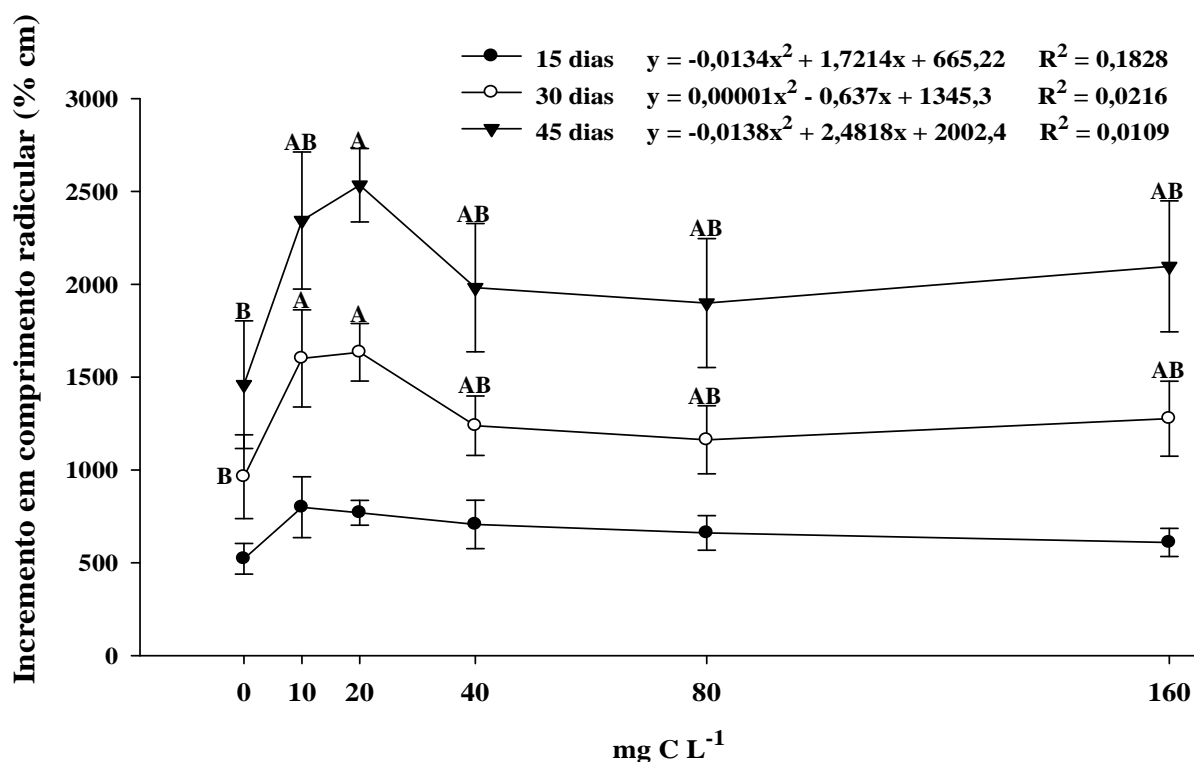
Letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**ns** se refere a análise estatística não significativa pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, entre os tratamentos no mesmo período de avaliação.

No primeiro período de avaliação (de 0 a 15 dias) as raízes tiveram um incremento médio em área radicular de 517,33 %. No período de 15 a 30 dias (segunda avaliação) como as raízes já apresentavam uma elevada taxa de desenvolvimento, aproximadamente cinco vezes ao seu tamanho inicial (montagem do experimento) e tendo apresentado influência dos tratamentos com AH aos quais foram submetidas, as raízes apresentaram um incremento médio de 124,63%, ou seja, pouco mais que dobraram de tamanho em um período correspondente à primeira avaliação (15 dias). Na terceira avaliação (de 30 a 45 dias), as raízes já apresentavam um incremento de quase 12 vezes ao tamanho inicial (Figura 8) tiveram o menor incremento médio proporcionado entre os três períodos de avaliação que foi de 82,22% (Tabela 6).

A alta taxa de desenvolvimento inicial pode ser uma estratégia dos vegetais em aumentar a área de exploração (absorção) do meio circundante para garantir reservas de nutrientes, principalmente daqueles considerados limitantes como o N e P. Esses resultados enfatizam a importância de se estudar os benefícios proporcionados ao desenvolvimento radicular *in vitro*, onde a solução nutritiva é o fator limitante, até os 30 dias, não sendo necessários períodos maiores de permanência das raízes em contato com a solução de ácido húmico.

Para a avaliação do desenvolvimento em comprimento radicular, também foi realizada uma análise para determinar o incremento radicular nos períodos avaliados, conforme descrito na avaliação do desenvolvimento em área radicular, calculado através da equação 3 são apresentados na Figura 9, com as equações das regressões quadráticas e os respectivos  $R^2$ .



**Figura 9.** Incremento no comprimento radicular (% cm) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) modificado, enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem ácido húmico) com as equações das regressões lineares e os respectivos R<sup>2</sup>. Barras verticais indicam os erros padrões. (n = 8). Letras iguais no mesmo período de avaliação não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os tratamentos com 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> apresentaram os maiores incrementos no comprimento radicular (% cm) em todas as avaliações (15, 30 e 45 dias), inversamente ao tratamento controle (sem ácido húmico) que apresentou o pior incremento em todos os períodos de avaliação. Estes resultados reforçam que concentrações com até 20 mg C L<sup>-1</sup> são as mais benéficas para o desenvolvimento das raízes e que a partir desta concentração os benefícios proporcionados pelo ácido húmico não são significativos, o que não justificaria a aplicação de grandes quantidades de AH sem um retorno na produtividade das culturas.

Na primeira avaliação (15 dias) não houve diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao incremento radicular. O tratamento controle (sem ácido húmico) foi estatisticamente inferior ao tratamento com 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> aos 30 dias (DAR), e apenas ao tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> aos 45 dias após a repicagem, mas não apresentando diferenças estatísticas os demais tratamentos. O tratamento controle (sem ácido húmico) apresentou os menores valores de incremento radicular o que confirma a bioatividade do AH e seus benefícios para o desenvolvimento radicular (Tabela 7).



**Tabela 7.** Incremento no comprimento radicular (% cm) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) modificado, enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem ácido húmico) com seus respectivos erros padrões. (n = 8).

Ácido húmico (mg C L <sup>-1</sup> )	Incremento no comprimento radicular (%)					
	0-15 dias		0-30 dias		0-45 dias	
	cm	erro padrão	cm	erro padrão	cm	erro padrão
<b>0</b>	521,4 <sup>(ns)</sup>	63,3	963,6 B	164,9	1459,2 B	325,6
<b>10</b>	799,3	91,2	1600,7A	189,8	2343,3AB	304,2
<b>20</b>	769,1	27,7	1633,7A	70,6	2533,5A	103,0
<b>40</b>	706,6	108,9	1238,4AB	126,0	1981,7AB	221,4
<b>80</b>	661,0	48,0	1162,5AB	93,8	1898,5AB	104,3
<b>160</b>	609,5	53,2	1276,1AB	92,0	2096,4AB	187,5
<b>CV</b>	29,55		27,11		31,04	

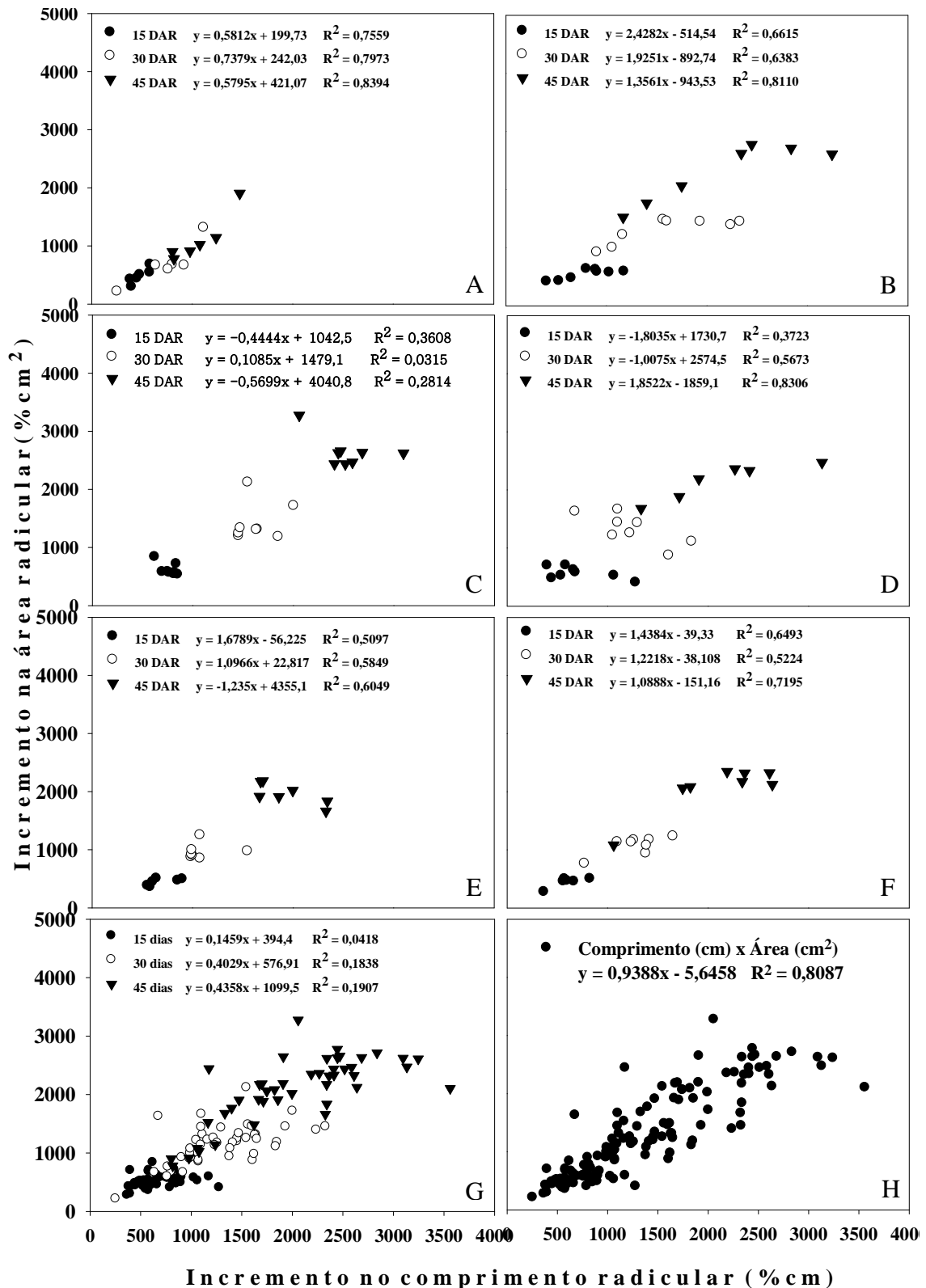
Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**ns** se refere a análise estatística não significativa pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, entre os tratamentos no mesmo período de avaliação

A correlação entre o incremento de comprimento e área radicular nos diferentes tratamentos com ácido húmico (10, 20, 40, 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup>) e controle (sem AH) entre os três períodos de avaliação (0-15, 0-30 e 0-45 dias) (Figura 10) foram determinadas as maiores correlações no tratamento controle (sem AH) (Figura 10 A) e os menores valores determinados no tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> (Figura 10 C).

As menores correlações determinadas no tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> pode ser em decorrência do maior estímulo no incremento de comprimento radicular em relação ao incremento de sua área radicular, que pode ser explicado pela grande indução de raízes laterais que ocupam menor área por cm de raiz quando comparado com as raízes mais velhas.

A correlação do incremento de comprimento e área radicular com todos os tratamentos de ácido húmico (10, 20, 40, 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup>) e controle (sem AH) nas avaliações de 0-15; 15-30 e 30-45 dias foram de 0,0418; 0,1838 e de 0,1907 respectivamente (Figura 10 G) e a correlação geral de todos os tratamentos e em todos os períodos de avaliação (0-15, 0-30 e 0-45 dias) foi de 0,8087 (Figura 10 H) que foi resultado de um maior incremento de comprimento em comparação à área radicular.



**Figura 10.** Correlação entre incremento do comprimento e área radicular das raízes transformadas de manjericão crescidas em meio mínimo (MM), submetidos as diferentes concentrações de ácido húmico, sendo: controle (sem AH) (A), 10 mg C L<sup>-1</sup> (B), 20 mg C L<sup>-1</sup> (C), 40 mg C L<sup>-1</sup> (D), 80 mg C L<sup>-1</sup> (E) e 160 mg C L<sup>-1</sup> (F) na montagem do experimento e aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR) isoladamente (A, B, C, D, E, F), a junção de todos os tratamentos dentro dos períodos de avaliação (G) e a junção de todas as correlações em todos os períodos de avaliação (H). (n = 8).

Os incrementos no comprimento radicular (% cm) proporcionados pela adição do AH ao meio de cultivo entre os períodos avaliados (0-15, 15-30 e 30-45 dias), em relação aos incrementos obtidos no tratamento controle (sem ácido húmico) calculados pela equação 3, o qual consideramos que representasse o desenvolvimento normal das raízes sendo aqui representado com o valor 100% em todos os períodos de avaliações na Tabela 8, com seus respectivos erros padrões.

**Tabela 8.** Incremento no comprimento radicular (% cm) em relação ao controle sem ácido húmico (100 %) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM), enriquecido com ácido húmico (10, 20, 40, 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem ácido húmico) com seus respectivos erros padrões. (n = 8).

Ácido húmico (mg C L <sup>-1</sup> )	Incremento no comprimento radicular (%)					
	0-15 dias		0-30 dias		0-45 dias	
	(%)	erro padrão	(%)	erro padrão	(%)	erro padrão
0	100,0 <sup>(ns)</sup>	12,1	100,0 B	15,0	100,0 B	22,3
10	153,3	19,7	166,1A	19,7	160,6AB	20,8
20	147,5	7,3	169,5A	7,3	173,6A	7,1
40	135,5	13,1	128,5AB	13,1	135,8AB	15,2
80	126,8	9,7	120,6AB	9,7	130,1AB	7,1
160	116,9	9,5	132,4AB	9,5	143,7AB	12,8
CV	29,6		27,1		31,0	

Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

ns se refere a análise estatística não significativa pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, entre os tratamentos no mesmo período de avaliação.

Não foi observada diferença significativa do incremento de comprimento radicular no período de zero a 15 dias para todos os tratamentos. Nas avaliações seguintes, o tratamento controle (sem AH) foi estatisticamente inferior apenas aos tratamentos com 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> aos 30 dias e apenas ao tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> aos 45 dias (Tabela 8) e não houve diferenças estatísticas entre os demais tratamentos.

Os incrementos no comprimento radicular (% cm) proporcionados pela adição do ácido húmico ao meio de cultivo entre os períodos avaliados (0-15, 15-30 e 30-45 dias), em relação aos incrementos obtidos no tratamento controle (sem AH) calculados pela equação 3, não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos nos períodos avaliados (Tabela 9).

No primeiro período de avaliação (de 0 a 15 dias) as raízes tiveram um incremento médio no comprimento radicular de 677,82 %. No período de 15 a 30 dias (segunda avaliação) como as raízes já apresentavam uma elevada taxa de desenvolvimento, aproximadamente sete vezes ao seu tamanho inicial (montagem do experimento) e tendo apresentado influência dos tratamentos as quais foram submetidas, as raízes apresentaram um incremento médio de 94,95%, ou seja, quase dobraram de tamanho no período correspondente à primeira avaliação (15 dias). Na terceira avaliação (de 30 a 45 dias), as raízes já apresentavam um incremento de quase 14 vezes ao tamanho inicial (Figura 8) tiveram o menor incremento médio proporcionado entre os três períodos de avaliação que foi de 55,68% (Tabela 9), o que reafirma a possibilidade de ser uma estratégia dos vegetais em aumentar a área de exploração (absorção) do meio circundante para garantir reservas de nutrientes para completar o seu ciclo.

**Tabela 9.** Incremento no comprimento radicular (% cm) entre os períodos de avaliação de 0 a 15, de 15 a 30 e de 30 a 45 dias após a repicagem das raízes transformadas de manjeriço crescidas em meio mínimo (MM) enriquecido com ácido húmico (10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem ácido húmico) com seus respectivos erros padrões. (n = 8).

Ácido húmico (mg C L <sup>-1</sup> )	Incremento no comprimento radicular entre os períodos avaliados					
	0-15 dias		15-30 dias		30-45 dias	
	cm	erro padrão	cm	erro padrão	cm	erro padrão
0	521,4 <sup>(ns)</sup>	63,3	83,7 <sup>(ns)</sup>	12,5	44,1 <sup>(ns)</sup>	8,4
10	799,3	91,2	100,9	6,2	44,7	3,4
20	769,1	27,7	113,1	8,0	56,0	5,9
40	706,6	108,9	84,8	12,5	60,9	8,7
80	661,0	48,0	75,6	3,9	65,7	5,8
160	609,5	53,2	111,8	7,2	62,7	5,8
CV	29,6		26,7		33,6	

Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**ns** se refere a análise estatística não significativa pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, entre os tratamentos no mesmo período de avaliação.

Todas as concentrações de ácido húmico estudadas proporcionaram maior crescimento radicular quando comparado ao tratamento controle (sem ácido húmico) em todos os períodos estudados (Figura 8, Tabela 7 e Tabela 8). Estes resultados reforçam os benefícios proporcionados pela adição de 20 mg C L<sup>-1</sup> ao meio de cultivo das raízes transformadas de manjeriço e que a partir desta concentração as raízes entram no que se poderia caracterizar como consumo de luxo (MARSCHNER, 1995). Estes resultados indicam que não seria necessário o uso de concentrações maiores de ácido húmico, devido ao benefício/custo da adição de matéria orgânica, visando à recuperação da fertilidade do solo e do desenvolvimento radicular o que resultaria numa maior eficiência dos vegetais em absorver nutrientes e água. Conseqüentemente, o aumento da superfície de contato dos vegetais com o solo facilita a interação com os organismos benéficos, por exemplo a formação da simbiose micorrízica, o que pode proporcionar maiores produtividades das culturas de interesse e em maior aproveitamento dos recursos empregados.

Os resultados indicam que a estimativa da área de cobertura (exploração) e do comprimento do sistema radicular foi suficiente para sugerir que existe bioatividade no ácido húmico, promovendo um crescimento radicular superior ao tratamento controle (sem AH) na medida em que se aumentou sua concentração no meio de cultivo das raízes transformadas.

A melhor época para avaliação dos benefícios da adição do ácido húmico ao meio de cultivo das raízes transformadas crescidas “*in vitro*”, quanto ao desenvolvimento radicular, foi aos 30 dias, devido ao seu maior incremento no período de 15 a 30 dias quando comparado ao incremento no período de 30 a 45 dias, uma vez que este incremento foram superiores, médias de 51,4% e 75,1 para área e comprimento, respectivamente, para todas as concentrações de ácido húmico estudadas em relação ao segundo período de avaliação. Esses resultados enfatizam a importância de se estudar os benefícios proporcionados ao desenvolvimento radicular aos 30 dias, não sendo necessários períodos maiores de permanência das raízes em contato com a solução de ácido húmico.

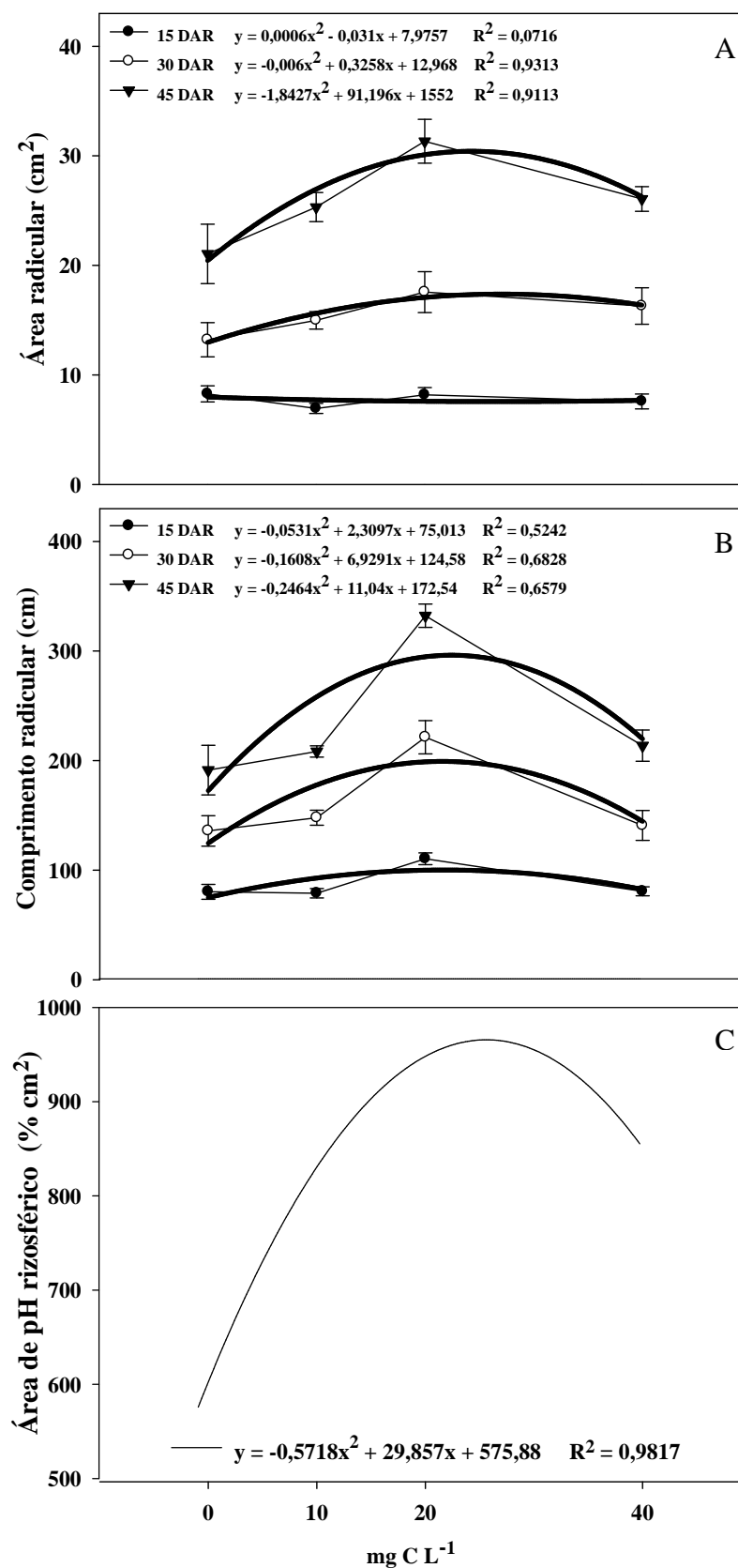
Com estes resultados, as coletas dos experimentos seguintes foram estabelecidas aos 30 dias após repicagem dos segmentos de raízes, corroborando os resultados encontrados por

LIMA et al. (2003) no qual, foram observadas que as concentrações de N do meio de cultura encontravam-se baixas nesta época, e por LIMA (2004) no qual os resultados encontrados no início da formação da simbiose micorrízica (raízes-FMAs) apresentaram-se como não benéficos para as raízes, sendo até este momento considerados como um dreno de nutrientes das raízes, e que aos 30 dias a simbiose já estaria formada e se caracteriza o início da resposta benéfica dos FMAs às raízes.

Diante dos resultados obtidos, foi observado que as concentrações de ácido húmico acima da concentração de 20 mg C L<sup>-1</sup> não proporcionaram estímulos ao desenvolvimento radicular. Para todas as análises realizadas a única exceção que apresentou diferenças estatísticas entre as concentrações de 40, 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup> foi no incremento em área radicular (Figura 8) na qual o tratamento com 40 mg C L<sup>-1</sup> foi superior ao tratamento com 80 mg C L<sup>-1</sup> e não sendo observadas diferenças entre os demais tratamentos (160 mg C L<sup>-1</sup>). Portanto, sugere-se que para a calibração da curva de resposta para ácidos húmicos sejam utilizadas concentrações até 40 mg C L<sup>-1</sup> (Figura 11) para a avaliação dos efeitos proporcionados no desenvolvimento das culturas de interesse.

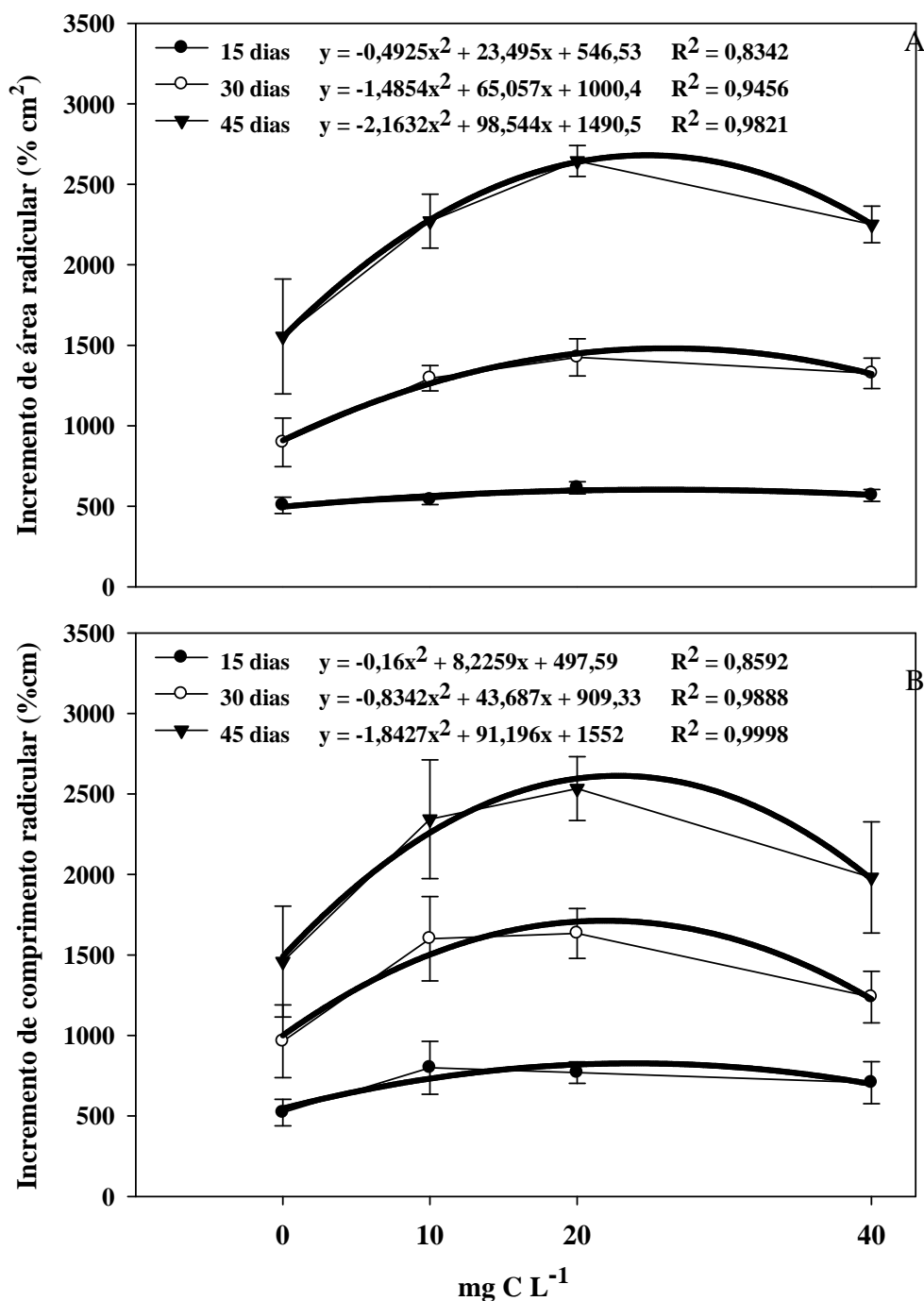
Empregando a equação da curva de calibração (Figura 11) para estimar a concentração de ácido húmico que melhor proporcionaria benefícios no crescimento de área (Figura 11 A) e comprimento radicular (Figura 11 B) e para a mudança do pH rizosférico (Figura 11 C) foi determinado que a concentração de 26 mg C L<sup>-1</sup> aos 15 e 30 dias e 25 mg C L<sup>-1</sup> aos 45 dias foram as melhores para a indução do crescimento (área radicular). No comprimento radicular as concentrações de ácido húmico mais responsivas foram 24, 22 e 23 mg C L<sup>-1</sup> aos 15, 30 e 45 dias, respectivamente. Para o pH rizosférico, determinado apenas aos 30 dias, a melhor concentração de AH estimada pela equação da curva de calibração (Figura 11 C) foi determinada que a concentração de 26 mg C L<sup>-1</sup> foi a que melhor proporcionou mudanças na área de atuação do pH rizosférico.

As equações das regressões quadráticas das curvas de respostas de ácido húmico com os respectivos R<sup>2</sup> (Figura 11) foram determinadas e aos 30 dias houve a maior significância entre as equações, tanto para o crescimento de área (Figura 11 A) como para comprimento (Figura 11 B), respaldando as sugestões para que as análises sejam realizadas aos 30 dias após a adição de ácido húmico na solução de cultivo.



**Figura 11.** Calibração da curva de resposta de ácido húmico para avaliar o crescimento radicular e área (A) e comprimento (B) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR) com as respectivas equações quadráticas e seus  $R^2$  e a curva de regressão da área de modificação do pH rizosférico (C) com respectivo  $R^2$  aos 30 dias após a repicagem (DAR), para a faixa de ácido húmico sugerida (10, 20, 40 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH).

Para estimar a concentração de ácido húmico que melhor proporcionou benefícios no incremento radicular (% em área e comprimento) foi empregada a equação da curva de calibração para calcular o incremento de área (Figura 12 A) e do comprimento radicular (Figura 12 B). Os valores estimados para as concentrações de ácido húmico que melhor proporcionaram incrementos de área e de comprimento radicular nas diferentes épocas de avaliação (15, 30 e 45 dias) também foram as mesmas concentrações de ácido húmico que melhor proporcionaram indução no crescimento de área e comprimento radicular. Estes resultados reforçam a confiabilidade nos valores encontrados na calibração da curva de resposta para os ácidos húmicos.



**Figura 12.** Calibração da curva de resposta de ácido húmico para avaliar o incremento radicular em área (A) e comprimento (B) aos 15, 30 e 45 dias após a repicagem (DAR) com as respectivas equações quadráticas e seus R<sup>2</sup>, para a faixa de ácido húmico sugerida (10, 20, 40 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH).

#### 4. CONCLUSÕES

O estudo do crescimento radicular em termos quantitativos, em área e comprimento, utilizando-se imagens digitais mostrou-se eficaz para o objetivo do trabalho que foi determinar o efeito do AH no desenvolvimento das raízes transformadas de manjeriço “*in vitro*”.

Através da curva de calibração foi estimado que as concentrações que melhor influenciaram o desenvolvimento em área e comprimento radicular (crescimento e incremento) estão em torno de 25 mg C L<sup>-1</sup>.

Todas as concentrações de ácido húmico estudadas apresentaram maior crescimento radicular quando comparado com o tratamento controle (sem ácido húmico) em todos os períodos estudados.

A melhor época para avaliação dos benefícios da adição do ácido húmico ao meio de cultivo das raízes transformadas crescidas “*in vitro*”, quanto ao desenvolvimento radicular, foi aos 30 dias, devido ao seu maior incremento no período de 15 a 30 dias quando comparado ao incremento no período de 30 a 45 dias, uma vez que este incremento foram superiores, médias de 51,4% e 75,1 para área e comprimento respectivamente, para todas as concentrações de ácido húmico estudadas em relação ao segundo período de avaliação.

A concentração de 20 mg de C L<sup>-1</sup>, presente no ácido húmico, foi a que melhor apresentou resultados no desenvolvimento das raízes, área e comprimento, em todos os períodos estudados (15, 30 e 45 dias após a repicagem), sendo aos 30 dias foi observados os melhores resultados.

Concentrações superiores a 40 mg C L<sup>-1</sup> na solução de cultivo não proporcionaram indução no desenvolvimento radicular, curva de resposta, sendo não significativo (benefício/custo) a aplicação de grandes concentrações nos sistemas de produção.



## **CAPÍTULO III**

### **INFLUÊNCIA DO ÁCIDO HÚMICO NA ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO E TREVO**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de ácido húmico (AH) proveniente de vermicomposto, sendo controle (sem AH); 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 mg C L<sup>-1</sup>, na atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase) e no metabolismo de nitrogênio em raízes transformadas de manjeriço e trevo aos 6 e 9 dias após a montagem do experimento. Os tratamentos contendo AH nas concentrações de 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> apresentaram uma baixa indução na atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases e os tratamentos com 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup> apresentaram uma pequena inibição em relação ao tratamento controle (sem AH) nas duas épocas de avaliação sendo superiores na primeira avaliação nas duas raízes estudadas. Foram determinadas uma baixa atividade das V-H<sup>+</sup>-ATPases e das H<sup>+</sup>-PPases o que pode ser em decorrência do bom estado nutricional, quanto aos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, encontradas nas raízes. Os teores das frações solúveis e atividades da NR e GS foram mais expressivos na avaliação aos 6 dias após a montagem do experimento, o que pode ser em decorrência a um maior estímulo proporcionado inicialmente pelo ácido húmico, exceto na avaliação do N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, conseqüentemente, estes maiores teores podem ser em decorrência de uma maior absorção inicial resultando em um maior acúmulo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nos vacúolos. O tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> apresentou indução na atividade da GS em todas as avaliações e em ambas as raízes. Estes resultados sugerem que as raízes de manjeriço, por apresentarem uma atividade maior e mais homogênea entre os períodos de avaliação, podem apresentar um desenvolvimento superior às raízes de trevo. As duas raízes estudadas utilizaram diferentemente a energia disponível, teor de açúcar solúvel, na redução do N. Os teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> apresentaram comportamento similar com aos teores de açúcares solúveis, aos teores de N amino livre e à atividade da glutamina sintetase, sendo superiores nos tratamento com 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> nas duas avaliações. O AH influenciou, positivamente, na atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPases, V-H<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>-PPases) e no metabolismo do nitrogênio avaliadas pelas frações solúveis (teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-amino livre, açúcares solúveis e nas atividades da NR e da GS) nas raízes de manjeriço e trevo estudadas. As raízes de manjeriço e trevo apresentaram metabolismos distintos, e que foram influenciados pelos tratamentos com AH.

**Palavras chave:** Bioatividade. Metabolismo primário. Matéria orgânica.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of the addition of different concentrations of humic acid (HA) from vermicompost, with control (without AH); 10.0; 20.0; 40.0; 80.0 and 160.0 mg C L<sup>-1</sup>, in the activity of the protons pump (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase) and in the metabolism of nitrogen in transformed roots of basil and clover after 6 and 9 days of growth. The treatments containing HA in the concentrations of 10 and 20 mg C L<sup>-1</sup> presented a low induction in P-H<sup>+</sup>-ATPases activity and the treatments with 80 and 160 mg C L<sup>-1</sup> presented a small inhibition in relation to the controls (without AH) in the two evaluation times being higher in the first evaluation. There were a low activity of V-H<sup>+</sup>-ATPases and H<sup>+</sup>-PPases which can be due to the good nutritional state, with relationship to the levels of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, found in the roots. The levels of the soluble fractions and activities of NR and GS were more expressive after 6 days of growth after the assembly of the experiment, which can be a consequence of a larger incentive provided initially by the HA, except in the evaluation of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Consequently, these larger levels can be due to a larger initial absorption resulting in a larger accumulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the vacuoles. The treatment with 20 mg C L<sup>-1</sup> had induced GS activity in all the evaluations and in both roots. These results suggest that the basil roots present a larger and more homogeneous activity among the evaluation periods, and can present a high development in relation to the clover roots. The two studied roots use the available energy differently. Levels of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> presented similar behavior in relation to soluble sugars, N free amino and the activity of the GS, being high in the treatment with 10 and 20 mg C L<sup>-1</sup> in the two evaluations. The HA influenced, positively, in the activity of the protons pump (P-H<sup>+</sup>-ATPases, V-H<sup>+</sup>-ATPases and H<sup>+</sup>-PPases) and in the metabolism of the nitrogen evaluated by the soluble fractions (tenors of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, free N-amino, soluble sugars and in NR and GS activities) in the basil and clover roots studied. The basil roots and clover presented different metabolisms, and that were influenced by the treatments with HA.

**Key words:** Bioactivity. Primary metabolic. Organic matter.

## 1. INTRODUÇÃO

A rápida degradação do solo sob exploração agrícola no mundo, especialmente nos países tropicais em desenvolvimento despertou, nas últimas décadas, a preocupação com a qualidade de solo e a sustentabilidade da exploração agrícola. A perturbação antrópica no sistema solo-planta causa impactos que, normalmente, provocam mais perdas do que ganhos nos atributos de qualidade do sistema (físicos, químicos e biológicos) e um dos mais afetados são os teores de matéria orgânica do solo (DORAN, 1997). A matéria orgânica tem grande importância como fonte de nutrientes para as culturas, retenção de cátions, complexação de elementos tóxicos e de micronutrientes, estabilidade de agregados, infiltração e retenção de água, aeração e como fonte de C e energia para os microrganismos heterotróficos do solo, constituindo um componente fundamental do potencial produtivo dos solos (SANTOS et al., 2008; BÜNEMANN et al., 2004; TAN, 2003; SANTOS & CAMARGO, 1999; BACA et al., 1995).

A matéria orgânica do solo apresenta-se como um sistema complexo de substâncias, cuja dinâmica é governada pela adição de resíduos orgânicos (animal e/ou vegetal) até sua transformação em compostos mais estáveis, as substâncias húmicas (SH), que são importantes componentes do solo (SANTOS et al., 2008; TAN, 2003; SANTOS & CAMARGO, 1999; STEVENSON & COLE, 1999; STEVENSON, 1994), capazes de armazenar nutrientes para as plantas por uma série de processos de interação (DONISA et al., 2003; LOGAN et al., 1997), contribui com a mobilização e o transporte de micronutrientes para as raízes das plantas (LINEHAN & SHEPHERD, 1979).

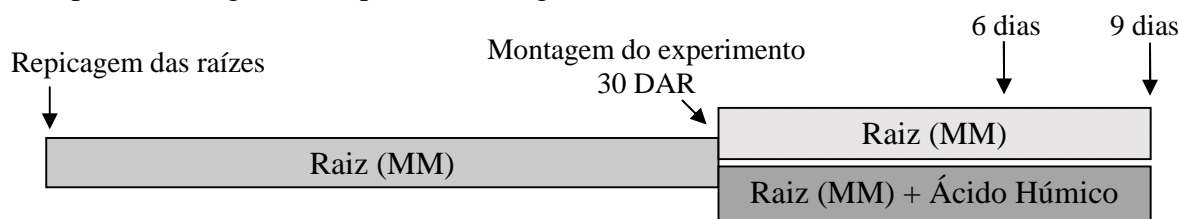
Os efeitos das substâncias húmicas nas raízes, quanto à absorção de íons, não são facilmente explicáveis, devido à complexidade e natureza química destas substâncias (SANTOS et al., 2008; NARDI et al., 2007; TAN, 2003; STEVENSON & COLE, 1999). Além disso, os efeitos descritos na literatura são de difíceis comparações, isto porque utilizaram substâncias húmicas com características diferentes (devido à origem do solo e dos métodos de extração e purificação), entretanto, é possível que as substâncias húmicas possam apresentar efeitos diferentes em função do tipo de planta e que algumas destas podem resultar, diretamente ou indiretamente, em uma modulação na absorção de íons (VAUGHAN et al., 1985) e a primeira evidência está no aumento da extrusão de prótons pela maior atividade das bombas de prótons e, conseqüentemente, aumentando a absorção de  $\text{NO}_3^-$  (NARDI et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007; RODDA et al., 2006 a,b; CANELLAS & SANTOS, 2005; NARDI et al., 2002; PINTON et al., 1999; NARDI et al., 1991). A maior eficiência de aquisição de  $\text{NO}_3^-$ , a partir de baixas concentrações na solução externa pode propiciar um maior estoque de N disponível para o metabolismo das plantas nas fases posteriores de seu ciclo de vida.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de ácido húmico (AH) proveniente de vermicomposto, sendo controle (sem AH); 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0  $\text{mg C L}^{-1}$ , na atividade das bombas de prótons e no metabolismo de nitrogênio em raízes transformadas de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.) e trevo branco (*Trifolium repens* L.) aos 6 e 9 dias após a montagem do experimento.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi avaliada a influência de diferentes concentrações de carbono elementar (presentes no ácido húmico) na atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase) e no metabolismo de nitrogênio (N) em raízes transformadas (RTs) de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) (NICOMEDES JUNIOR, 2003) e trevo (*Trifolium repens* L.) (BERBARA, 1995). Foram repicados, separadamente, dois segmentos de raízes com cinco centímetros (cm) de comprimento cada, crescidas em meio mínimo (BÉCARD & FORTIN, 1988) líquido e com pH ajustado para 5,8 e mantidas em erlenmeyers (capacidade de 250 mL) com 100 mL de solução, por um período de 30 dias para a padronização das raízes. Os erlenmeyers foram acondicionados em agitadores horizontais, com movimento orbital a 90 rpm, em temperatura ambiente de 26 °C e na ausência da luz.

Trinta dias após a repicagem (DAR) (montagem do experimento) a solução de cultivo (MM) foi substituída por uma nova solução contendo as concentrações de carbono, sendo: 10, 20, 40, 80, 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle (sem AH) e as avaliações realizadas aos seis e aos nove dias após a montagem do experimento (Figura 13).



**Figura 13.** Esquema do experimento realizado para avaliação dos efeitos proporcionados pela adição de ácido húmico (AH) (10; 20; 40; 80; 160 mg CL<sup>-1</sup> e controle sem AH) à solução de cultivo 30 dias após a repicagem (DAR) das raízes transformadas de manjeriço e trevo. As análises foram realizadas aos 6 e 9 dias após a montagem do experimento. (MM= meio mínimo)

O ácido húmico utilizado foi proveniente de uma rápida vermicompostagem, 70 dias, utilizando minhocas *Eisenia foetida*. Foi extraído conforme procedimento adotado pela sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS) descrito por SWIFT (1996) com adaptações de BENITES et al. (2003) e caracterizado quimicamente (DICK et al., 1999) e por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) (TAN, 1995; STEVENSON, 1994; STEVENSON & GOH, 1971). Os teores de C, H, N e O do ácido húmico foram de  $47,0 \pm 0,1$ ;  $4,87 \pm 0,01$ ;  $3,02 \pm 0,03$  e  $45,1 \pm 0,03$  respectivamente, juntamente com as relações atômicas C/N, O/C, H/C que foram de  $15,6 \pm 0,1$ ;  $0,96 \pm 0,02$ ;  $0,104 \pm 0,005$ , respectivamente, caracterizando um material estável porém, pouco humificado ( $E_4/E_6$ ), devido ao rápido processo de transformação, com caráter mais aromático e no estado reduzido ( $\omega$ ) (descrito no Capítulo I).

O experimento foi montado em esquema fatorial 2x6x2, sendo duas espécies de raízes transformadas (manjeriço e trevo), seis concentrações de ácido húmico (10, 20, 40, 80, 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) e duas épocas de avaliação (6 e 9 dias após a adição de ácido húmico) em três repetições.

Foram avaliados: a atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase) (YANG et al., 2002, com modificações de SANTOS, 2006), a atividade da Nitrato Redutase (JAWORSKI, 1971) e da Glutamina Sintetase (FARDEN & ROBERTSON, 1980) com modificações de SOUZA et al. (2007), as frações solúveis (FERNANDES, 1983) N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

(CATALDO et al., 1975), N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (FELKER, 1977), açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957) e N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955) (Anexo 1).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 1998) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

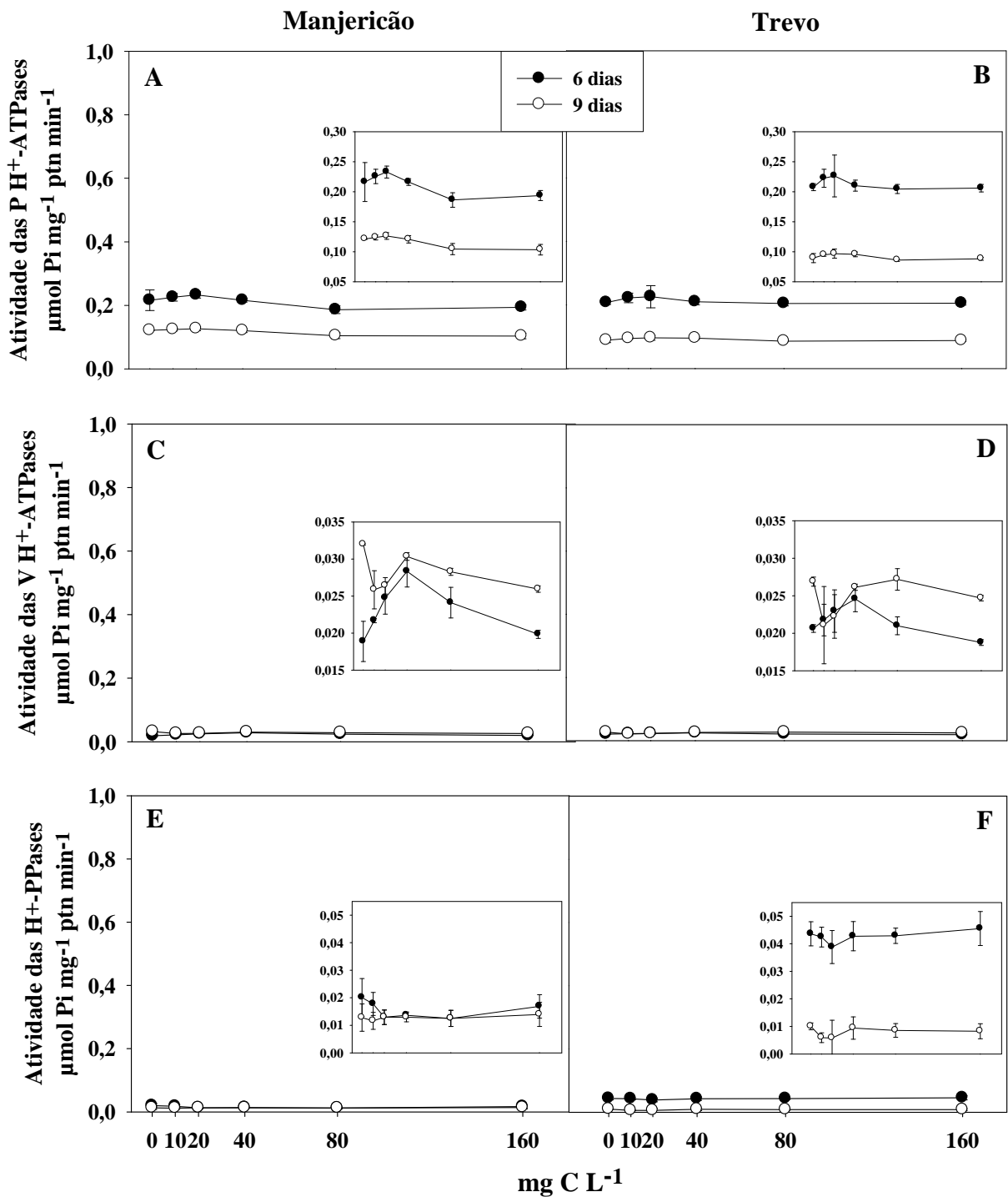
O crescimento de células e tecidos vegetais *in vitro* é dependente dos nutrientes e de outras substâncias essenciais, por exemplo, aminoácidos, contidas nos meios de cultivo para o seu desenvolvimento. Para a determinação da fórmula de um meio de cultivo foi necessário, anteriormente, levantamentos das exigências nutricionais dos vegetais, o que são melhoradas a cada dia decorrente ao maior número de informações a respeito deste assunto, para atender suas necessidades sem prejudicar seu desenvolvimento. BÉCARD & FORTIN (1988) salientaram a necessidade do uso de uma fonte externa de carbono no meio de cultura de raízes transformadas não fotossintetizantes para a manutenção de seu metabolismo, optando pela introdução de sacarose para atender esta exigência. Neste experimento, além da sacarose, foi utilizada outra fonte de carbono, presente no AH, para avaliação dos efeitos proporcionados no metabolismo de nitrogênio em raízes transformadas de manjeriço e trevo.

Os tratamentos contendo ácidos húmicos (AH) nas concentrações de 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> não apresentaram indução na atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases e os tratamentos com 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup> apresentaram inibição em relação ao tratamento controle (sem AH) nas duas épocas de avaliação (6 e 9 dias), mas não foram estatisticamente significativas (Tukey, p≤0,05) (Figura 14 A e B). A atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases foram significativamente superiores na primeira avaliação (6 dias) para todas os tratamentos quando comparados com as atividades determinadas na segunda avaliação (9 dias) nas duas raízes estudadas.

Para a atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases (μmol Pi mg<sup>-1</sup> proteína min<sup>-1</sup>) entre as duas raízes submetidas aos mesmos tratamentos, foram observadas diferenças estatísticas apenas no tratamento com 40 mg C L<sup>-1</sup> na primeira avaliação (6 dias) sendo superior nas raízes de trevo. Na segunda avaliação (9 dias) as atividades das P-H<sup>+</sup>-ATPases foram superiores nas raízes de manjeriço em todos os tratamentos quando comparado com as atividades encontradas nas raízes de trevo sob os mesmos tratamentos. Estes resultados podem ser devido a compostos presentes no AH, com efeito hormonal semelhante à auxina, que estimularam a atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases em poucos dias de contato com a solução e que o efeito estimulatório das substâncias húmicas de baixo peso molecular na absorção íons da solução requer maiores períodos de incubação devido a uma indução tardia (NARDI et al., 2002; FAÇANHA et al., 2002).

Ensaio *in vivo*, com plântulas de milho tratadas com substâncias húmicas solúveis em água, isoladas de turfas, mostraram estímulo da atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase (PINTON et al., 1999). Por outro lado, NARDI et al. (2000) observaram inibição da P-H<sup>+</sup>-ATPase, obtida de microsomas de raízes de milho tratada com substâncias húmicas de baixo peso molecular extraídas de um solo de clima temperado. Tal discrepância foi relacionada às diferenças encontradas nas concentrações e na natureza química das substâncias húmicas testadas. Devido às diferentes condições de formação a sua estrutura não tem forma definida podendo variar com a forma e tempo de sua síntese.

Houve baixa atividade das V-H<sup>+</sup>-ATPases (μmol Pi mg<sup>-1</sup> proteína min<sup>-1</sup>) nas raízes de manjeriço e trevo (Figura 14 C e D) o que pode ser em decorrência do bom estado nutricional quanto aos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> encontradas nessas raízes (Figura 15 A e B) e que estas raízes devem estar acumulando N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nos vacúolos celulares. Na primeira avaliação (6 dias) foi encontrada uma atividade das V-H<sup>+</sup>-ATPases semelhante ao comportamento da atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases, mas em escala inferior, o que pode ser em decorrência de um maior estímulo no seu desenvolvimento inicial. Na segunda avaliação (9 dias) foi determinada uma atividade das V-H<sup>+</sup>-ATPases inversa à atividade encontrada nas P-H<sup>+</sup>-ATPases, mas também em escala inferior.



**Figura 14.** Atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases (A e B), das V-H<sup>+</sup>-ATPases (C e D) e das H<sup>+</sup>-PPases (E e F) ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos 6 e 9 dias após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20; 40; 80; 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Detalhes nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ .

A atividade das V-H<sup>+</sup>-ATPases nas raízes de manjeriço nos tratamentos controle (sem AH), 10, 80 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  na segunda avaliação (9 dias) foram significativamente superiores aos mesmos tratamentos na primeira avaliação (6 dias), e não significativos para os demais (20 e 40  $\text{mg C L}^{-1}$ ) entre as duas épocas de avaliação. Nas raízes de trevo a atividade



das V-H<sup>+</sup>-ATPases nos tratamentos controle (sem AH), 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup> na segunda avaliação (9 dias) foram estatisticamente superiores aos mesmos tratamentos na primeira avaliação (6 dias), não sendo significativos para os demais (10, 20 e 40 mg C L<sup>-1</sup>). Esta diferença na atividade das V-H<sup>+</sup>-ATPases pode ser uma estratégia usada pelos vegetais a fim de controlar as cargas no interior do vacúolo, que tendem a ficar mais eletrogênicos com a entrada de grandes quantidades de nitrato (Figura 15 A e B) que ocorre através de um canal ou por um transportador em antiporte 1 H<sup>+</sup>/2 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (ANGELI et al., 2006). Este controle de cargas se dá através do bombeamento de H<sup>+</sup> para o interior dos vacúolos que energiza antiportes com Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>/2H<sup>+</sup> (RATAJCZAK, 2000).

A atividade das V-H<sup>+</sup>-ATPases entre as duas raízes submetidas aos mesmos tratamentos, não apresentaram diferenças estatísticas na primeira avaliação (6 dias). Na segunda avaliação (9 dias) a atividade das V-H<sup>+</sup>-ATPases foram superiores nas raízes de manjeriço nos tratamentos controle (sem AH), 40 e 160 mg C L<sup>-1</sup> quando comparado com as atividades encontradas nas raízes de trevo sob os mesmos tratamentos. Nos demais tratamentos (10, 20 e 80 mg C L<sup>-1</sup>) não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas raízes (Figura 14 C e D).

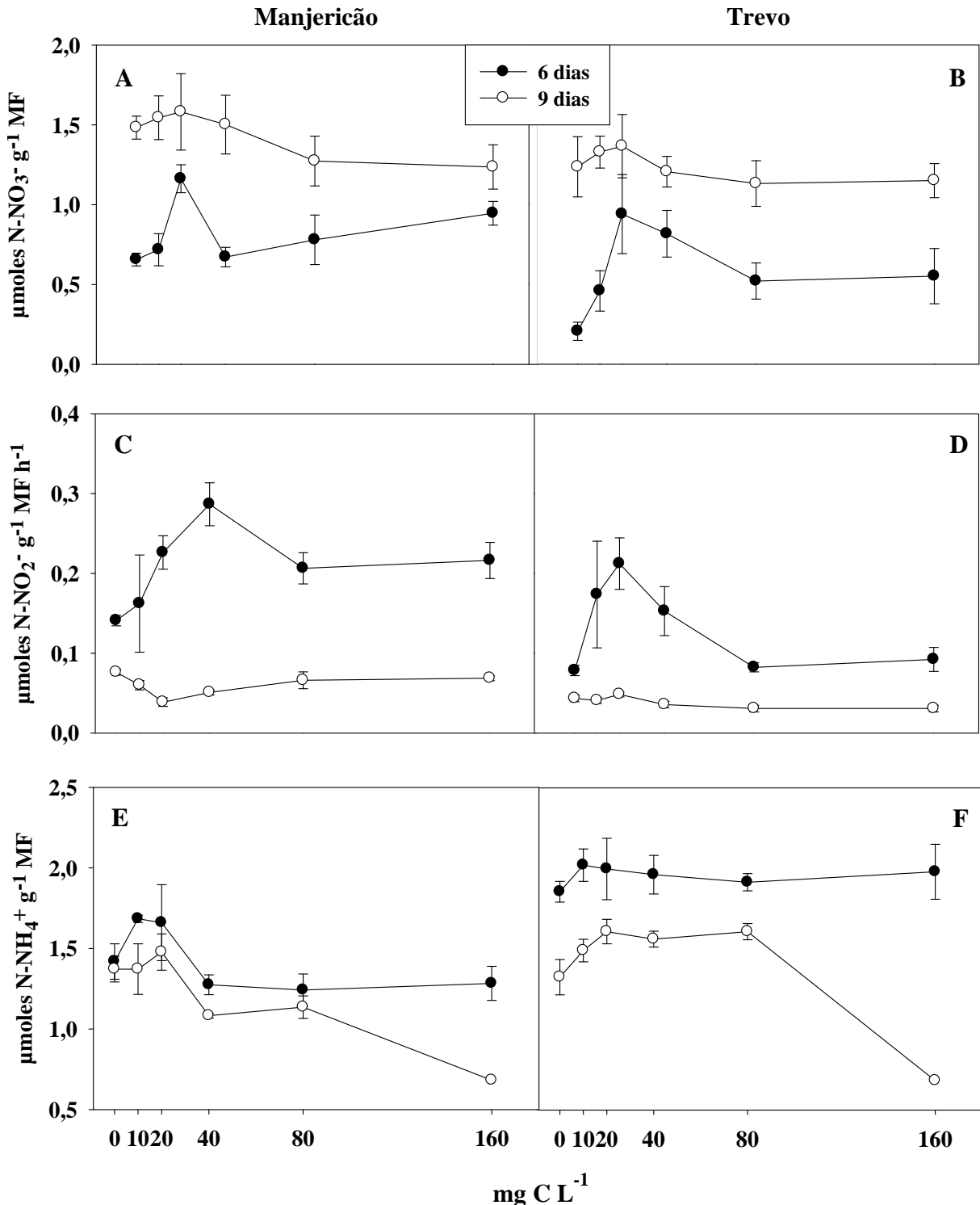
Houve baixa atividade das H<sup>+</sup>-PPases (μmol Pi mg<sup>-1</sup> proteína min<sup>-1</sup>) nas raízes de manjeriço e trevo e nos dois períodos de avaliação (Figura 14 E e F), sendo que nas raízes de manjeriço foram determinadas uma atividade quase homogênea nas duas épocas de avaliação e entre os diferentes tratamentos com AH, e não sendo estatisticamente significativo. Nas raízes de trevo foram observados uma atividade superior das H<sup>+</sup>-PPases na primeira avaliação (6 dias) em relação a segunda avaliação (9 dias). Como as H<sup>+</sup>-PPases são frequentemente denominadas como bombas de prótons auxiliares as V-H<sup>+</sup>-ATPases quando o suprimento energético das células está baixo, os resultados obtidos confirmam esta hipótese nas raízes de trevo quando comparados com os teores de açúcares solúveis no interior das células (Figura 16 B).

A atividade das H<sup>+</sup>-PPases nas raízes de trevo foram superiores às de manjeriço em todos os tratamentos na primeira avaliação (6 dias). Na segunda avaliação (9 dias) a atividade das H<sup>+</sup>-PPases foram superiores nas raízes de manjeriço apenas nos tratamentos com 10 mg C L<sup>-1</sup> quando comparado com as atividades encontradas nas raízes de trevo nos mesmos tratamentos (Figura 14 E e F).

Os teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (μmoles N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca) nas raízes de manjeriço e trevo (Figura 15 A e B) apresentaram similaridade de comportamento com a atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases (Figura 14 A e B) entre os tratamentos nos dois períodos avaliados (6 e 9 dias). Os teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram maiores na segunda avaliação (9 dias) nas duas raízes estudadas, mas os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> encontrados nas raízes na segunda avaliação não resultou em uma maior indução na atividade da enzima nitrato redutase sugerindo que as raízes estejam acumulando nitrato nos vacúolos para posterior remobilização e uso (Figura 15 C e D) e também não influenciou nos teores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figura 15 E e F).

Nas raízes de manjeriço o tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> do AH foi o que proporcionou os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na primeira avaliação (6 dias) seguidos pelo tratamento com 160 mg C L<sup>-1</sup> que foram estatisticamente superiores aos tratamentos controle (sem AH), 10 e 40 mg C L<sup>-1</sup>. Na segunda avaliação (9 dias) não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Nas raízes de trevo foram observados um comportamento similar as raízes de manjeriço nos dois períodos avaliados. Na primeira avaliação, os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram observados nos tratamentos com 20 mg C L<sup>-1</sup> mas não diferiu estatisticamente apenas ao tratamento com 40 mg C L<sup>-1</sup>, e todos os tratamentos com AH foram estatisticamente superiores ao tratamento controle (sem AH). Na segunda avaliação não foram determinadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tukey, p≤0,05).

Em ambas as raízes aos 6 dias houve maior atividade da nitrato redutase (NR), conseqüentemente menos  $\text{N-NO}_3^-$  e mais  $\text{N-NH}_4^+$ , em comparação com as avaliações aos 9 dias, onde ocorreu o contrário (Figura 15).



**Figura 15.** Teores de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\mu\text{moles de N-NO}_3^- \text{ g}^{-1}$  de massa fresca) (A e B); atividade da nitrato redutase ( $\mu\text{moles N-NO}_2^- \text{ g}^{-1}$  massa fresca  $\text{h}^{-1}$ ) (C e D) e teores de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\mu\text{moles N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$  massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos 6 e 9 dias após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20; 40; 80; 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 3.

Nos teores de  $\text{N-NO}_3^-$  entre as duas raízes submetidas aos mesmos tratamentos, foram determinados os maiores teores para os tratamentos controle, 10 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  nas raízes de manjeriço e para o tratamento com 40  $\text{mg C L}^{-1}$  nas raízes de trevo na primeira avaliação. Na segunda avaliação (9 dias) não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas raízes submetidas ao mesmo tratamento, que pode ser devido ao alto teor de  $\text{N-NO}_3^-$  acumulado por ambas as raízes.

A atividade da nitrato redutase ( $\mu\text{moles N-NO}_2^- \text{ g}^{-1}$  massa fresca  $\text{h}^{-1}$ ) nas raízes de manjeriço e trevo (Figura 15 C e D) apresentaram comportamento similar às concentrações de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes na primeira avaliação (6 dias) apresentando acréscimo em sua atividade até a concentração de 40  $\text{mg C L}^{-1}$  e uma pequena queda nas maiores concentrações (80 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$ ) nas raízes de manjeriço. Nas raízes de trevo o acréscimo na atividade foram observadas até a concentração de 20  $\text{mg C L}^{-1}$ . Na segunda avaliação foram determinados os menores valores em sua atividade, nas duas raízes, o que pode ser em função do  $\text{NO}_3^-$  estar acúmulo nos vacúolos e não estarem circulando no citossol.

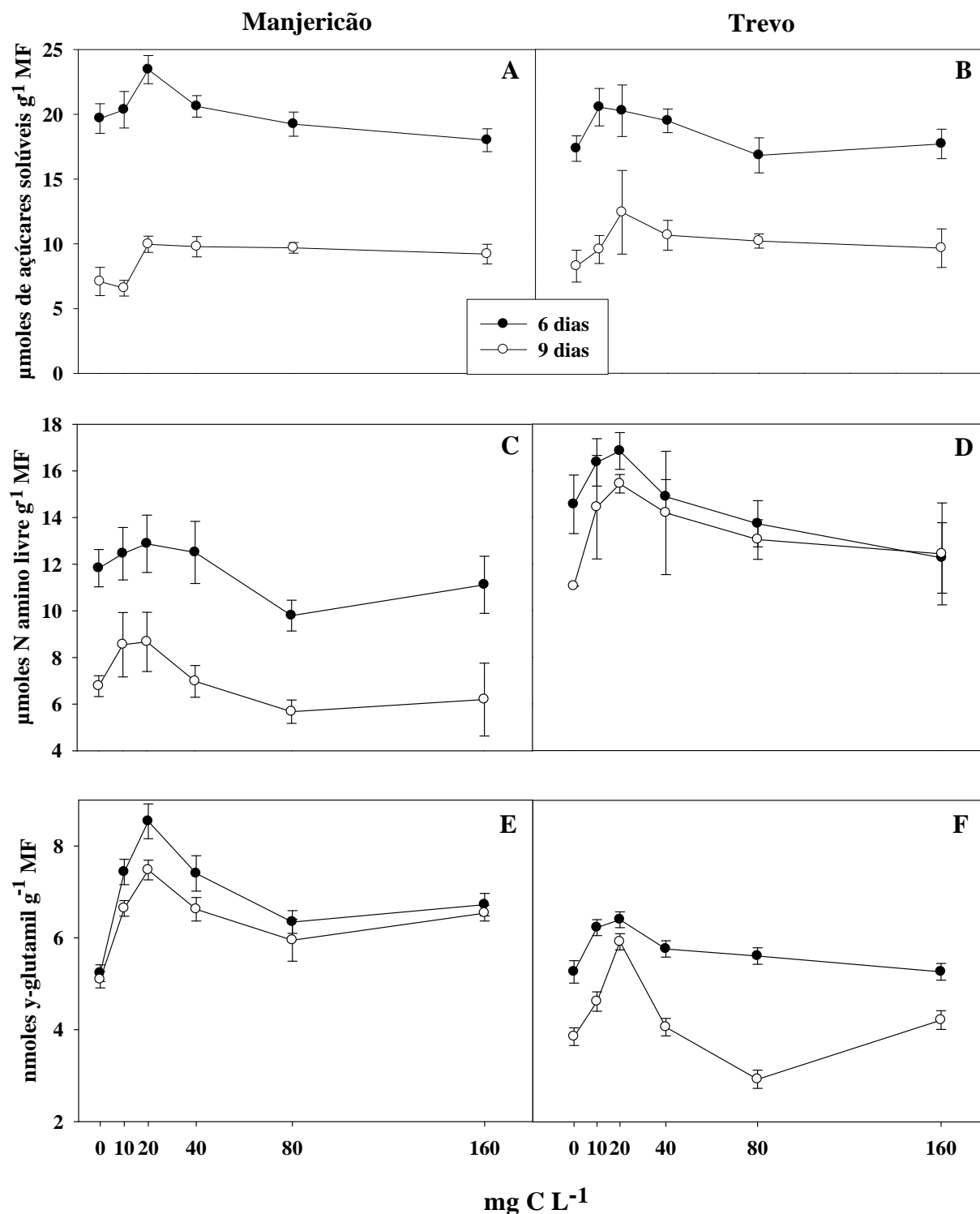
Na atividade da nitrato redutase nas duas raízes submetidas aos mesmos tratamentos, foram determinados os maiores teores nos tratamentos controle, 40, 80 e 160  $\text{mg C L}^{-1}$  nas raízes de manjeriço na primeira avaliação. Na segunda avaliação (9 dias) os tratamentos controle, 10, 80 e 160 nas raízes de manjeriço também foram estatisticamente superiores as raízes de trevo submetidas ao mesmo tratamento com ácido húmico, os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas.

Os teores de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\mu\text{moles N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$  massa fresca) apresentaram comportamento similar com aos teores de açúcares solúveis (Figura 16 A e B), aos teores de N amino livre (Figura 16 C e D) e à atividade da glutamina sintetase (Figura 16 E e F). Nas raízes de manjeriço o tratamento com 10  $\text{mg C L}^{-1}$  foi o que proporcionou os maiores teores de  $\text{N-NH}_4^+$  na primeira avaliação (6 dias), mas não diferindo significativamente apenas do tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$ . Na segunda avaliação (9 dias) os maiores teores foram determinados nos tratamentos controle e com 10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$ , e os menores teores no tratamento com 160  $\text{mg C L}^{-1}$ . Nas raízes de trevo foi observado um comportamento similar as raízes de manjeriço nos dois períodos de avaliação. Na primeira avaliação os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas para os teores de  $\text{N-NH}_4^+$ . Na segunda avaliação, os maiores teores de  $\text{N-NH}_4^+$  foram determinados nos tratamentos com 20, 40 e 80  $\text{mg C L}^{-1}$  mas não diferiram significativamente do tratamento com 10  $\text{mg C L}^{-1}$  e os menores teores foram determinados no tratamento com 160  $\text{mg C L}^{-1}$ .

Os teores de  $\text{N-NH}_4^+$  nas duas raízes submetidas aos mesmos tratamentos, foram determinados os maiores teores nas raízes de trevo para todos os tratamentos, exceto para o tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  na primeira avaliação (6 dias). Na segunda avaliação (9 dias) apenas os tratamentos com 40 e 80  $\text{mg C L}^{-1}$  nas raízes de trevo apresentaram diferença estatísticas comparadas com as raízes de manjeriço submetidas ao mesmo tratamento.

Nos teores de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles de açúcares solúveis g}^{-1}$  massa fresca) foram determinados os maiores teores na primeira avaliação (6 dias) quando comparados com os teores determinados na segunda avaliação (9 dias) em ambas as raízes estudadas (Figura 16 A e B). Nas raízes de manjeriço, na primeira avaliação, os maiores teores foram determinados no tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$ . Apenas o tratamento com 160  $\text{mg C L}^{-1}$  apresentou teores significativamente inferiores ao tratamento com 40  $\text{mg C L}^{-1}$  e não apresentou diferenças para os demais. Na avaliação aos 9 dias, apenas os tratamentos controle (sem AH) e o com 10  $\text{mg C L}^{-1}$  apresentaram teores de açúcares solúveis inferiores aos demais tratamentos. Nas raízes de trevo, na primeira avaliação, os maiores teores de açúcares solúveis foram determinados nos tratamento com 10, 20 e 40  $\text{mg C L}^{-1}$ , mas os demais tratamentos (80, 160  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle) não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento com 10  $\text{mg C L}^{-1}$ . Na avaliação aos 9 dias,

apenas o tratamento com 80 mg C L<sup>-1</sup> foi superior ao tratamento controle (sem AH), os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas.



**Figura 16.** Teores de açúcares solúveis (μmoles de açúcares solúveis g<sup>-1</sup> massa fresca) (A e B), de N amino livre (μmoles N amino livre g<sup>-1</sup> massa fresca) (C e D) e atividade da Glutamina Sintetase (nmoles γ-glutamyl g<sup>-1</sup> massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos 6 e 9 dias após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20; 40; 80; 160 mg C L<sup>-1</sup> e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 3.

Os teores de açúcares solúveis entre as duas raízes submetidas aos mesmos tratamentos, foram diferentes apenas nos tratamentos com 20 e 80 mg C L<sup>-1</sup> na primeira avaliação, sendo superiores nas raízes de manjeriço, e no tratamento com 10 mg C L<sup>-1</sup> na segunda avaliação, sendo superiores nas raízes de trevo. Estes resultados demonstram que ambas as raízes responderam melhor a adição de ácido húmico na primeira avaliação (6 dias), e que existe uma semelhança no metabolismo energético entre as duas raízes.

Para os teores de N-amino livre ( $\mu$ moles de N amino livre g<sup>-1</sup> massa fresca) foram determinados os maiores teores na primeira avaliação (6 dias) quando comparados com os teores determinados na segunda avaliação (9 dias) nas raízes de manjeriço e apenas no tratamento controle nas raízes de trevo (Figura 16 C e D). Nas raízes de manjeriço, na primeira avaliação, os menores teores foram determinados no tratamento com 80 mg C L<sup>-1</sup> mas não diferiram significativamente do tratamento com 160 mg C L<sup>-1</sup>, os demais tratamentos foram estatisticamente superiores. Na avaliação de 9 dias, apenas os tratamentos com 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> apresentaram teores de N-amino livre superiores ao tratamento com 80 mg C L<sup>-1</sup>. Nas raízes de trevo, na primeira avaliação, os maiores teores de N-amino livre foram determinados no tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> mas não diferiram significativamente do tratamento com 10 mg C L<sup>-1</sup>. O tratamento com 10 mg C L<sup>-1</sup> foi superior dos tratamentos com 80 e 160 mg C L<sup>-1</sup> e não apresentou diferenças aos tratamentos controle (sem AH) e com 40 mg C L<sup>-1</sup>.

Os maiores teores de N-amino livre ocorreram nas raízes de trevo para todos os tratamentos, exceto para os tratamentos com 40 e 160 mg C L<sup>-1</sup> na primeira avaliação (6 dias). Na segunda avaliação (9 dias) as raízes de trevo apresentaram os maiores teores de N-amino livre em todos os tratamentos. Estes resultados demonstram que ambas as raízes responderam melhor a adição de ácido húmico na primeira avaliação (6 dias), e que as raízes de trevo mantiveram sua alta atividade metabólica na segunda avaliação (9 dias).

A Glutamina Sintetase (GS) apresentou maior atividade nos tratamentos com ácidos húmicos em ambas as raízes, sendo superiores na primeira avaliação. O tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> apresentou indução na atividade da GS em todas as avaliações e em ambas as raízes, exceto nas raízes de trevo na avaliação aos 6 dias. Estes resultados sugerem que as raízes de manjeriço, por apresentarem uma atividade maior e mais homogênea entre os períodos de avaliação, podem apresentar um desenvolvimento superior às raízes de trevo. As duas raízes estudadas, manjeriço e trevo, utilizam diferentemente a energia disponível, teor de açúcar solúvel, na redução do N.

#### 4. CONCLUSÕES

O ácido húmico influenciou, positivamente, a atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPases, V-H<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>-PPases) e o metabolismo do nitrogênio avaliadas pelas frações solúveis (teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-amino livre, açúcares solúveis e nas atividades da Nitrato Redutase e da Glutamina Sintetase) nas raízes de manjerição e trevo estudadas.

Os teores das frações solúveis e atividades da NR e GS foram mais expressivos na avaliação aos 6 dias após a montagem do experimento, o que pode ser em decorrência a um maior estímulo proporcionado inicialmente pelo ácido húmico, exceto na avaliação do N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, conseqüentemente, estes maiores teores podem ser em decorrência de uma maior absorção inicial resultando em um maior acúmulo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nos vacúolos.

Com embasamento nas análises realizadas, podemos concluir que a concentração de 20 mg C L<sup>-1</sup> presente no ácido húmico proporcionou os melhores resultados para o desenvolvimento das raízes transformadas estudadas, manjerição e trevo, nos dois períodos de avaliação.

As raízes de manjerição e trevo apresentaram metabolismos distintos, e que foram influenciados pelos tratamentos com ácido húmico aos quais foram submetidas.

## **CAPITULO IV**

### **INFLUÊNCIA DO NITRATO NA ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO E TREVO**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de duas concentrações de nitrato (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) na atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase) e no metabolismo do N às 0, 12, 24 e 48 horas em raízes transformadas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.) após um período de 72 horas sem N na solução de cultivo. As raízes de manjeriço e trevo apresentaram comportamentos distintos quando submetidos às diferentes concentrações de nitrato e, conseqüentemente, diferenças na absorção, armazenamento e remobilização. As raízes de manjeriço apresentaram indução na atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase imediatamente após contato com as soluções de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sendo mais expressiva na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> que também apresentou maiores atividades das V-H<sup>+</sup>-ATPases, da Nitrato Redutase (NR) e Glutamina Sintetase (GS) e os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As raízes de trevo apresentaram comportamentos contrários, na atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases, sendo determinado indução na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> e inibição em 0,5 mmol L<sup>-1</sup> nas avaliações até 24 horas. Os teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentaram comportamento similar à atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em ambas as raízes. Os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> encontrados nas raízes de manjeriço não resultaram numa maior indução na atividade das enzimas NR e GS. Não foram observados incrementos significativos entre as duas concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> quanto aos teores de açúcares solúveis e N amino livre. O período de 72 horas de contato das raízes com a solução sem N não foi suficiente para o esgotamento do N no interior celular, sendo mais notório nas raízes de manjeriço, mostrando que estas raízes são mais eficientes em armazenar N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no vacúolo para posterior partição, em caso de deficiência de N, e atender suas exigências metabólicas do que as raízes de trevo. A NR foi influenciada pela disponibilidade de esqueletos de carbono (açúcares) e não pela concentração de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no citossol celular.

**Palavras chave:** Metabolismo primário. Dinâmica da absorção. Incorporação do nitrogênio.



## ABSTRACT

The objective this study was to evaluate the influence of two nitrate concentrations (0.5 and 5.0 mmol L<sup>-1</sup>) in the activity of proton pumps (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase) and in the N metabolism of at 0, 12, 24 and 48 hours in transformed roots of basil (*Ocimum basilicum* L.) and clover (*Trifolium repens* L.) after a period of 72 hours without N in the solution. The basil roots and clover presented different behaviors when submitted to the different concentrations of nitrate and, consequently, differences in the absorption, storage and remobilization. The basil roots presented induction immediately in the activity of P-H<sup>+</sup>-ATPase after contact with the N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> solutions, being more expressive in the concentration of 5.0 mmol L<sup>-1</sup> that also presented larger activities of V-H<sup>+</sup>-ATPases, of the Reductase Nitrate (RN) and Glutamine Synthetase (GS) and the largest tenors of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The clover roots presented contrary behaviors, in the activity of P-H<sup>+</sup>-ATPases, being certain induction in the concentration of 5.0 mmol L<sup>-1</sup> and inhibition in 0.5 mmol L<sup>-1</sup> in the evaluations up to 24 hours. The levels of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> presented similar behavior to the activity of the P-H<sup>+</sup>-ATPases in the concentration of 5.0 mmol L<sup>-1</sup> in both roots. The largest levels of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> found in the basil roots didn't result in a larger induction in the activity of the enzymes RN and GS. Significant increments were not observed among the two concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in relation to the levels of soluble sugars and free N amine. The period of 72 hours of contact of the roots with the solution without N was not enough for the exhaustion of N in the cellular compartments, specially with basil roots, showing that this species is more efficient in storing N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the vacuole for subsequent partition, in case of deficiency of N, and to assist its metabolic demands than clover roots.

**Key Words:** Primary metabolism. Dynamics of absorption. Incorporation of nitrogen.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, problemas relacionados ao custo dos fertilizantes nitrogenados e a poluição por nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) têm levado à seleção de variedades vegetais que absorvam e metabolizem o nitrogênio (N) do solo mais eficientemente. A forma de N absorvida pelas plantas é determinada principalmente pela sua abundância e acessibilidade, o que faz do  $\text{NO}_3^-$  e do  $\text{NH}_4^+$  as formas mais importantes para a nutrição sob condições de cultivo (WIRÉN et al., 1997) sendo o  $\text{NO}_3^-$  a fonte de N mineral mais importante para o crescimento das plantas em solos bem aerados. A capacidade de rápido acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  pode propiciar um maior estoque de N disponível para o metabolismo das plantas nas fases posteriores de seu ciclo de vida (SOUZA et al., 1998) ou quando o suprimento externo de N torna-se limitante (MACDUFF et al., 1989).

O transporte de  $\text{NO}_3^-$  da rizosfera para o interior celular é termodinamicamente desfavorável em termos de gradiente de potencial elétrico e químico, assim, a absorção de  $\text{NO}_3^-$  requer energia, como uma força próton-motriz, que é proporcionada por bombas eletrogênicas ( $\text{H}^+$ -ATPases). Essas enzimas existentes na plasmalema e no tonoplasto, assim como as  $\text{H}^+$ -PPases no tonoplasto, viabilizam a absorção e remobilização de solutos e íons como o  $\text{NO}_3^-$  (PALMGREN et al., 2001). Assim como para os transportadores, o  $\text{NO}_3^-$  também atua sobre estas enzimas. (SANTI et al. 1995) observaram um aumento na quantidade de  $\text{H}^+$ -ATPases e alteração dos parâmetros cinéticos destas enzimas em plasmalema de raízes de milho quando expostas ao  $\text{NO}_3^-$ . Para absorver o  $\text{NO}_3^-$  existem dois sistemas de transporte na membrana celular: o de alta afinidade (HATS - high affinity transport system) e o de baixa afinidade (LATS – low affinity transport system) (GLASS et al., 2001; FORDE, 2000). O transporte através destes sistemas é regulado pela quantidade de nutriente disponível à planta. Os HATS funcionam quando a concentração de  $\text{NO}_3^-$  na solução (do solo ou nutritiva) é baixa, e os LATS, quando a concentração é alta.

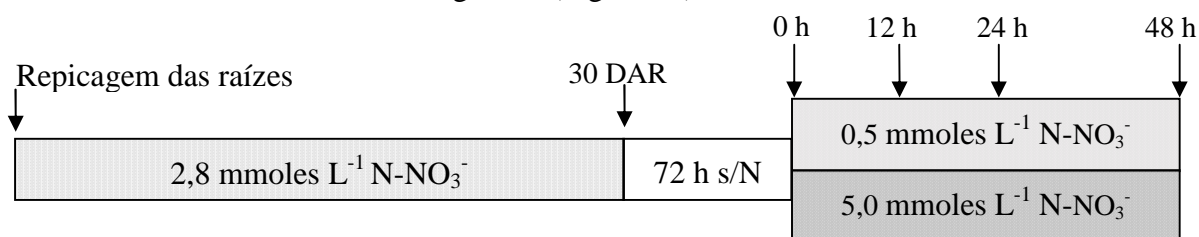
Uma vez no interior da célula, o  $\text{NO}_3^-$  absorvido pode ser reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e depois a  $\text{NH}_4^+$ , armazenado no vacúolo ou exportado pelos vasos condutores para as regiões de consumo na parte aérea. A primeira etapa da assimilação do  $\text{NO}_3^-$  ocorre no citossol pela ação da enzima nitrato redutase (NR) que catalisa a redução do  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  com gasto de poder redutor na forma de NAD(P)H. O  $\text{NO}_2^-$  após entrar nos plastídios (proplastídios em raízes e cloroplastos na parte aérea) é reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela ação da enzima nitrito redutase (NiR) utilizando ferredoxina reduzida. O  $\text{NH}_4^+$  é então incorporado em esqueletos de carbono pelo sistema enzimático GS/GOGAT (Glutamina Sintase/Glutamato Sintase). Novamente no citoplasma, o glutamato sofre transaminações pela ação das enzimas aminotransferases dando origem a outros aminoácidos, que por sua vez darão origem às proteínas (TISCHNER, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de duas concentrações de nitrato (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ) na atividade das bombas de prótons (P- $\text{H}^+$ -ATPase, V- $\text{H}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -PPase) e no metabolismo do N às 0, 12, 24 e 48 horas após um período de 72 horas sem N na solução de cultivo em raízes transformadas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a influência do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), na atividade das bombas de prótons ( $\text{P-H}^+\text{-ATPase}$ ,  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  e  $\text{H}^+\text{-PPase}$ ) e no metabolismo do N, foram repicados, separadamente, dois segmento de raízes transformadas (RTs) de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) (NICOMEDES JUNIOR, 2003) e trevo (*Trifolium repens* L.) (BERBARA, 1995) com cinco centímetros (cm) de comprimento para erlenmeyers (capacidade de 250 mL) com 75 mL de meio mínimo líquido (BÉCARD & FORTIN, 1988), com pH ajustado para 5,80 e contendo 2,8 mmoles  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ , foram acondicionados em agitadores horizontais, com movimento orbital a 90 rpm, em temperatura ambiente de 26 °C e na ausência da luz.

Trinta dias após a repicagem (DAR) o meio mínimo, no qual as raízes transformadas foram cultivadas, foi substituído por uma nova solução de meio mínimo líquido sem nitrogênio (mas contendo todos os outros nutrientes e nas mesmas concentrações do meio mínimo padrão) (Tabela 10), no qual permaneceram por 72 horas visando o esgotamento do N solúvel no interior das células. Após as 72 horas, a solução sem N foi substituída por outra solução contendo as concentrações de 0,5 e 5,0 mmoles  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ , e as avaliações realizadas às 0, 12, 24 e 48 horas seguintes (Figura 17).



**Figura 17.** Esquema do experimento realizado para a avaliação da dinâmica de absorção de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes transformadas de manjerição e trevo cultivadas com 2,8 mmoles  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  até os 30 dias após a repicagem (DAR) e submetidos, após 72 horas sem N, aos tratamentos com 0,5 ou 5,0 mmoles  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ . As coletas foram realizadas às 0, 12, 24 e 48 horas seguintes.

O experimento foi montado num esquema fatorial  $2 \times 2 \times 4$ , sendo duas raízes transformadas (manjerição e trevo), duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0 mmoles  $\text{L}^{-1}$ ) e quatro períodos de avaliação (0, 12, 24 e 48 horas após a adição de  $\text{N-NO}_3^-$ ), em quatro repetições.

Foram avaliados: a atividade das bombas de prótons ( $\text{P-H}^+\text{-ATPase}$ ,  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  e  $\text{H}^+\text{-PPase}$ ) (YANG et al., 2002, com modificações de SANTOS, 2006), a atividade da Nitrato Redutase (JAWORSKI, 1971), da Glutamina Sintetase (FARDEN & ROBERTSON, 1980) com modificações de SOUZA et al. (2007) e as frações solúveis (FERNANDES, 1983) N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955),  $\text{N-NH}_4^+$  (FELKER, 1977),  $\text{N-NO}_3^-$  (CATALDO et al., 1975) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957) (Anexo 1).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 1998), e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 10.** Composição do meio mínimo (MM) modificado, utilizado para o cultivo das raízes transformadas de manjeriço e trevo, com as concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  estudadas (0,5 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ).

Reagentes	MM	MM com	MM com
		0,5 $\text{mmol L}^{-1} \text{N-NO}_3^-$	5,0 $\text{mmol L}^{-1} \text{N-NO}_3^-$
.....mg Kg <sup>-1</sup> .....			
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	731,0	73,54	56,27
KNO <sub>3</sub>	80,0	-	16,85
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	288,0	5,9	22,82
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,8	-	0,48
KCl	65,0	3,73	-
KI	0,75	0,75	0,75
NaFeEDTA	8,0	8,0	8,0
MnCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	6,0	6,0	6,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5	1,5	1,5
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,13	0,13	0,13
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,4	2,4	2,4
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,65	2,65	2,65
Mio Inositol	50,0	50,0	50,0
Glicina	3,0	3,0	3,0
Tiamina.HCl	0,10	0,10	0,10
Pirodoxina.HCl	0,10	0,10	0,10
Ácido Nicotínico	0,50	0,50	0,50
Sacarose	10000	10000	10000
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	17,96
CaSO <sub>4</sub>	-	9,74	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	9,86	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,61	-

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O transporte  $\text{N-NO}_3^-$  da região da rizosfera para o interior celular é termodinamicamente desfavorável, assim, a absorção de nitrato requer uma força próton-motriz, que é proporcionada pelas bombas eletrogênicas ( $\text{H}^+$ -ATPases) existentes na membrana plasmática. Assim como para os transportadores, o  $\text{NO}_3^-$  também atua sobre estas enzimas. As duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  estudadas na solução de cultivo (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ) apresentaram indução bastante diferenciadas sobre a atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPase (membrana plasmática) ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ), tanto para as raízes de manjeriço como para as de trevo (Figura 18 A e B).

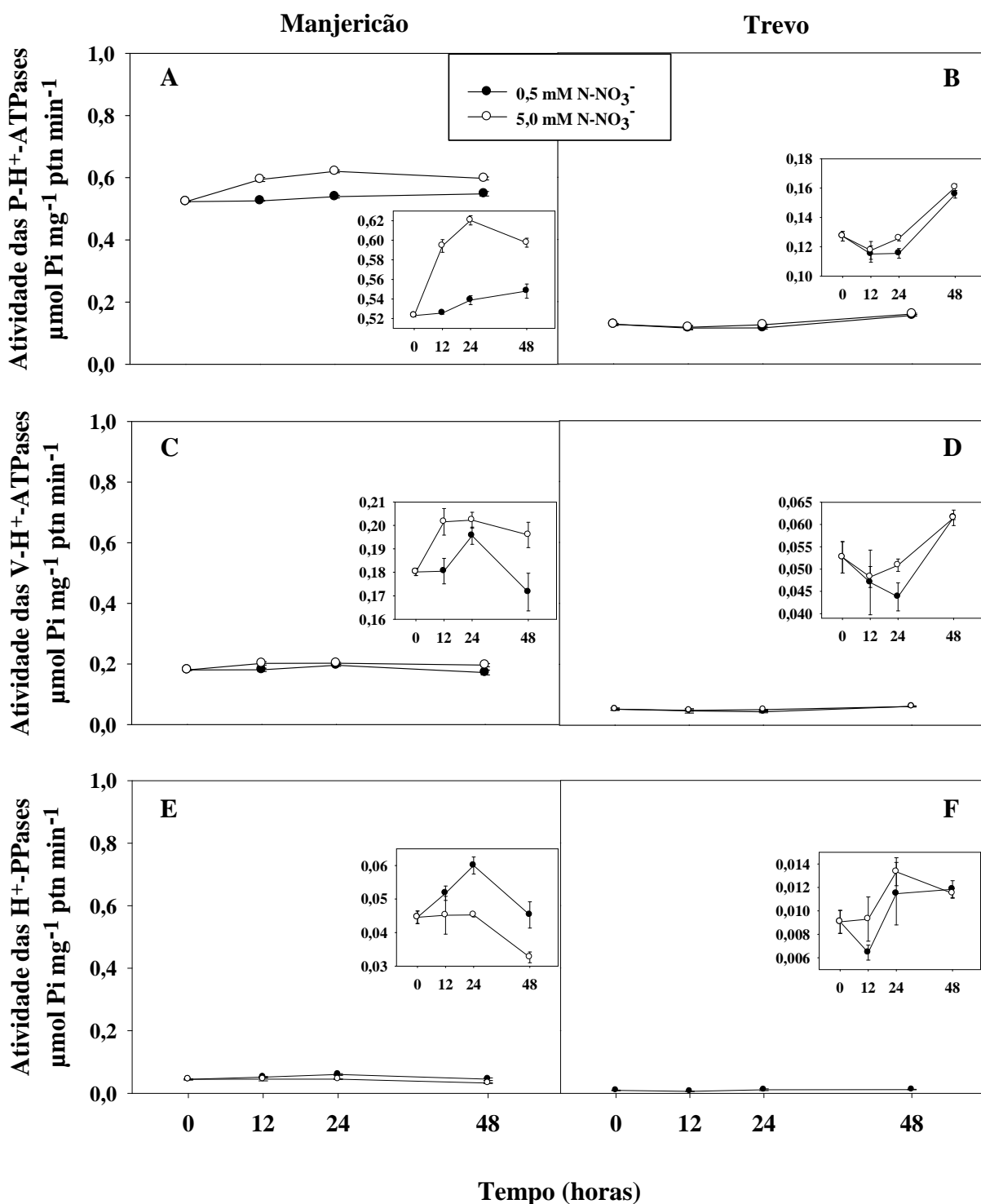
As raízes de manjeriço submetidas à concentração de 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  proporcionaram indução na atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases imediatamente após contato com a solução, avaliadas às 12 e 24 horas após, sendo esta indução mais expressiva às 24 horas de contato, a seguir houve uma pequena queda em sua atividade (48 horas) o que pode ser decorrente da estabilização na absorção do  $\text{N-NO}_3^-$  pelas raízes devido à reposição de quantidades internas satisfatórias para seu desenvolvimento normal e possível acúmulo do  $\text{NO}_3^-$  excedente nos vacúolos. As raízes submetidas à concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  apresentaram uma atividade linear crescente para as  $\text{P-H}^+$ -ATPases ( $R^2 = 0,9652$ ) e apresentaram um indução em sua atividade nas coletas seguintes (24 e 48 horas), mas sempre inferiores à atividade encontrada na concentração de 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ .

As raízes de trevo submetidas à concentração de 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  apresentaram indução na atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases imediatamente após contato com a solução e mantiveram uma atividade linear crescente ( $R^2 = 0,9160$ ) até a última avaliação (48 horas), mas sempre inferior a atividade encontradas nas raízes de manjeriço para as mesmas concentrações de  $\text{NO}_3^-$ . As raízes submetidas à concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  apresentaram inibição na atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases na segunda e terceira avaliações (12 e 24 horas) e apresentaram um indução em sua atividade na coleta seguinte (48 horas) o que pode ser em decorrência a um estímulo tardio na absorção de  $\text{N-NO}_3^-$  sob baixas concentrações por estas raízes, mas sempre inferiores à atividade induzida pela concentração de 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ .

Os valores das atividades das  $\text{P-H}^+$ -ATPases nas raízes de trevo foram inferiores à atividade verificada nas raízes de manjeriço, nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ) e em todos os períodos de avaliação, o que pode ser uma diferença entre espécies vegetais na eficiência da absorção do  $\text{NO}_3^-$ .

SANTOS (2006) observou que após a adição do nitrato na solução a planta começou a absorvê-lo imediatamente ocasionando a acidificação do citossol (simporte de  $1 \text{NO}_3^- / 2 \text{H}^+$ ) que é controlada pela extrusão de grande quantidade de prótons através da ação das  $\text{P-H}^+$ -ATPases, que é então equilibrado com o decorrer do tempo.

As atividade das  $\text{V-H}^+$ -ATPases ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) das raízes de manjeriço (Figura 18 C) submetidas à concentração de 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  apresentaram o mesmo comportamento da atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases, ou seja, tiveram indução em sua atividade até as 24 horas após o contato com a solução e na avaliação seguinte (48 horas) houve pequena queda em sua atividade. Este comportamento está relacionado com a quantidade de  $\text{NO}_3^-$  no citossol para garantir teores mínimos para o metabolismo das raízes sem interferir no seu desenvolvimento. As raízes submetidas à concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  apresentaram comportamento semelhante à concentração de 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ , mas com atividade inferior no período entre 24 e 48 horas de contato com a solução e sempre com menor atividade quando comparadas à atividade com 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ .



**Figura 18.** Atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases (A e B), das V-H<sup>+</sup>-ATPases (C e D) e das H<sup>+</sup>-PPases (E e F) ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) às 0, 12, 24 e 48 horas após um período de 72 horas sem N na solução, e submetidas a duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>). Detalhes nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 4.

As raízes de trevo (Figura 18 D) submetidas as duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ) apresentaram comportamento inverso ao das raízes de manjeriço no qual foi observado inibição na atividade das  $\text{V-H}^+$ -ATPases até as 24 horas de contato com a solução, e houve uma pequena indução no período entre 24 e 48 horas, mas que foram bem inferiores quando comparados com as raízes de manjeriço submetidas aos mesmos tratamentos.

O aumento da atividade das  $\text{V-H}^+$ -ATPases após a adição do  $\text{NO}_3^-$  à solução pode ser uma estratégia das raízes para o controle de cargas no interior dos vacúolos que tendem a ficar muito eletrogênicos com a entrada de grande quantidade de  $\text{NO}_3^-$  que ocorre através de um canal e de um antiporte (ANGELI et al., 2006), que é controlada pelo bombeamento de prótons para dentro deste compartimento (RATAJCZAK, 2000).

As raízes de manjeriço submetidas à concentração de 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  apresentaram uma pequena indução na atividade das  $\text{H}^+$ -PPases ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) 24 horas após contato com a solução (Figura 18 E) e que a seguir houve uma queda em sua atividade (48 horas). As raízes submetidas à concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  também apresentaram, inicialmente, uma indução na atividade das  $\text{H}^+$ -PPases (12 horas) e uma inibição em sua atividade nas avaliações seguintes (24 e 48 horas) e foram superiores à atividade induzida pela concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ .

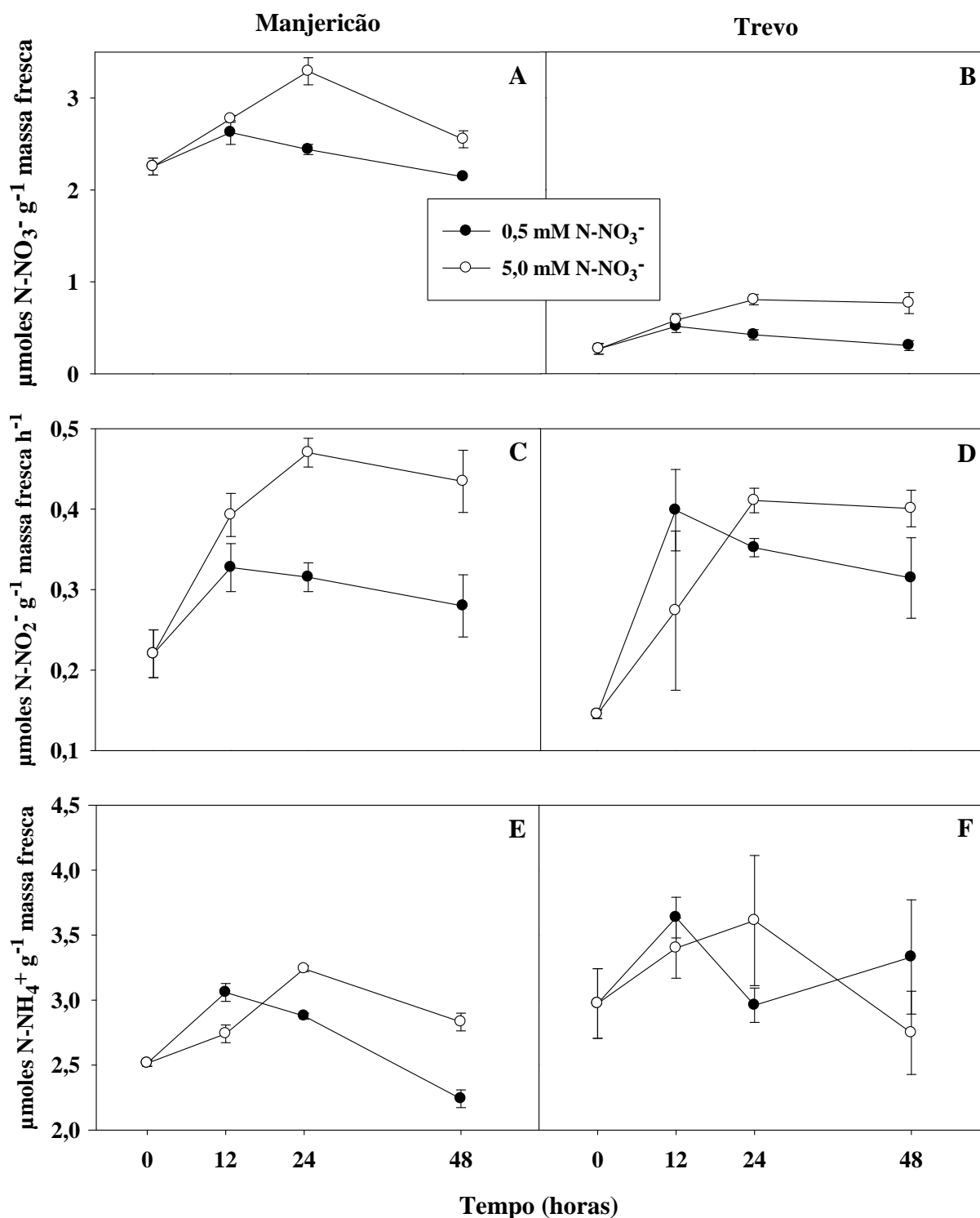
As raízes de trevo (Figura 18 F) submetidas às duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ) apresentaram inibição na atividade das  $\text{H}^+$ -PPases imediatamente após contato com a solução (12 horas) e tiveram um aumento em sua atividade até a última avaliação (24 e 48 horas) mas sempre foram inferiores à atividade verificada nas raízes de manjeriço, nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ) e em todos os períodos de avaliação.

As  $\text{H}^+$ -PPases são freqüentemente denominadas como bombas de prótons auxiliares as  $\text{V-H}^+$ -ATPases quando o suprimento energético das células está baixo, neste caso foi observado uma atividade inversa tanto para as raízes de manjeriço como para as de trevo quando comparados com os teores de açúcares solúveis no interior das células (Figura 18 F).

Os teores de  $\text{NO}_3^-$  ( $\mu\text{moles N-NO}_3^- \text{g}^{-1}$  massa fresca) nas raízes de manjeriço e trevo (Figura 19 A e B) apresentaram comportamento similar à atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases (Figura 18 A e B) para a concentração de 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ , ou seja, apresentaram um acréscimo em sua concentração até a avaliação de 24 horas após a adição das soluções com  $\text{NO}_3^-$  e um ligeiro decréscimo na avaliação seguinte (48 horas). Para a concentração de 0,5  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  os teores de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes foram inversamente proporcionais a atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases, estes dados reforçam as sugestões de SANTOS (2006) nos quais a atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases são decorrência da acidificação do citossol celular através da absorção do  $\text{NO}_3^-$  (simporte de  $1 \text{NO}_3^- / 2 \text{H}^+$ ) e não sendo a absorção de  $\text{NO}_3^-$  uma consequência da ativação das bombas de prótons.

O período de 72 horas de permanência das raízes de manjeriço e trevo na solução sem N não foi suficiente para a total remobilização das reservas de N, isto pode ser explicado pela presença de  $\text{NO}_3^-$  na primeira avaliação (zero hora) que foram superiores nas raízes de manjeriço, em quase 10 vezes, quando comparado com as raízes de trevo, que também respondeu inferiormente a absorção deste nutriente, sendo mais expressiva para a solução com 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  nas duas espécies de raízes estudadas.

Do ponto de vista metabólico, o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  nos tecidos dá-se pelo alto influxo do ânion sem que haja disponibilidade de poder redutor proveniente do NADH ou NADPH para a redução no  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  pela enzima nitrato redutase (CAMPBELL, 1999), e da ferredoxina para a redução, pela nitrito redutase, do  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$ , cuja assimilação também depende da disponibilidade de esqueletos de carbono (açúcares) para a formação de aminoácidos ou por mecanismos desenvolvidos pela adaptação das espécies quanto a disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  na solução que induzirá os transportadores de alta ou baixa afinidade para  $\text{NO}_3^-$ .



**Figura 19.** Teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (µmoles de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> de massa fresca) (A e B); atividade da nitrato redutase (µmoles N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca h<sup>-1</sup>) (C e D) e teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (µmoles N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjerição (A, C e E) e trevo (B, D e F) às 0, 12, 24 e 48 horas após um período de 72 horas sem N na solução, e submetidas a duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 4.

Os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> encontrados nas raízes de manjerição não resultaram numa maior indução na atividade da enzima nitrato redutase, que apresentou atividade



semelhante às raízes de trevo nas duas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e em todos os períodos de avaliação, e conseqüentemente, não foram determinadas diferenças nos teores de  $\text{NH}_4^+$  entre as duas raízes estudadas. Estes resultados demonstram que o  $\text{NO}_3^-$  absorvido pode ser reduzido a  $\text{NH}_4^+$  no citossol e o excesso armazenado nos vacúolos enquanto que a atividade da NR reflete a circulação do nitrato no citossol das células, que não são influenciadas pelo  $\text{NO}_3^-$  acumulado no vacúolo (COOKSON et al., 2005). Dessa forma, independentemente da concentração de  $\text{NO}_3^-$  na solução externa, a concentração de  $\text{NO}_3^-$  no citossol é a mesma, enquanto que teores superiores de  $\text{NO}_3^-$  absorvidos podem ser armazenados nos vacúolos.

A atividade da nitrato redutase ( $\mu\text{moles N-NO}_2^- \text{ g}^{-1}$  massa fresca  $\text{h}^{-1}$ ) tanto nas raízes de manjeriço como na de trevo (Figura 19 C e D), demonstrou comportamento similar aos teores de  $\text{NO}_3^-$  nas duas concentrações de N- $\text{NO}_3^-$  da solução (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ), apresentando acréscimo em sua atividade nas avaliações de zero a 24 horas e um ligeiro decréscimo na avaliação seguinte (48 horas). A adição da solução com 0,5  $\text{mmoles L}^{-1}$  de N- $\text{NO}_3^-$  resultou em atividade da nitrato redutase superior à solução com 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  na avaliação de 12 horas nas raízes de trevo, este fato pode ser em decorrência a uma necessidade metabólica das raízes como pode ser observado pela maior concentração de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 19 F) decorrente da sua maior atividade da nitrato redutase.

A nitrato redutase (NR) é de grande importância no metabolismo do N desenvolvendo uma etapa primordial na via de assimilação no qual a execução desta via metabólica implica, pelo menos, no consumo de oito elétrons e na geração de  $\text{NH}_4^+$ , o que representa considerável dreno de energia metabólica.

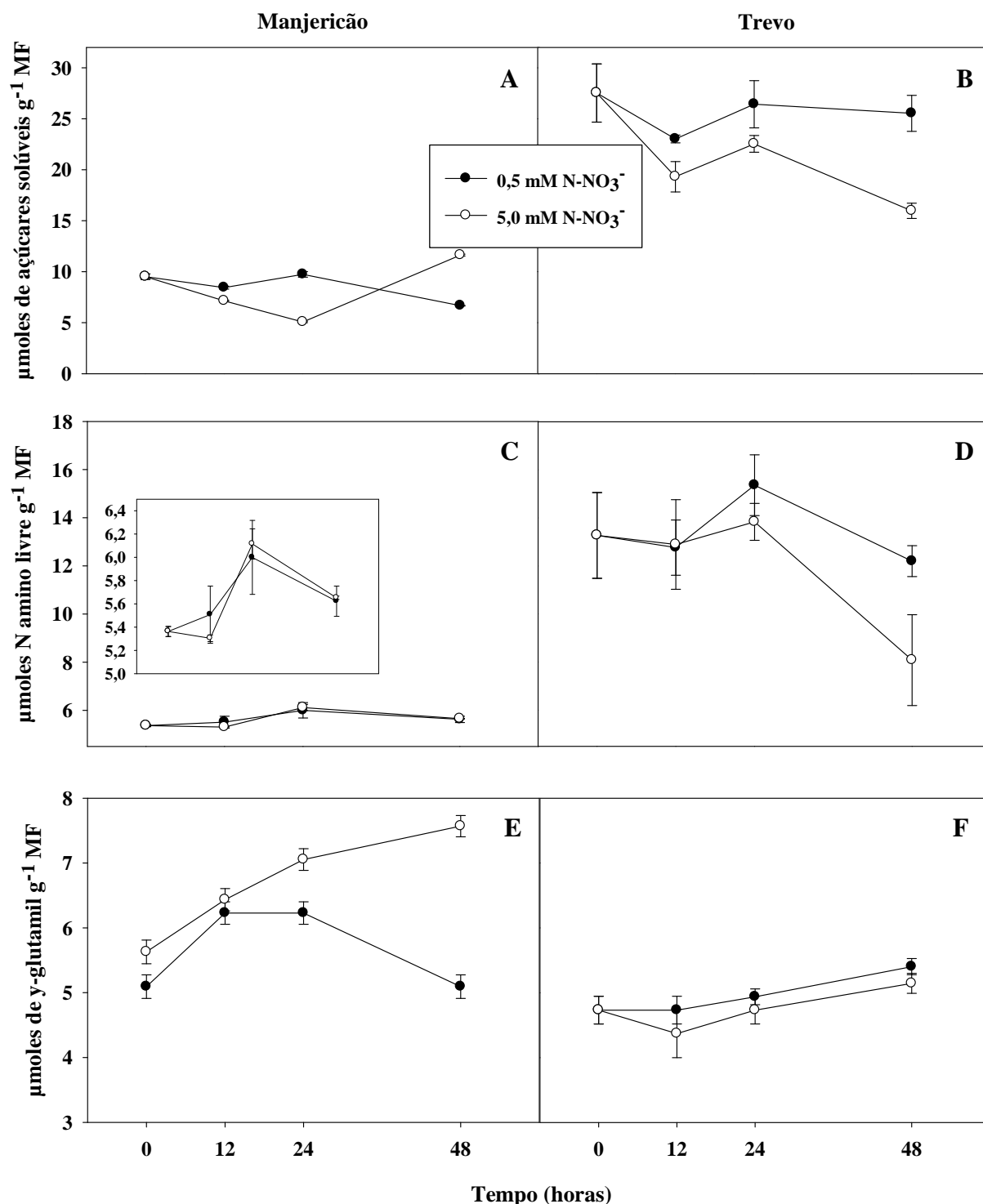
Nos teores de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles açúcares solúveis g}^{-1}$  massa fresca) não foram observados incrementos significativos mesmo após a adição de  $\text{NO}_3^-$  à solução de crescimento das raízes de manjeriço e trevo (Figura 20 A e B) mesmo após um período de 72 horas sem N na solução, podendo ser notado uma pequena queda em seus teores nos períodos de avaliação. Isto pode ser em decorrência de uma remobilização das reservas de N durante o período de estresse por falta de N, e que, após a adição dos tratamentos as raízes armazenaram grandes quantidades do N- $\text{NO}_3^-$  absorvido para suprir o que foi gasto e garantir suprimento deste nutriente futuramente.

Nos teores de N amino livre ( $\mu\text{moles N amino livre g}^{-1}$  massa fresca) não foram observados incrementos significativos após a adição de  $\text{NO}_3^-$  à solução de crescimento das raízes de manjeriço e trevo (Figura 20 C e D) mesmo após um período de 72 horas sem N na solução, podendo ser notado uma pequena queda nas primeiras 12 horas de avaliação. Estes resultados sugerem que as raízes não se encontravam sob estresse por falta de N, ou mesmo que, a remobilização do  $\text{NO}_3^-$  armazenado foi suficiente para manter os teores de N amino nas raízes. Tanto para os teores de açúcares solúveis como para os de N amino livre foram determinados os maiores teores nas raízes de trevo.

O amônio é utilizado na síntese de glutamina e glutamato, que servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas. A assimilação do  $\text{NH}_4^+$  pode ocorrer através de duas vias, sendo que a principal delas envolve duas enzimas: a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT), a segunda via envolve a enzima glutamato desidrogenase (GDH). A primeira via, GS-GOGAT, é a principal responsável pela assimilação de  $\text{NH}_4^+$  em condições limitantes deste composto e a segunda via, GDH, tem maior funcionalidade quando a concentração de  $\text{NH}_4^+$  é alta, pois a GDH possui uma afinidade relativamente baixa com este composto (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Foi determinada uma baixa atividade da Glutamina Sintetase (GS) em ambas as raízes (Figura 20 E e F). A atividade da nitrato redutase encontradas nas raízes após um período de 72 horas sem nitrogênio conseqüentemente resultou em uma atividade semelhante da GS nos mesmos períodos de avaliação. Nas raízes de manjeriço foi determinada uma atividade linear crescente da GS quando submetidas na concentração de 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  N- $\text{NO}_3^-$  até a

última avaliação (48 horas) e na solução de 0,5 mmoles L<sup>-1</sup> foi determinada uma indução em sua atividade na segunda e terceira avaliações (12 e 24 horas) e uma inibição na avaliação de 48 horas.



**Figura 20.** Teores de açúcares solúveis (µmoles de açúcares solúveis g<sup>-1</sup> massa fresca) (A e B), de N amino livre (µmoles N amino livre g<sup>-1</sup> massa fresca) (C e D) e atividade da Glutamina Sintetase (µmoles γ-glutamyl g<sup>-1</sup> massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) às 0, 12, 24 e 48 horas após um período de 72 horas sem N na solução, e submetidas a duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>). Detalhes no inserto na figura interna (C) com escala ajustada. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n=4.

#### 4. CONCLUSÕES

O período de 72 horas de contato das raízes com a solução sem N não foi suficiente para o esgotamento do N no interior celular, sendo mais notório nas raízes de manjerição, mostrando que estas raízes são mais eficientes em armazenar  $\text{N-NO}_3^-$  no vacúolo para posterior partição, em caso de deficiência de N, e atender suas exigências metabólicas do que as raízes de trevo.

As raízes de manjerição apresentaram indução na atividade da  $\text{P-H}^+\text{-ATPase}$  imediatamente após contato com as soluções de  $\text{N-NO}_3^-$ , sendo mais expressiva na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  que também apresentou maiores atividades das  $\text{V-H}^+\text{-ATPases}$ , da Nitrato Redutase (NR) e Glutamina Sintetase (GS) e os maiores teores de  $\text{N-NO}_3^-$ .

As raízes de trevo apresentaram comportamentos contrários, na atividade das  $\text{P-H}^+\text{-ATPases}$ , sendo determinado indução na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e inibição em  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  nas avaliações até 24 horas.

Os maiores teores de  $\text{N-NO}_3^-$  encontrados nas raízes de manjerição não resultaram numa maior indução na atividade das enzimas NR e GS, resultando no armazenamento do  $\text{NO}_3^-$  absorvido para um futuro estresse por falta de N na solução.

## **CAPITULO V**

### **INTERAÇÃO ÁCIDO HÚMICO - NITRATO NA ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO E TREVO**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica da absorção-acúmulo-remobilização do  $\text{N-NO}_3^-$  através da atividade das bombas de prótons e do metabolismo do nitrogênio em raízes transformadas de manjeriço (*Ocimum basilicum*) e trevo (*Trifolium repens* L.) crescidas em meio MM enriquecido com ácido húmico (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) aos 6, 9 e 15 dias após a repicagem das raízes. Nos tratamentos com AH (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$ ) e nitrato (0,5 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) foram determinados as maiores atividades das P- $\text{H}^+$ -ATPases, V- $\text{H}^+$ -ATPases,  $\text{H}^+$ -PPases, nitrato redutase (NR) e da glutamina sintetase (GS) bem como os maiores teores de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e açúcares solúveis na avaliação de 6 dias (primeira avaliação) e também foram determinados os menores teores de  $\text{N-NO}_3^-$  e N-amino livre, sendo mais expressivos na concentração de 20  $\text{mg C L}^{-1}$  (controle sem AH  $< 10 < 20 \text{ mg C L}^{-1}$ ) na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ , sendo determinado um comportamento inverso no decorrer das avaliações (9 e 15 dias). As raízes transformadas de manjeriço e trevo apresentaram maiores influências da interação do ácido húmico com nitrato (AH -  $\text{N-NO}_3^-$ ) nas avaliações aos seis dias, para todas as avaliações realizadas, resultando em maiores teores de  $\text{N-NO}_3^-$  e N-amino livre nas células vegetais nas avaliações seguintes (9 e 15 dias). As raízes submetidas aos tratamentos com ácidos húmicos (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$ ), nas duas concentrações de nitrogênio em solução (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ ) apresentaram os maiores benefícios na atividade das bombas de prótons e no metabolismo do nitrogênio em todos os períodos de avaliação, confirmando a bioatividade dos ácidos húmicos. As P- $\text{H}^+$ -ATPases tiveram, inicialmente, as maiores influências em sua atividade da interação AH -  $\text{N-NO}_3^-$ , e uma significativa diminuição no decorrer das avaliações (9 e 15 dias).

**Palavras chave:** Substâncias húmicas. Raízes em cabeleira. Metabolismo primário.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the dynamics of the absorption-accumulation-remobilization of  $\text{N-NO}_3^-$  through the activity of the protons pumps and the metabolism of the nitrogen in transformed roots of basil (*Ocimum basilicum* L.) and clover (*Trifolium repens* L.) grown in MM enriched with humic acid (10 and 20  $\text{mg C L}^{-1}$  and control without AH) after 6, 9 and 15 days. In the treatments with AH (10 and 20  $\text{mg C L}^{-1}$ ) there were certain P- $\text{H}^+$ -ATPases's activities, V- $\text{H}^+$ -ATPases,  $\text{H}^+$ -PPases, reductase nitrate (RN) and glutamine sintetase (GS) as well as the high levels of ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and soluble sugars in the evaluation of 6 days (first evaluation). They were also small levels of N-  $\text{NO}_3^-$  and free N-amino, being more expressive in the concentration of 20  $\text{mg C L}^{-1}$  (controls without AH < 10 < 20  $\text{mg C L}^{-1}$ ) in the concentration of 5.0  $\text{mmol L}^{-1}$  of  $\text{N-NO}_3^-$ . There was an inverse behavior between samples (9 and 15 days). The transformed roots of basil and clover presented larger influences of the interaction of the humic acid with nitrate (AH -  $\text{N-NO}_3^-$ ) in the evaluations after six days, resulting in larger levels of  $\text{N-NO}_3^-$  and free N-amino in the vegetable cells in the later evaluations. The roots submitted to the treatments with humic acids (10 and 20  $\text{mg C L}^{-1}$ ), in the two concentrations of nitrogen in solution (0.5 and 5.0  $\text{mmoles L}^{-1}$  of  $\text{N- NO}_3^-$ ) presented the largest benefits in the activity of the protons pumps and in the metabolism of the nitrogen in all the evaluation periods, confirming the bioactivity of the humic acids. P- $\text{H}^+$ -ATPases presented, initially, the largest influences in this activity.

**Key Words:** Humic substances. Hairy roots. Primary mebabolism.

## 1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio ocupa posição de destaque entre os elementos essenciais ao desenvolvimento das plantas. Isto porque apesar de ser encontrado, em alguns casos, em quantidades relativamente altas (de 0,5 a 5,0 g Kg<sup>-1</sup> na camada arável de 0-20 cm) menos de 5% desse total são NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sua baixa disponibilidade somada à grande necessidade pelos vegetais, faz com que seja um dos nutrientes mais limitantes à produtividade da maioria das culturas (CANTARELLA et al., 2008; SOUZA & FERNANDES, 2006; STEVENSON, 1982). Esta baixa disponibilidade é decorrente de que 90% ou mais do nitrogênio do solo está complexado na forma orgânica (matéria orgânica), sendo somente uma pequena parte mineralizada pela microbiota do solo durante o ciclo da grande maioria das culturas (CAMARGO et al., 1999).

A matéria orgânica do solo (MOS) apresenta-se como um sistema complexo de substâncias, cuja dinâmica é governada pela adição de resíduos orgânicos de diversas naturezas e por sua transformação contínua até a sua estabilização em húmus (SANTOS et al., 2008; SANTOS, 1984). Tem grande importância como fonte de nutrientes para as culturas, na retenção de cátions, complexação de elementos tóxicos e de micronutrientes, estabilidade da estrutura, infiltração e retenção da água, aeração, fonte de carbono e energia aos organismos heterotróficos, constituindo-se, assim, num componente fundamental do potencial produtivo desses solos.

A disponibilidade de N para os vegetais em sistemas naturais ocorre principalmente pela mineralização da matéria orgânica do solo (ciclagem de nutrientes), decorrente o baixo conteúdo desse nutriente nos solos. Apesar disso, a maior parte do N do solo encontra-se em frações cuja mineralização é bastante lenta devido a alta estabilidade do húmus (SCHNITZER, 1982), sendo mineralizado (disponibilizado para a absorção pelas raízes) apenas 2 a 3% do N total do solo a cada ano. O processo de mineralização desempenha papel importante no ciclo do nitrogênio, sendo responsável pela transformação do N-orgânico, presente no tecido vegetal ou animal, para formas inorgânicas simples, principalmente NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, disponível às culturas (CANTARELLA et al., 2008; CANTARELLA et al., 1992) e a quantidade do N-mineralizado seja função do conteúdo e da taxa de mineralização das formas orgânicas nitrogenadas, existindo uma relação direta entre o N-mineralizado e a absorção de N pelas plantas (CAMARGO et al., 1997).

Por sua alta mobilidade no solo, o N tem sido estudado intensamente com o propósito de maximizar a eficiência de seu uso. Para tanto, tem-se buscado reduzir sua perda no solo e melhorar sua absorção pelas plantas (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000). O transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> da rizosfera para o interior celular é termodinamicamente desfavorável em termos de gradiente de potencial elétrico e químico, assim, a absorção de nitrato requer energia, como uma força próton-motriz, que é proporcionada por bombas eletrogênicas (H<sup>+</sup>-ATPases) (PALMGREN, et al., 2001).

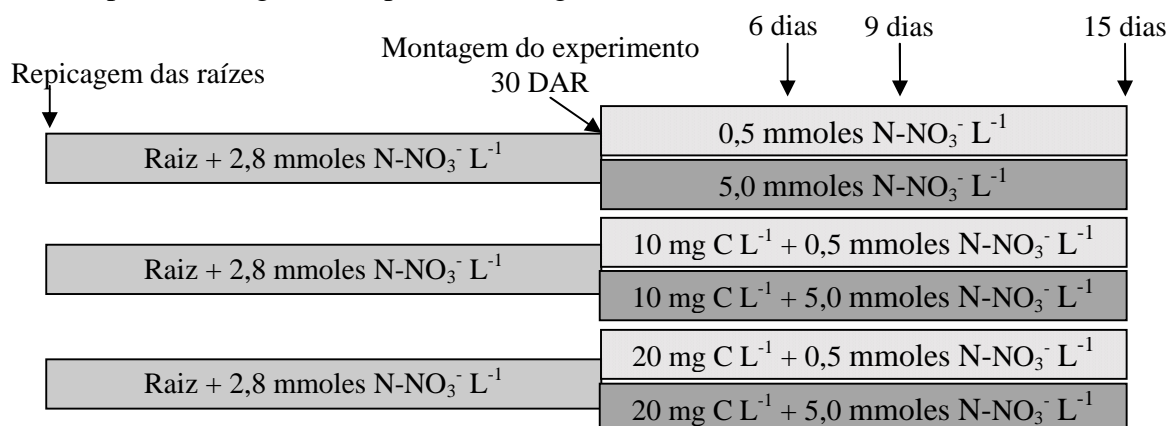
As substâncias húmicas (SH) são as principais constituintes da matéria orgânica dos solos e um dos seus efeitos são mostrados em parte, no aumento da atividade das H<sup>+</sup>-ATPases, influenciando positivamente a absorção de alguns nutrientes da solução do solo, em particular o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) como uma atividade fito-hormonal com efeito estimulatório no crescimento e desenvolvimento das plantas (NARDI et al., 2007; ZANDONADI et al., 2007; LIMA, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica da absorção-acúmulo-remobilização do N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> através da atividade das bombas de prótons e do metabolismo do nitrogênio em raízes transformadas de manjeriço (*Ocimum basilicum*) e trevo (*Trifolium repens* L.) crescidas em meio MM (BÉCARD & FORTIN, 1988) enriquecido com ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH e) em duas concentrações de nitrato (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) aos 6, 9 e 15 dias após a repicagem das raízes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a influência da interação do ácido húmico (AH) associado com nitrogênio (N) na forma de nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) na atividade das bombas de prótons ( $\text{P-H}^+\text{-ATPase}$ ,  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  e  $\text{H}^+\text{-PPase}$ ) e no metabolismo do N em raízes transformadas (RTs) de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) (NICOMEDES JUNIOR, 2003) e trevo (*Trifolium repens* L.) (BERBARA, 1995) foram repicados separadamente, dois segmento de cada raiz, com aproximadamente cinco centímetros de comprimento para erlenmeyers (capacidade de 250 mL) com 75 mL de meio mínimo líquido (BÉCARD & FORTIN, 1988) modificado, com pH ajustado para 5,80. Os erlenmeyers foram acondicionados em agitadores horizontais, com movimento orbital a 90 rpm, em temperatura ambiente de 26 °C e na ausência da luz.

Trinta dias após a repicagem (DAR) foi montado o experimento substituindo o meio mínimo, no qual as raízes de manjerição e trevo foram cultivadas, por uma nova solução de meio mínimo líquido contendo os tratamentos com diferentes concentrações de carbono (C presente no ácido húmico) (10 e 20 mg  $\text{C L}^{-1}$  e controle sem AH) e de nitrato (0,5 e 5,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ ) para a avaliação da atividade das bombas de prótons e do metabolismo do nitrogênio aos 6, 9 e 15 dias após a montagem do experimento (Figura 21).



**Figura 21.** Esquema do experimento realizado para avaliação da atividade das bombas de prótons ( $\text{P-H}^+\text{-ATPase}$ ,  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  e  $\text{H}^+\text{-PPase}$ ) e no metabolismo do nitrogênio nas raízes transformadas de manjerição e trevo cultivadas por 30 dias com 2,8 mmol  $\text{L}^{-1}$  até a montagem do experimento (30 DAR) no qual foram submetidas as diferentes concentrações de ácido húmico (10, 20 mg de  $\text{C L}^{-1}$  e controle) e a duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ), sendo as análises realizadas aos 6, 9 e 15 dias seguintes.

O ácido húmico utilizado foi proveniente de uma rápida vermicompostagem, 70 dias, utilizando minhocas *Eisenia foetida*. Foi extraído conforme procedimento adotado pela sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS) descrito por SWIFT (1996) com adaptações de BENITES et al. (2003) e caracterizado quimicamente (DICK et al., 1999) e por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) (TAN, 1995; STEVENSON, 1994; STEVENSON & GOH, 1971). Os teores de C, H, N e O do ácido húmico foram de  $47,0 \pm 0,1$ ;  $4,87 \pm 0,01$ ;  $3,02 \pm 0,03$  e  $45,1 \pm 0,03$  respectivamente, juntamente com as relações atômicas C/N, O/C, H/C que foram de  $15,6 \pm 0,1$ ;  $0,96 \pm 0,02$ ;  $0,104 \pm 0,005$ , respectivamente, caracterizando um material estável porém, pouco humificado ( $\text{E}_4/\text{E}_6$ ), devido ao rápido processo de transformação, com caráter mais aromático e no estado reduzido ( $\omega$ ) (descrito no Capítulo I).



O experimento foi montado em esquema fatorial 2x3x2x3, sendo duas espécies de raízes transformadas (manjeriçã e trevo), três concentrações de AH (10, 20 mg de C L<sup>-1</sup> e controle sem AH), duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>) e três períodos de avaliação (6, 9 e 15 dias após a montagem do experimento) em 4 repetições.

Foram avaliados: a atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase) (YANG et al., 2002, com modificações de SANTOS, 2006), a atividade da Nitrato Redutase (JAWORSKI, 1971) e da Glutamina Sintetase (FARDEN & ROBERTSON, 1980) com modificações de SOUZA et al. (2007) e as frações solúveis (FERNANDES, 1983) N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (CATALDO et al., 1975), N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (FELKER, 1977), açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957) e N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955) (Anexo 1).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 1998) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p≤0,05).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira avaliação (6 dias) foram determinadas atividades, lineares crescente, das P-H<sup>+</sup>-ATPases com o aumento dos teores de ácido húmico em solução (controle sem AH < 10 < 20 mg C L<sup>-1</sup>), sendo estas atividades mais expressiva nas raízes de manjeriço e com os tratamentos na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases entre as duas raízes submetidas aos mesmos tratamentos com ácido húmico (10, 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>), foram significativamente maiores nas raízes de manjeriço em todos os tratamentos quando comparadas com as raízes de trevo na primeira avaliação (6 dias) (Figura 22 A e B).

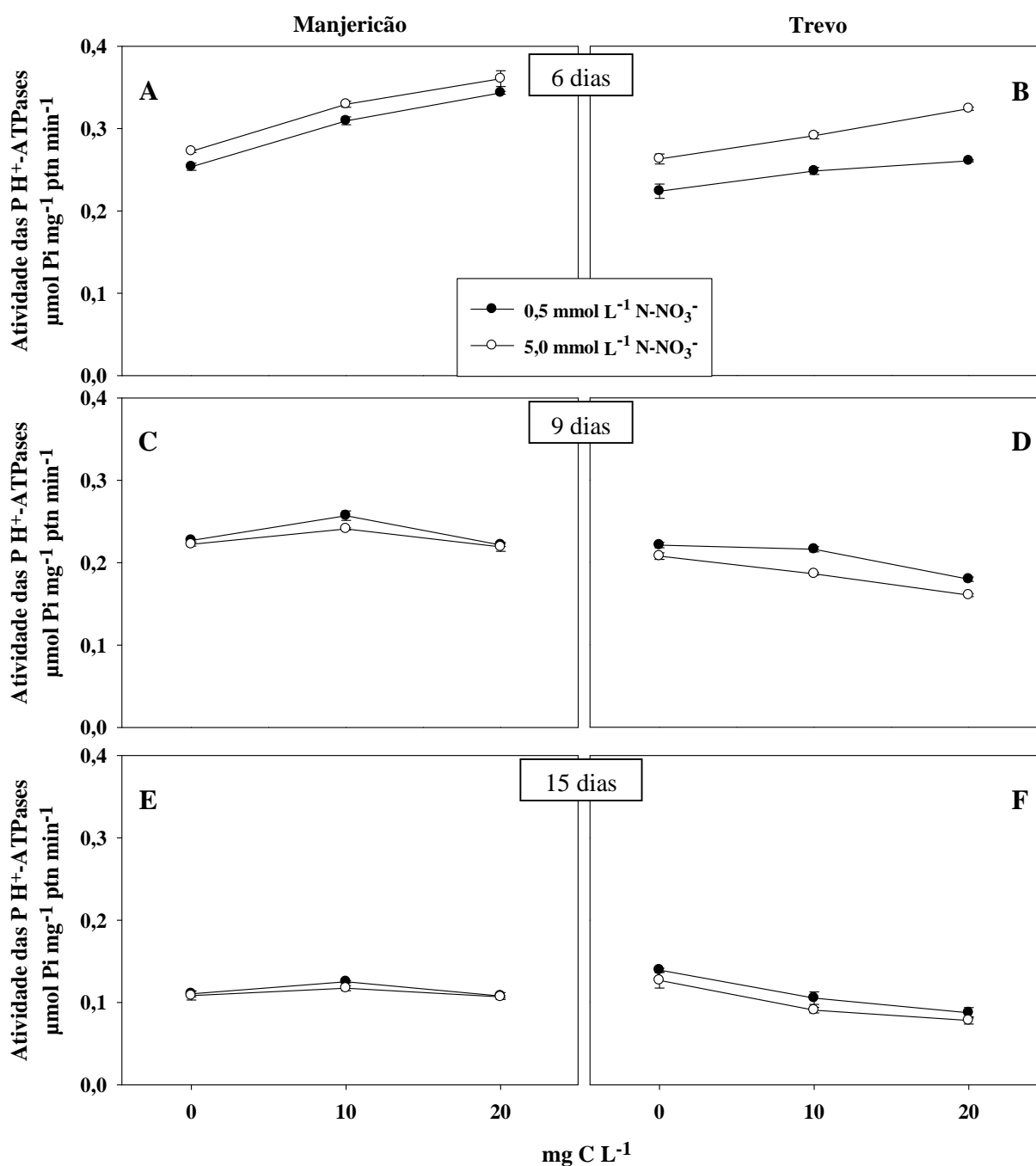
Na segunda avaliação (9 dias) as raízes de manjeriço apresentaram uma atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases superior às de trevo, sendo as maiores atividades observadas nas raízes submetidas aos tratamentos com ácido húmico (10 e 20 mg L<sup>-1</sup>) e nas duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>). No tratamento controle (sem AH) e nas duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) as atividades das P-H<sup>+</sup>-ATPases não apresentaram diferenças significativas entre as duas raízes (Figura 22 C e D).

Na terceira avaliação (15 dias) foram determinadas as menores atividades em ambas as raízes (manjeriço e trevo) nos tratamentos com ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) e nas duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>). O tratamento controle (sem ácido húmico) apresentou maior atividade nas raízes de trevo nas duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) (Figura 22 E e F).

Nas raízes de manjeriço roxo foram determinadas diferenças significativas nas atividades das P-H<sup>+</sup>-ATPases entre os tratamentos com ácido húmico na primeira avaliação (6 dias) sendo superior nas raízes submetidas ao tratamento com 20 mg L<sup>-1</sup> e a menor atividade determinada no tratamento controle (sem AH) (20 > 10 mg C L<sup>-1</sup> > controle sem AH). Nos tratamentos com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> também foram determinadas diferenças estatísticas, sendo superiores no tratamento com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em todas as concentrações de ácido húmico (Figura 22 A).

Nas raízes de trevo, a atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases apresentou diferenças significativas tanto para os tratamentos com ácido húmico como para N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na primeira avaliação (6 dias). As raízes submetidas aos tratamentos com ácido húmico apresentaram atividade superior ao tratamento controle (sem AH) e o tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> foi superior ao tratamento com 10 mg C L<sup>-1</sup> (20 > 10 > controle sem AH). As raízes submetidas ao tratamento com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> também apresentaram atividades das P-H<sup>+</sup>-ATPases superiores estatisticamente em todas as concentrações de ácido húmico (10, 20 mg C L<sup>-1</sup>) e controle (sem AH). A interação do ácido húmico com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi significativa apresentando diferenças entre todos os tratamentos, exceto o tratamento controle (sem AH) a 5,0 mmol L<sup>-1</sup> e o tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> a 0,5 mmol L<sup>-1</sup> que não diferiram estatisticamente (Figura 22 B).

Nas raízes de manjeriço, na segunda avaliação (9 dias), o tratamento com 10 mg C L<sup>-1</sup> apresentou atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases superior aos demais tratamentos (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) mas apenas nas raízes submetidas aos tratamentos com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 22 C). Nos tratamentos com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não foram determinadas diferenças estatísticas. Nas raízes de trevo, segunda avaliação, foram determinadas atividades inversas das P-H<sup>+</sup>-ATPases determinada na primeira avaliação (6 dias), sendo que os maiores valores foram encontrados no tratamento controle (sem AH) nas duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>), mas não diferindo apenas do tratamento com a combinação de 10 mg C L<sup>-1</sup> e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.



**Figura 22.** Atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjerição (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 3.

As raízes de trevo submetidas aos tratamentos com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram significativamente superiores aos tratamentos com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas combinações com ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup>) mas não apresentando diferenças significativas nas raízes submetidas ao tratamento controle (sem AH), este fato pode ser em decorrência da alta atividade determinada na primeira avaliação e conseqüentemente, pode ter resultado em acúmulo de nutrientes, não sendo necessário grande gasto de energia (ATP) nesta época da avaliação. As interações do ácido húmico com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram significativas entre os

tratamentos, onde os tratamentos controle (sem AH) nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  juntamente com o tratamento da combinação de  $10 \text{ mg C L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  foram superiores aos demais tratamentos ( $20 \text{ mg C L}^{-1}$  nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  e ao tratamento com  $10 \text{ mg C L}^{-1}$  na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ ).

Na terceira avaliação (15 dias) não foram determinadas diferenças significativas nas raízes de manjeriço quanto à atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases entre os tratamentos com ácido húmico ( $10, 20 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) e  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (Figura 22 E). Nas raízes de trevo, também não foram determinadas diferenças quanto à atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases porém, ambas as raízes apresentaram comportamento inverso à atividade determinada na primeira avaliação e similar à determinada na segunda avaliação, mas em escala inferior nas atividades determinadas nas duas avaliações anteriores (Figura 22 E e F).

Foi determinada uma baixa atividade das  $\text{V-H}^+$ -ATPases em todos os períodos (Figura 23) sendo superior na primeira avaliação nas duas raízes estudadas (Figura 23 A e B) e atividades muito baixas foram determinadas na segunda (Figura 23 C e D) e na terceira avaliações (9 e 15 dias respectivamente) (Figura 23 E e F). Nas raízes de manjeriço roxo foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos na primeira avaliação (6 dias), sendo superior nos tratamentos com a concentração de  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  em ambas as concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e sendo determinadas diferenças estatísticas entre as duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  apenas no tratamento com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$ , sendo superior na concentração com  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 23 A).

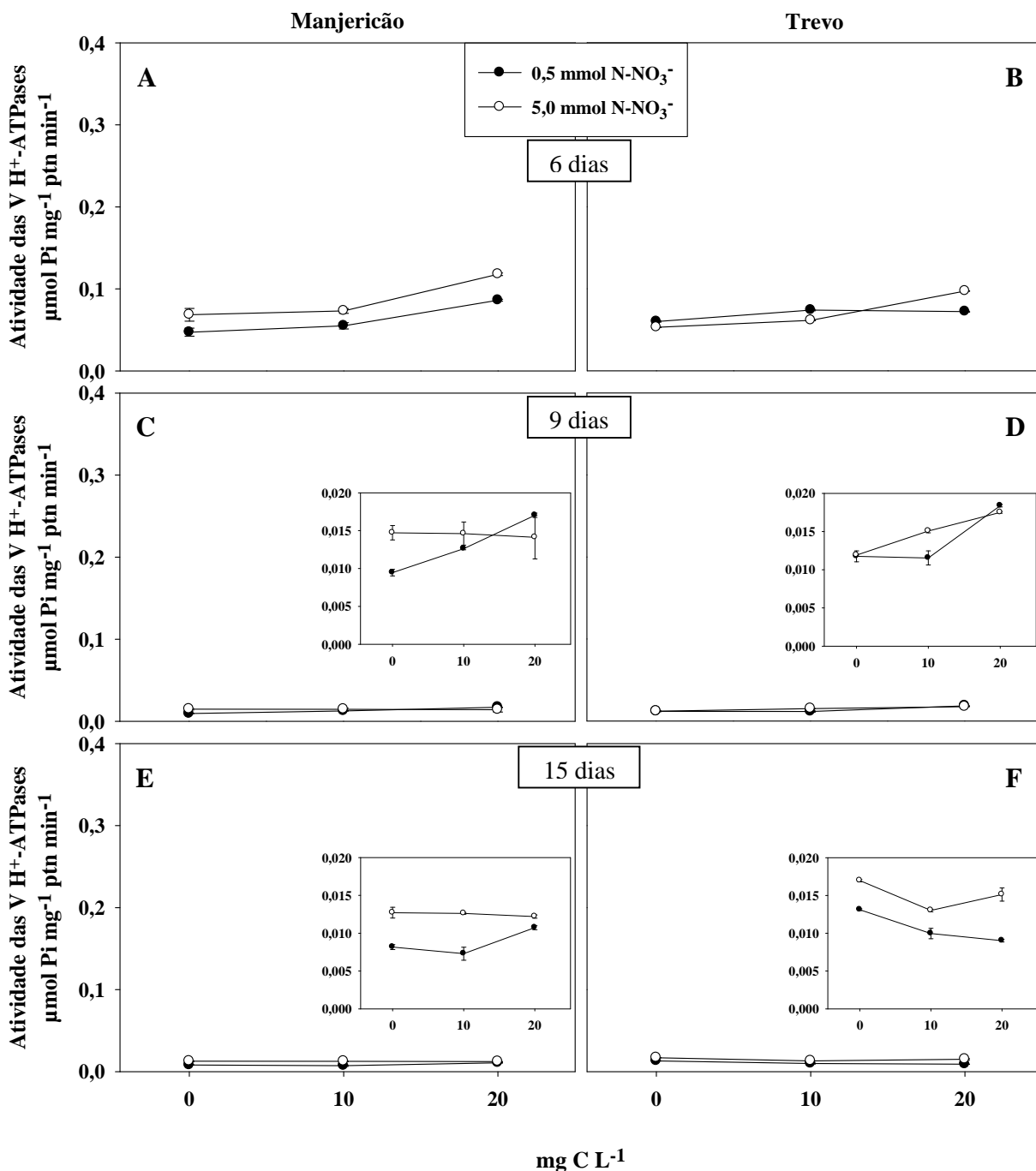
Nas raízes de trevo, na primeira avaliação (6 dias), foram determinadas diferenças significativas na atividade das  $\text{V-H}^+$ -ATPases apenas entre os tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  sendo que as raízes submetidas aos tratamentos na concentração com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  apresentaram atividade superior às demais concentrações de ácido húmico ( $10 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) (Figura 23 B).

Na segunda avaliação (9 dias) apenas o tratamento controle (sem AH) apresentou diferenças significativas entre as duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sendo superior na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Nos tratamentos com  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  foram determinadas diferenças estatísticas entre todos os tratamentos com ácido húmico (AH) sendo o tratamento com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  superior ao tratamento com  $10 \text{ mg C L}^{-1}$  que, por sua vez, foi superior ao tratamento controle (sem AH) nas raízes de manjeriço (Figura 23 C). Nos tratamentos com  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  não foram determinadas diferenças estatísticas entre os tratamentos com ácido húmico (Figura 23 C).

Na segunda avaliação (9 dias) foram determinadas diferenças estatísticas, nas raízes de trevo, entre os tratamentos com ácido húmico sendo superior a atividade determinada nos tratamentos com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). O tratamento com  $10 \text{ mg C L}^{-1}$  na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  também apresentou atividade superior ao tratamento controle (sem AH). Também foram determinadas diferenças estatísticas entre os tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) apenas entre os tratamentos submetidos à concentração de  $10 \text{ mg C L}^{-1}$ , sendo superior nos tratamentos com  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ .

Na terceira avaliação (15 dias) apenas o tratamento com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  não apresentou diferença significativas entre as duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Nas demais concentrações de ácido húmico ( $10 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle sem ácido húmico) nas raízes de manjeriço submetidas aos tratamentos com as concentrações de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  foram estatisticamente superiores à concentração de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 23 E). Na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  não foram determinadas diferenças estatísticas entre os tratamentos com ácido húmico ( $10, 20 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) quanto a atividade das  $\text{V-H}^+$ -ATPases. Na concentração de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{N-NO}_3^-$ , o tratamento com

20 mg C L<sup>-1</sup> foi estatisticamente superior aos demais tratamentos com ácido húmico (10 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) (Figura 23 E).



**Figura 23.** Atividade das V-H<sup>+</sup>-ATPases (µmolPi mg<sup>-1</sup>ptn min<sup>-1</sup>) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle). Detalhes nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 3.

Na terceira avaliação (15 dias) foram determinadas diferenças significativas, nas raízes de trevo, entre as duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) sendo sempre superior na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em todos os tratamentos com ácido húmico (Figura 23 F).

Entre os tratamentos com AH, o tratamento controle foi o que apresentou as maiores atividades nas duas concentrações de nitrato (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Figura 23 F).

Entre as duas raízes estudadas, manjeriço e trevo, não foram determinadas diferenças significativas na atividade das V-H<sup>+</sup>-ATPases entre os períodos avaliados (6, 9 e 15 dias) em nenhum tratamento de ácido húmico e os de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as quais as raízes foram submetidas.

A atividade das H<sup>+</sup>-PPases foram baixas em todos os períodos (Figura 24) quando comparadas com as atividades das P-H<sup>+</sup>-ATPases e as V-H<sup>+</sup>-ATPases (Figura 22 e Figura 23) em todos os períodos de avaliação (6, 9 e 15 dias).

Nas raízes de manjeriço foram determinadas diferenças significativas, na atividade das H<sup>+</sup>-PPases, na primeira avaliação (6 dias) entre os tratamentos com ácido húmico (AH) sendo superior na concentração de 20 mg C L<sup>-1</sup> nas duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) e nas demais concentrações de AH não foram determinadas diferenças estatísticas. Nos tratamentos com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não foram determinadas diferenças estatísticas entre as concentrações de AH (Figura 24 A).

Nas raízes de trevo foram determinadas diferenças estatísticas entre os tratamentos com ácido húmico sendo superior nas raízes submetidas aos tratamentos controle (sem AH) e com 10 mg C L<sup>-1</sup> na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e superiores na concentração de 20 mg C L<sup>-1</sup> na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente (Figura 24 B).

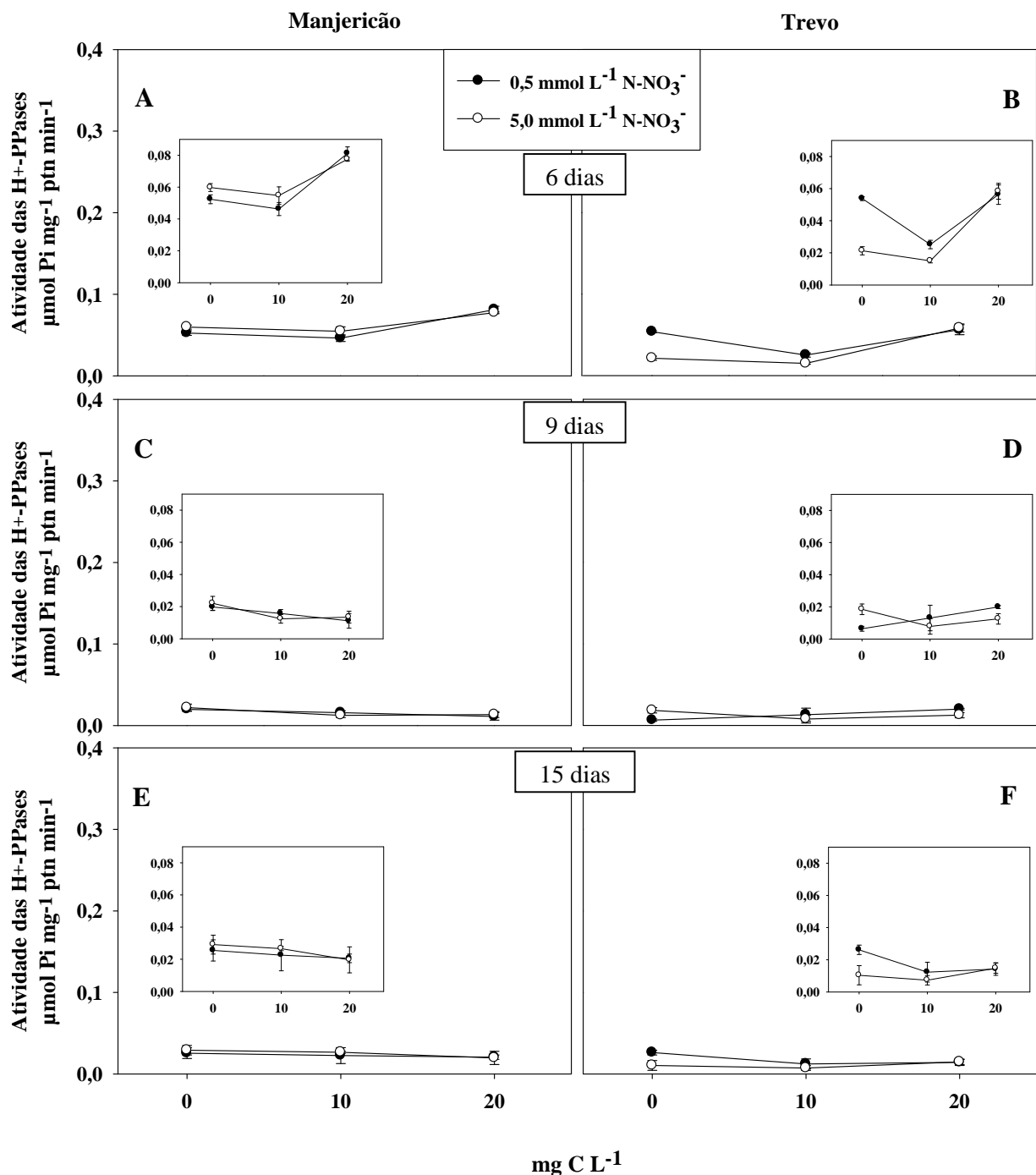
Na segunda avaliação (9 dias) não houve diferenças na atividade das H<sup>+</sup>-PPases nas raízes de manjeriço e trevo submetidos aos tratamentos com ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) e com nitrato (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Aos 15 dias foram determinadas diferenças significativas entre os tratamentos as quais as raízes foram submetidas apenas nos tratamentos de ácido húmico na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> sendo superior para o tratamento controle (sem AH) nas raízes de trevo (Figura 24 F). Nos demais tratamentos não houve diferenças nas atividades das H<sup>+</sup>-PPases nas raízes de manjeriço e trevo (Figura 24 E e F).

Como as H<sup>+</sup>-PPases são frequentemente denominadas como bombas de prótons (H<sup>+</sup>) auxiliares às V-H<sup>+</sup>-ATPases quando o suprimento energético das células está baixo, os resultados obtidos confirma esta hipótese nas duas raízes quando comparados com os teores de açúcares solúveis no interior das células (Figura 23 e Figura 24).

Na avaliação dos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (μmoles de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> de massa fresca) nas raízes de manjeriço e trevo (Figura 25) foi observado um aumento nos teores no decorrer das avaliações em ambas as raízes.

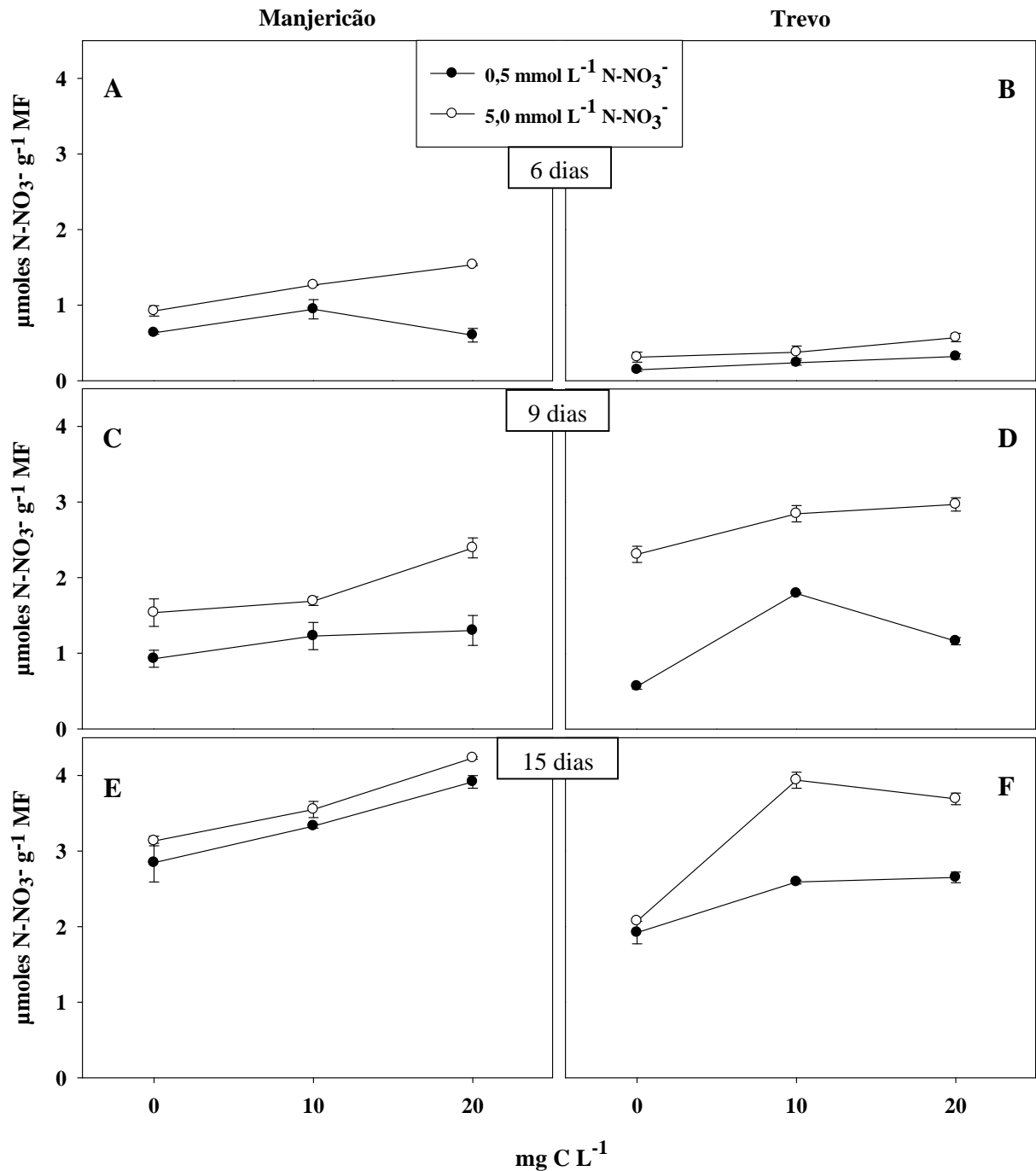
Na primeira avaliação (6 dias), nas raízes de manjeriço, foram determinados os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nos tratamentos com ácido húmico, sendo superiores nas raízes submetidas ao tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup>, combinados com as concentrações 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Nos tratamentos com AH combinados com as concentrações de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram determinados os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no tratamento com 10 mg C L<sup>-1</sup> e não ocorrendo diferenças estatísticas nos demais tratamentos (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) (Figura 25 A). Nas raízes de trevo não foram determinadas diferenças entre os teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes submetidas aos diferentes tratamentos com ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) e nitrato (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) mas foi observado um incremento nos seus teores à medida que aumentaram as concentrações de AH e de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 25 B).



**Figura 24.** Atividade das H<sup>+</sup>-PPases ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjerição (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Detalhes nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ .

Na segunda avaliação (9 dias), nas raízes de manjerição, o tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  apresentou os maiores teores de  $\text{N-NO}_3^-$  na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  e não sendo determinadas diferenças aos demais tratamentos com ácido húmico (10  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 25 C). Os maiores teores de  $\text{N-NO}_3^-$  foram obtidos com 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  sendo este comportamento também determinado nas raízes de trevo

(Figura 25 D). Nas raízes de trevo foram determinadas diferenças significativas entre os tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$ , sendo superiores os teores determinados na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  em todas as concentrações de ácido húmico (10 e  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle sem AH). Nos tratamentos com  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  foram determinados os maiores teores de  $\text{N-NO}_3^-$  nas concentrações com  $10 \text{ mg C L}^{-1}$  seguido pelo tratamento com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$ .



**Figura 25.** Teores de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\mu\text{moles de N-NO}_3^- \text{ g}^{-1}$  de massa fresca) nas raízes transformadas de manjerição (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10;  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ .



Na terceira avaliação, nas raízes de manjeriço, foram determinados os teores de  $\text{N-NO}_3^-$ , lineares crescentes, entre os tratamentos com ácido húmico nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  mas não sendo determinadas diferenças entre os tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) na mesma concentração com ácido húmico (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) (Figura 25 E). Nas raízes de trevo os teores de  $\text{N-NO}_3^-$  foram superiores nos tratamentos com 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  em todas as concentrações AH, exceto no tratamento controle (sem AH) que não foram determinadas diferenças estatísticas (Figura 25 F).

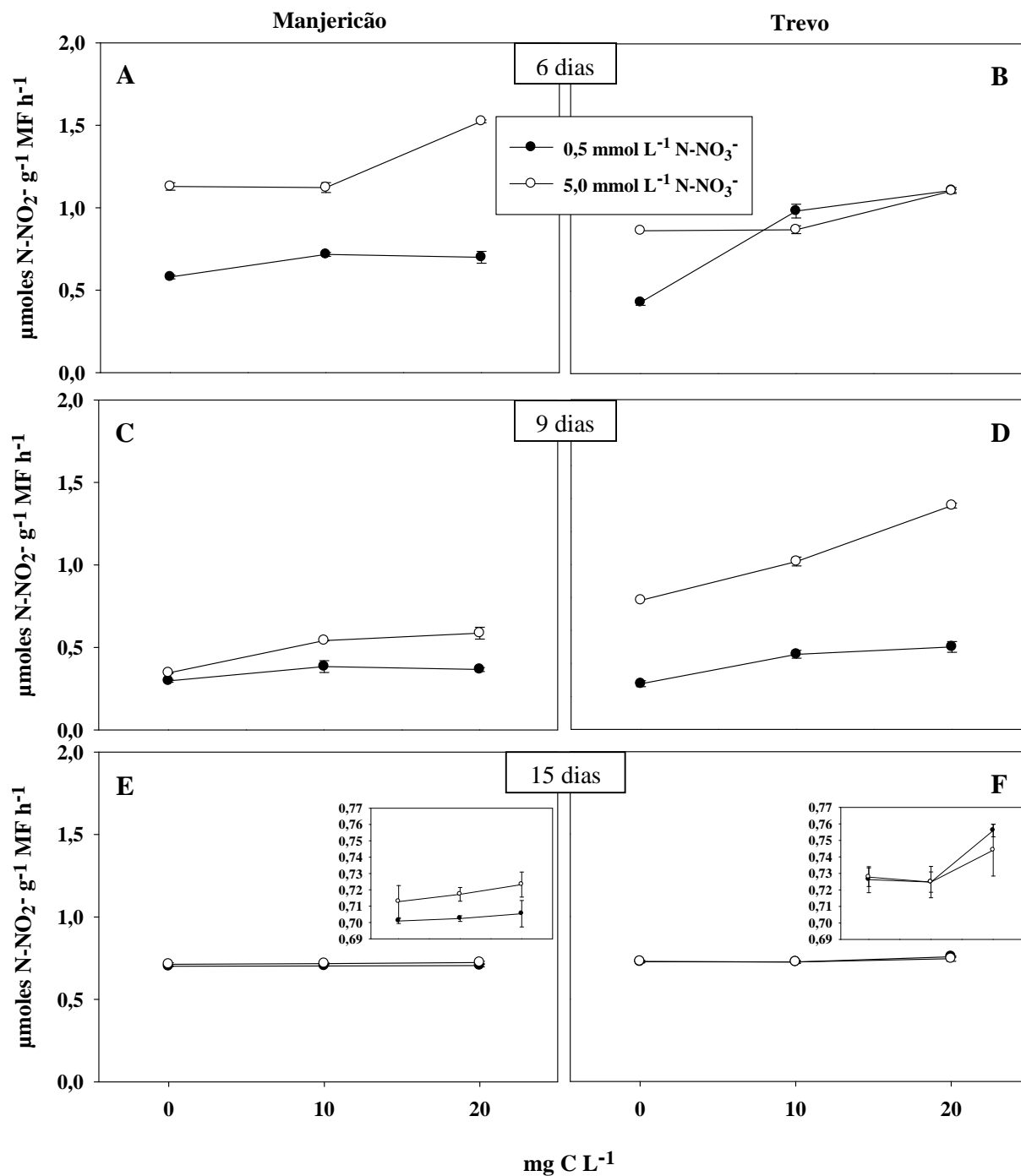
Houve diferenças entre os períodos avaliados nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) sendo os maiores teores determinados aos 15 dias (terceira avaliação), e os menores teores foram determinados aos 6 dias (primeira avaliação) nas raízes de manjeriço (Figura 25 A, C e E) sendo também observado o mesmo comportamento nas raízes de trevo (Figura 25 B, D e F). Os maiores teores de nitrato nas raízes de trevo na segunda avaliação (9 dias), quando comparado às raízes de manjeriço na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ , pode ter sido uma resposta de adaptação das raízes aos tratamentos as quais foram submetidas, acarretando em maior absorção de nitrato para atender as exigências metabólicas, como pode ser observado na atividade da nitrato redutase (Figura 26) onde os altos teores de nitrato nas raízes de trevo aos 9 dias resultou numa ativação proporcional à quantidade de nitrato disponível, e não resultando em acúmulo de nitrato nas raízes submetidas à concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ .

Nas raízes de manjeriço, os teores de  $\text{N-NO}_3^-$  determinados foram aumentando, quase que linearmente, no decorrer das avaliações e os maiores teores foram observados nas raízes submetidas aos tratamentos com 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ . Estes aumentos nos teores podem ser decorrentes da alta atividade das  $\text{P-H}^+$ -ATPases nas primeiras avaliações (Figura 22 A e C) resultando em acúmulo do nitrato nos vacúolos, da alta quantidade absorvida pelas raízes, para futura remobilização e uso. Também pode ter resultado numa maior ativação das  $\text{V-H}^+$ -ATPases na primeira avaliação (6 dias) (Figura 23 A) para manter o controle de cargas no interior do vacúolo, que tendem a ficar muito eletrogênicos com a entrada de grandes quantidades de  $\text{NO}_3^-$  (RATAJCZAK, 2000).

Aos 6 dias a atividade das  $\text{V-H}^+$ -ATPases nas raízes de manjeriço foram maiores nos tratamentos com 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  em todas as concentrações de ácido húmico (AH), indicando atividades dessas bombas para acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  no vacúolo (Figura 23 e Figura 25).

Nas raízes de manjeriço e trevo (Figura 26 A e B) foram determinadas altas atividades na primeira avaliação (6 dias) em ambas as raízes (manjeriço e trevo) (Figura 26 A e B), e diminuindo no decorrer das avaliações, exceto na segunda avaliação (9 dias) nas raízes de trevo submetidas aos tratamentos com 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 26 D).

Na primeira avaliação foram determinadas diferenças significativas na atividade da NR nas raízes de manjeriço submetidas aos tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ ), sendo superiores na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em todas as concentrações de ácido húmico (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH). A atividade da NR nas raízes submetidas aos tratamentos com ácido húmico também apresentaram diferenças entre as concentrações de nitrato (0,5 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ ) sendo mais expressiva no tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ . Os demais tratamentos com AH não apresentaram diferenças na atividade da NR quando comparados na mesma concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 26 A).



**Figura 26.** Atividade da nitrato redutase ( $\mu\text{moles N-NO}_2^- \text{ g}^{-1}$  massa fresca  $\text{h}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjericão (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Detalhes nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ .

Nas raízes de trevo foram determinadas diferenças na atividade da NR, sendo superiores nos tratamentos com ácido húmico (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$ ) quando comparados ao tratamento controle (sem AH) na concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 26 B). Nos tratamentos com AH na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  não foram determinadas diferenças estatísticas. Entre os tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) foram

determinadas diferenças estatísticas na atividade da NR apenas nos tratamentos controle (sem AH) sendo as maiores atividades determinadas nas raízes submetidas aos tratamentos com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 26 B).

Na segunda avaliação foram determinadas diferenças na atividade da NR, nas raízes de manjeriço, entre os tratamentos com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sendo superiores nas concentrações de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> determinados nos tratamentos com AH (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup>), entre os tratamentos controles (sem AH) não foram determinadas diferenças entre as duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) (Figura 26 C). Nas avaliações das atividades da NR nas raízes submetidas aos tratamentos com ácido húmico (AH) não foram determinadas diferenças nas atividades nas raízes entre as concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) (Figura 26 C).

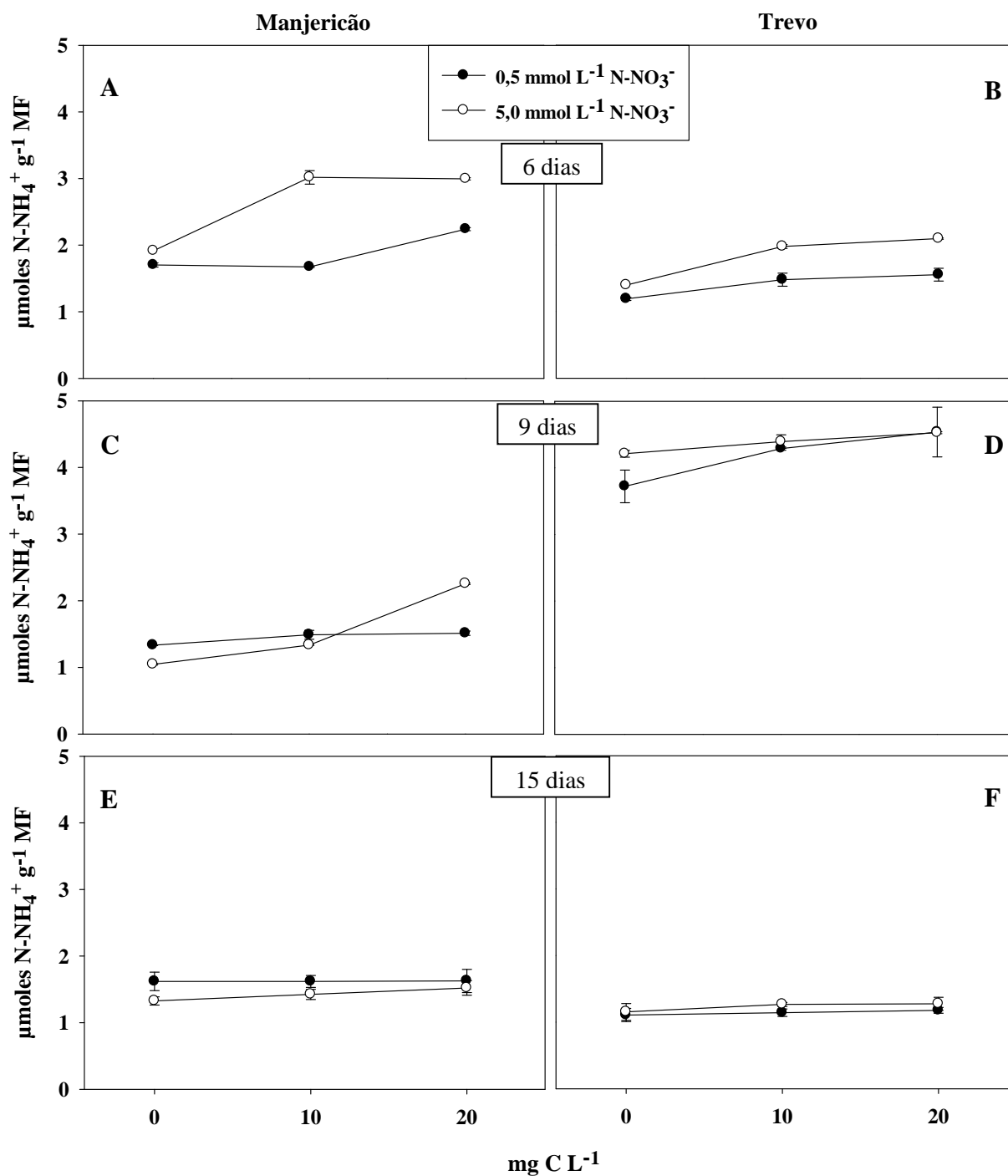
Nas raízes de trevo, as maiores atividades da NR foram determinadas nos tratamentos com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, quando comparados aos tratamentos com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> em todas as concentrações de AH (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) (Figura 26 D). Nas raízes foram determinadas as maiores atividades da NR nos tratamentos com ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup>) em ambas as concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>). Nos tratamentos com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as atividades da NR não apresentaram diferenças entre as concentrações de 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup>, mas ambos foram superiores ao tratamento controle (sem AH). Nos tratamentos com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as maiores atividades foram determinadas nas concentrações de 20 mg C L<sup>-1</sup> e as menores atividades determinadas no tratamento controle (sem AH) (20 > 10 > controle) (Figura 26 D).

Na terceira avaliação (15 dias), foram determinadas as atividades mais homogêneas da NR entre os três períodos avaliados e nas duas raízes estudadas (Figura 26 E e F) não sendo influenciados, significativamente, pelos tratamentos com ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) e pelas concentrações de nitrato (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>), este fato pode ser em decorrência de uma regularização nas taxas de redução do nitrato a nitrito e depois a amônio (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) uma vez que as teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> estejam normalizados no interior das células, e depois que o nitrogênio esteja na forma de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) deve ser rapidamente assimilado, ou seja, incorporado a algum esqueleto de carbono.

Os maiores teores de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (μmoles N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca) foram determinados os maiores teores na primeira avaliação (6 dias) em ambas as raízes (Figura 27 A e B), ocorrendo uma pequena diminuição nos teores com o decorrer das avaliações, exceto para as raízes de trevo na segunda avaliação (9 dias) nas quais foram encontradas os maiores teores entre as avaliações realizadas. Estes altos teores podem estar relacionados com os altos teores determinados de nitrato (Figura 25) e com a atividade da nitrato redutase (NR) (Figura 26).

Na primeira avaliação (6 dias), foram determinadas diferenças significativas nos teores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, tanto nas raízes de manjeriço como nas raízes de trevo, quando submetidas aos tratamentos com ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup>) foram superiores ao tratamento controle (sem AH) na concentração de 5,0 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 27 A e B). Na concentração de 0,5 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o tratamento controle apresentou teores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> inferiores apenas ao tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup>. Nos tratamentos com ácido húmico, as concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, foram superiores nos tratamentos com 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> na concentração de 5,0 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Nos tratamentos controles (sem AH) não foram determinadas diferenças nos teores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> entre as duas concentrações de nitrato (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) nas raízes de manjeriço e trevo estudadas (Figura 27 A e B).

Houve diferenças nos teores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> entre as duas raízes no primeiro período de avaliação, sendo superiores nas raízes de manjeriço que foram submetidas aos tratamentos com ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup>) na concentração de 5,0 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Nos tratamentos com 0,5 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apenas o tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> apresentou diferenças estatísticas, sendo superior também nas raízes de manjeriço.



**Figura 27.** Teores de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\mu\text{moles N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$  massa fresca) nas raízes transformadas de manjerição (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 3$ .

Na segunda avaliação (9 dias) foram determinadas diferenças significativas entre os tratamentos com ácido húmico (10, 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) nas raízes de manjerição, sendo superior no tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  na concentração de 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ . Na concentração de 0,5  $\text{mmoles L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  não foram determinadas diferenças entre os tratamentos com ácido húmico. Nas raízes de trevo, foram determinadas e nem entre os

tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ). Nas raízes não foram determinadas diferenças estatísticas entre os tratamentos com ácido húmico (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) (Figura 27 C) e nem entre as concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ) (Figura 27 D).

Na terceira avaliação não foram determinadas diferenças dos teores de  $\text{NH}_4^+$  entre os tratamentos com ácido húmico e nitrato entre as raízes de manjeriço e trevo estudadas, sendo determinada uma homogeneidade dos teores de  $\text{NH}_4^+$  o qual representaria a taxa de atividade de redução do nitrato em amônio para o crescimento das raízes estudadas (Figura 27 E e F).

Houve diferenças entre as duas raízes no segundo período de avaliação, sendo superiores nas raízes de trevo em todos os tratamentos com ácido húmico (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) e nas concentrações com  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmoles L}^{-1}$ ).

Nos teores de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles de açúcares solúveis g}^{-1}$  massa fresca) (Figura 28) foram observado, praticamente, o mesmo comportamento das atividades da nitrato redutase (NR) (Figura 26), dos teores de  $\text{N-NH}_4^+$  (Figura 27), dos teores de N-amino livres (Figura 29) e da atividade da enzima glutamina sintetase (GS) (Figura 30).

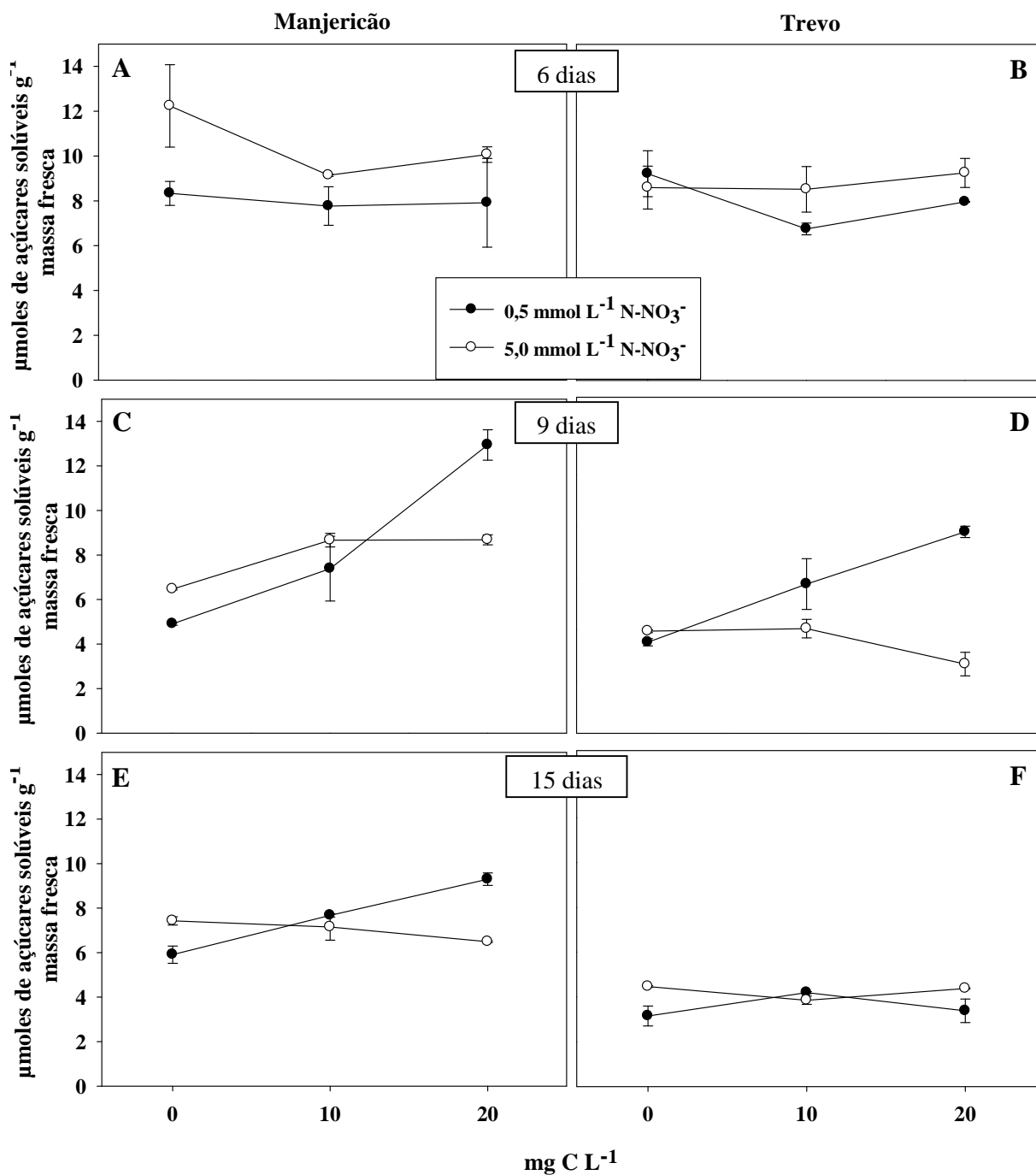
Na primeira avaliação (6 dias) foram determinados os maiores teores de açúcares solúveis, nas raízes de manjeriço, nos tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  quando comparado à concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$ , em todas as concentrações de ácido húmico, exceto no tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  que não apresentou diferenças nos teores de açúcares solúveis entre as concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$ . Nos tratamentos com ácido húmico, apenas o tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  foi superior aos demais tratamentos com ácido húmico (10  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ , e não sendo determinadas diferenças entre os tratamentos com ácido húmico na concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 28 A).

Nas raízes de trevo foram determinadas diferenças entre os teores de açúcares solúveis nas raízes submetidas aos tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) sendo os maiores teores determinados na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  nos tratamentos com ácido húmico com 10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e não sendo observado diferenças nos tratamentos controle (sem AH) entre as concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 28 B). Nas raízes de trevo, submetidas aos tratamentos com ácido húmico, foram determinados os maiores teores de açúcares solúveis no tratamento controle (sem AH) na concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ . Nas raízes crescidas na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  não foram determinadas diferenças nos teores de açúcares solúveis entre os tratamentos com ácido húmico (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) (Figura 28 B). Na segunda avaliação (9 dias), as raízes responderam significativamente, linear crescente, aos tratamentos com ácido húmico na concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ , em ambas as raízes.

Nas raízes de manjeriço foram determinadas diferenças nos teores de açúcares solúveis entre os tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  sendo superiores no tratamento controle na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , e no tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$  na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , respectivamente. Nos tratamentos com 10  $\text{mg C L}^{-1}$  não foram determinadas diferenças entre as concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) (Figura 28 C). Também foram determinadas diferenças entre os tratamentos com ácido húmico na concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ , sendo superior no tratamento com 20  $\text{mg C L}^{-1}$ , seguido do tratamento com 10  $\text{mg C L}^{-1}$  e o menores teores de açúcares solúveis foram determinados no tratamento controle (sem AH). Na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ , os tratamentos com ácido húmico (10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$ ) apresentaram os maiores teores de açúcares solúveis em relação ao tratamento controle (sem AH) (Figura 28 C).

Nas raízes de trevo, segunda avaliação (9 dias), foram determinadas diferenças nos teores de açúcares solúveis entre os tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  sendo superiores nos tratamentos com 10 e 20  $\text{mg C L}^{-1}$  na concentração de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ . Nos tratamentos controles (sem AH) não foram determinadas diferenças entre as concentrações de nitrato (0,5 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) (Figura 28 D). Também foram determinadas diferenças entre os tratamentos com ácido húmico

na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sendo superior no tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup>, seguido do tratamento com 10 mg C L<sup>-1</sup> e o menores teores de açúcares solúveis foram determinados no tratamento controle (sem AH), apresentando uma similaridade de comportamento às raízes de manjeriço submetidas à mesmas concentração de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 mmol L<sup>-1</sup>). Na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, os tratamentos controle (sem AH) e com 10 mg C L<sup>-1</sup> apresentaram teores de açúcares solúveis superiores aos determinados no tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> (Figura 28 D).



**Figura 28.** Teores de açúcares solúveis (μmoles de açúcares solúveis g<sup>-1</sup> massa fresca) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 3.

Aos 15 dias, os teores de açúcares solúveis apresentaram comportamentos inversos nas raízes de manjeriço, quando submetidos às mesmas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$ . Na concentração de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  foram determinados teores crescentes de açúcares solúveis à medida que aumentava as concentrações de ácido húmico ( $20 \text{ mg} > 10 \text{ mg} > \text{controle}$ ) e na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  foram determinados comportamentos inversos, ou seja, à medida que aumentaram as concentrações de ácido húmico na solução os teores de açúcares solúveis decresceram ( $20 \text{ mg} < \text{controle}$ ) (Figura 28 E). Nos tratamentos com ácido húmico foram determinadas diferenças entre as concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$ , sendo os maiores teores determinados nos tratamentos controle na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , e no tratamento com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Nos tratamentos com  $10 \text{ mg C L}^{-1}$  não foram determinadas diferenças nos teores de açúcares solúveis entre as concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (Figura 28 F).

Nas raízes de trevo, houve diferenças apenas entre os tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$ , sendo os maiores teores de açúcares solúveis determinados nos tratamentos controle (sem AH) e com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$ . Entre os tratamentos com ácido húmico ( $10$  e  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) não foram determinadas diferenças quando submetidas às mesmas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (Figura 28 F).

As raízes utilizam os açúcares solúveis na redução do  $\text{NO}_3^-$ , assimilação do  $\text{NH}_4^+$  e, conseqüentemente, na produção de biomassa incorporando o N assimilado em tecido vegetal. A absorção de N é dependente da disponibilidade de energia (CRAWFORD, 1995) e os carboidratos solúveis são fonte de energia para a assimilação do N reduzido (SOUZA, 1995).

Foram determinados teores relativamente altos de N-amino livre ( $\mu\text{moles N-amino livre g}^{-1}$  massa fresca) (Figura 29) em todos os períodos de avaliação (6, 9 e 15 dias). Teores de N-amino elevados, normalmente, indicam situação de estresse nutricional ou ambiental para as plantas (FERNANDES e ROSSIELLO, 1995; FERNANDES, 1983). Entretanto, os teores determinados neste experimento não ultrapassaram  $10 \mu\text{mol g}^{-1}$  de massa fresca, não sendo, portanto, caracterizado como estresse.

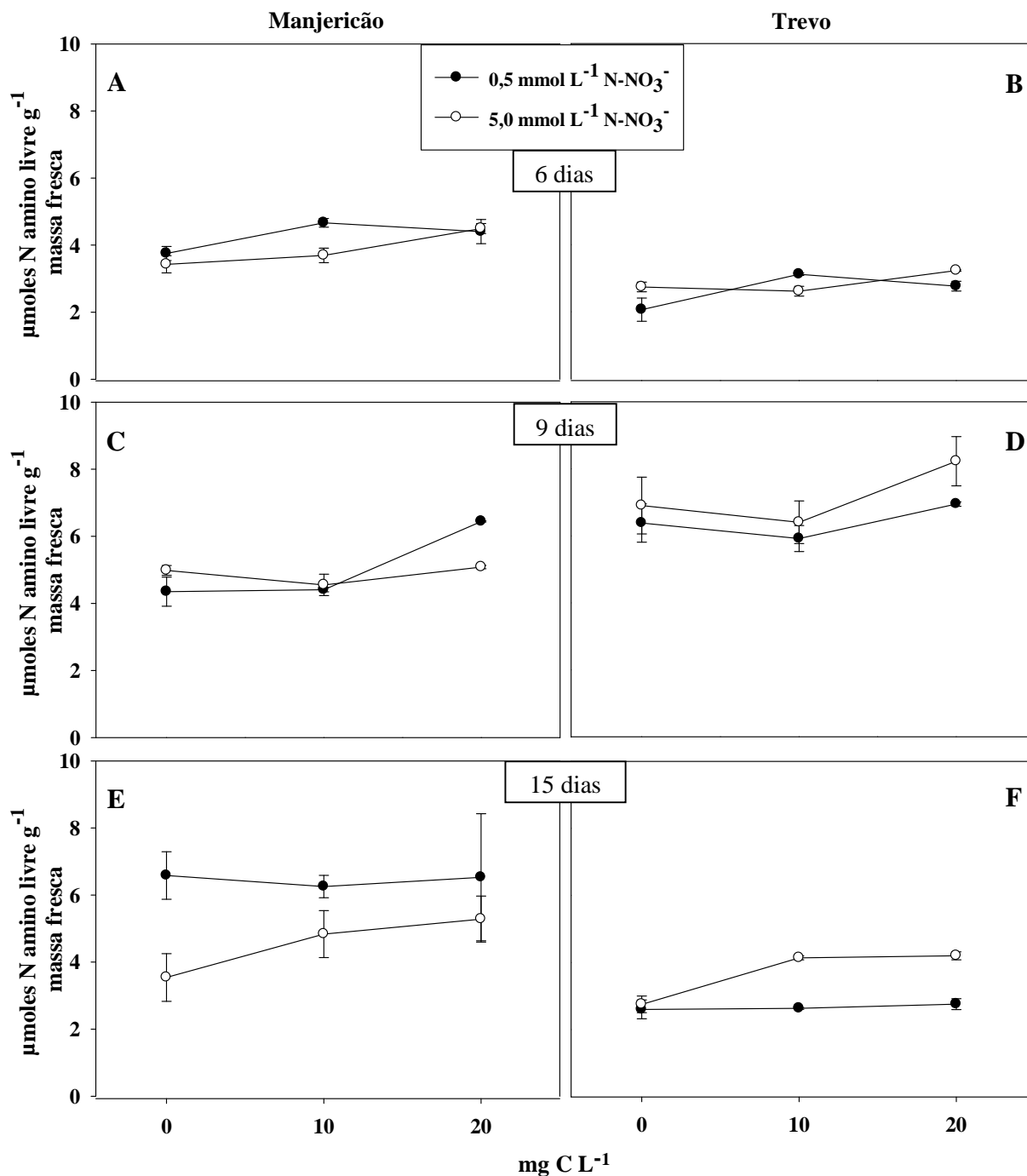
Na primeira avaliação, nas raízes de manjeriço, foram determinadas diferenças nos teores de N-amino livre entre as concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  apenas no tratamento com  $10 \text{ mg C L}^{-1}$  sendo superior na concentração de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ . Nos demais tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  e ácido húmico ( $10$  e  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) não foram determinadas diferenças estatísticas (Figura 29 A).

Nas raízes de trevo foram determinadas diferenças nos teores de N-amino livre apenas entre os tratamentos com ácido húmico na concentração de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ , sendo superiores no tratamento com  $10 \text{ mg C L}^{-1}$  que foram maiores apenas ao tratamento controle (sem AH) (Figura 29 B). Nos demais tratamentos com ácido húmico e  $\text{N-NO}_3^-$  não foram determinadas diferenças estatísticas nos teores de N-amino livre (Figura 29 B).

Na segunda avaliação (9 dias), nas raízes de manjeriço, foram determinadas diferenças nos teores de N-amino livre entre os tratamentos com ácido húmico, sendo superiores nos tratamentos com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  nas raízes submetidas às concentrações de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ . Nos demais tratamentos com ácido húmico não foram determinadas diferenças nos teores de N-amino livre nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (Figura 29 C).

Nas raízes de trevo foram determinadas diferenças nos teores de N-amino nos tratamentos com ácido húmico, sendo os tratamentos com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  superiores apenas ao tratamento com  $10 \text{ mg C L}^{-1}$ , em ambas as concentrações de nitrato ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Nos demais tratamentos com ácido húmico não foram determinadas diferenças nos teores de N-amino nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (Figura 29 D). Nos tratamentos com  $\text{N-NO}_3^-$  foram determinados os maiores teores de N-amino livre apenas no tratamento com  $20 \text{ mg C L}^{-1}$  na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , e não sendo determinadas

diferenças entre as demais concentrações de ácido húmico (10 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) nas duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) (Figura 29 D).



**Figura 29.** Teores de N-amino livre ( $\mu\text{moles N amino livre g}^{-1}$  massa fresca) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 3.

Aos 15 dias, nas raízes de manjeriço foram determinadas as maiores diferenças nos teores de N-amino livre entre as duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sendo os maiores teores determinados nas concentrações com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> nos tratamentos controles (sem AH) e com



10 mg C L<sup>-1</sup>. Nos tratamentos com 20 mg C L<sup>-1</sup> não foram determinadas diferenças entre as duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 29 E). Nos tratamentos com ácido húmico foram determinadas diferenças apenas na concentração com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, no qual o tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> foi superior ao tratamento controle, e não sendo determinado diferenças entre os demais tratamentos (Figura 29 E).

Nas raízes de trevo foram determinadas diferenças entre as concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sendo superiores nas concentrações de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> nos tratamentos com ácido húmico com 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> (Figura 29 F). Nos tratamentos com ácido húmico também foram determinadas diferenças entre os tratamentos com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sendo os tratamentos com 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> superiores ao tratamento controle (sem AH) na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não foram determinadas diferenças entre os tratamentos com ácido húmico quanto ao teor de N-amino livre (Figura 29 F).

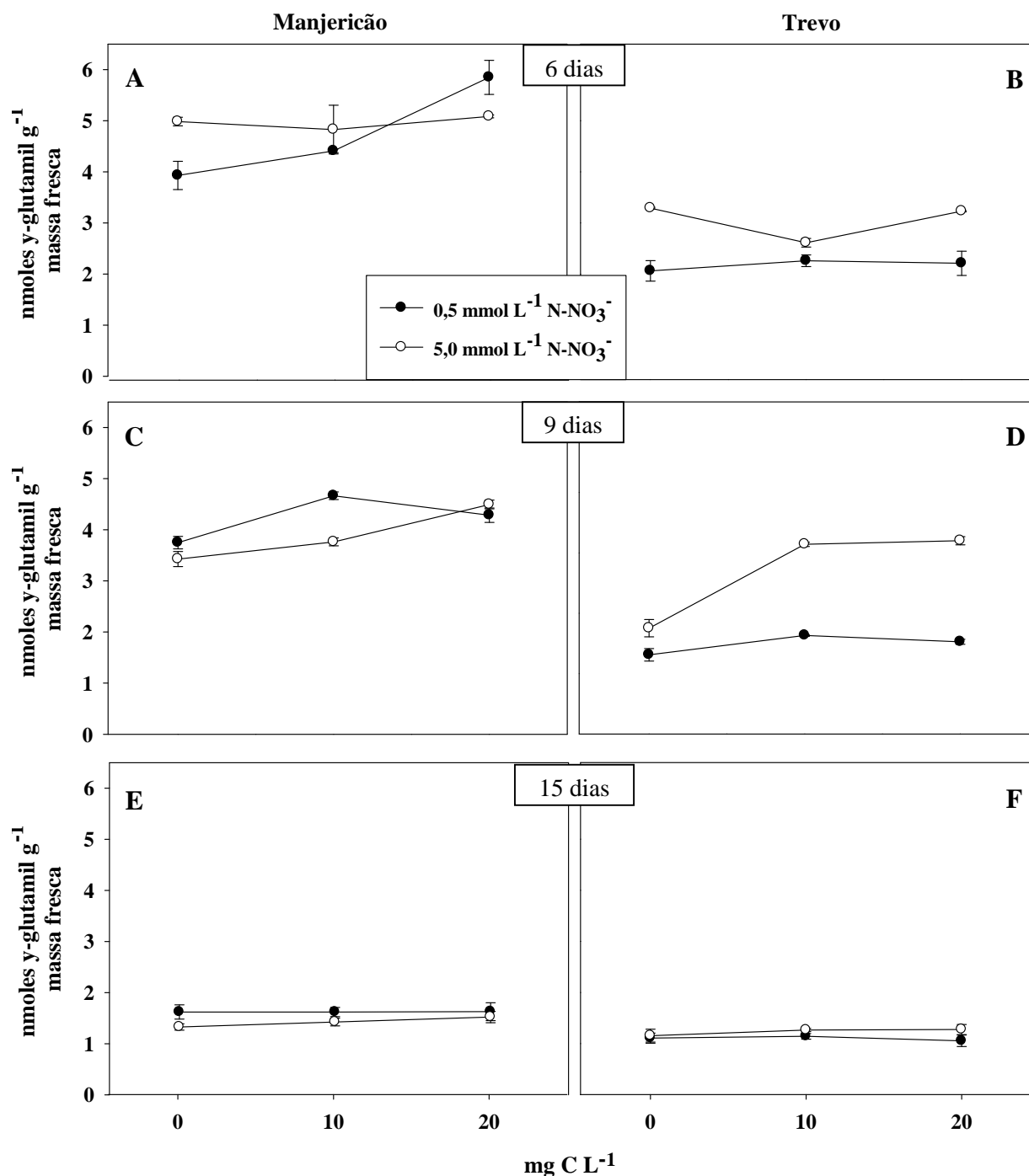
A atividade da glutamina sintetase (GS) é uma enzima limitante do crescimento e do uso do N nas plantas (LAM et al., 1995). Na atividade da GS (Figura 30), que é uma das vias responsáveis pela assimilação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, foram determinadas altas atividades desta enzima nas primeiras avaliações (6 e 9 dias) e uma atividade baixa e similar entre as duas raízes na terceira avaliação (15 dias) e em todos os tratamentos com ácido húmico (10, 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) e nitrato (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Na primeira avaliação (6 dias), nas raízes de manjeriço, foram determinadas diferenças entre as concentrações de nitrato nos tratamentos com ácido húmico, sendo superiores no controle (sem AH) na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e no tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup> na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente (Figura 30 A). Nos tratamentos com ácido húmico, nas raízes de manjeriço, foram determinadas diferenças entre as concentrações de nitrato. Nas concentrações com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as maiores atividades da GS foram determinadas nos tratamentos com 20 mg C L<sup>-1</sup>, nos demais tratamentos (controle sem AH e 10 mg C L<sup>-1</sup>) na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e todos os tratamentos com ácido húmico na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não foram determinadas diferenças estatísticas (Figura 30 A).

Nas raízes de trevo, os tratamentos controle (sem AH) e com 20 mg C L<sup>-1</sup> na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentaram atividades da GS superiores aos mesmos tratamentos na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 30 B). Nos tratamentos com ácido húmico, as concentrações de controle (sem AH) e com 20 mg C L<sup>-1</sup> apresentaram atividade da GS superiores à concentração com 10 mg C L<sup>-1</sup> no tratamento com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. No tratamento com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não foram determinadas diferenças na atividade da GS entre as concentrações com ácido húmico (Figura 30 B).

Na segunda avaliação (9 dias), nas raízes de manjeriço, foram determinadas diferenças entre as concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) apenas nos tratamentos com 10 mg C L<sup>-1</sup>, sendo superior na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e não sendo determinado diferenças nos demais tratamentos com ácidos húmico nas concentrações de nitrato (Figura 30 C). Nos tratamentos com ácido húmico apenas as concentrações de 10 mg C L<sup>-1</sup> e de 20 mg C L<sup>-1</sup> apresentaram as maiores atividades da GS nos tratamentos com 0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente (Figura 30 C).

Nas raízes de trevo, foram determinadas diferenças entre as concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, em todos os tratamentos com ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH), sendo superiores na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 30 D). Nos tratamentos com ácido húmico foram determinadas as maiores atividades da GS nos tratamentos com 10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não foram determinadas diferenças entre os tratamentos com ácido húmico (Figura 30 D).



**Figura 30.** Atividade da Glutamina Sintetase ( $\eta$ moles y-glutamyl  $g^{-1}$  massa fresca) nas raízes transformadas de manjerição (A, C e E) e trevo (B, D e F) aos seis (A e B), nove (C e D) e 15 dias (E e F) após a repicagem para a solução de cultivo contendo os tratamentos com ácido húmico (10; 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 3.

Na terceira avaliação (15 dias) não foram determinadas diferenças nas atividades da GS entre os tratamentos de ácido húmico (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) e nas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) em ambas as raízes estudadas (manjerição e trevo) (Figura 30 E e F).

#### 4. CONCLUSÕES

As raízes transformadas de manjeriçã e trevo apresentaram maiores influências da interação do ácido húmico com nitrato (AH - N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) nas avaliações aos seis dias, para todas as avaliações realizadas, resultando em maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-amino livre nas células vegetais nas avaliações seguintes (9 e 15 dias).

As raízes submetidas aos tratamentos com ácidos húmicos (10 e 20 mg C L<sup>-1</sup>), nas duas concentrações de nitrogênio em solução (0,5 e 5,0 mmols L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) apresentaram os maiores benefícios na atividade das bombas de prótons e no metabolismo do nitrogênio em todos os períodos de avaliação, confirmando a bioatividade dos ácidos húmicos.

As bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase) apresentaram, inicialmente, influências em suas atividades decorrente da influência da interação AH - N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no meio de cultivo das raízes, sendo mais significativas nas P-H<sup>+</sup>-ATPases, e apresentando uma significativa diminuição de atividade no decorrer das avaliações (9 e 15 dias).

## **CAPITULO VI**

### **INTERAÇÃO ÁCIDO HÚMICO - NITRATO - MICORRIZA ARBUSCULAR NA ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM RAÍZES TRANSFORMADAS DE MANJERICÃO E TREVO**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da interação do ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) - Nitrato (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) - micorriza arbuscular (*Glomus clarum*) na atividade das bombas de prótons e no metabolismo do nitrogênio em raízes transformadas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.) mantidas “*in vitro*” aos trinta dias após a repicagem. As raízes de manjeriço e trevo apresentaram atividades das P-H<sup>+</sup>-ATPases e das H<sup>+</sup>-PPases superiores nas raízes colonizadas por *Glomus clarum* (*G.cla*) quando comparadas com as raízes não colonizadas (ñ col.) sendo mais expressivas na presença do AH (20 mg C L<sup>-1</sup>). Esta superioridade na atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases pode ser em decorrência da transferência bidirecional, de nutrientes, carboidratos e água entre planta-fungo (FMA↔raízes), também apresentaram os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, maior atividade da nitrato redutase (NR) e os menores teores de açúcares solúveis, N-amino livre e atividade da Glutamina Sintetase (GS). Este comportamento pode ser decorrente da simbiose micorrízica que proporciona melhorias na absorção de nutrientes (alta atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases) porém requerem metabólitos elaborados das raízes para a sua formação e manutenção, justificando as altas atividades da NR, os altos teores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e os baixos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Os altos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes de manjeriço e trevo podem ser em decorrência da capacidade que as hifas micorrízicas têm de aumentar a absorção de N e o transportar para a planta devido ao aumento da área de superfície de contato. Estes resultados sugerem que, na presença de grandes quantidades de ácido húmico na solução, a rota preferencial para a assimilação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes colonizadas por *Glomus clarum* não seja a via da GS. As associações micorrízicas foram mais expressivas nos tratamentos submetido a baixas concentrações de nitrogênio (0,5 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) associado aos tratamentos com ácidos húmicos (20 mg C L<sup>-1</sup>) e que os tratamentos com 5,0 mmoles L<sup>-1</sup> apresentaram as menores taxas de colonização radicular, o que pode ser considerado um efeito inibidor para as associações micorrízicas.

**Palavras chave:** H<sup>+</sup>-ATPases. Nutrição mineral. Simbiose.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of the interaction between humic acid (20 mg C L<sup>-1</sup> and control without AH) - Nitrate (0.5 and 5.0 mmol L<sup>-1</sup>) - mycorrhiza arbuscular (*Glomus clarum*) in the activity of the protons pumps and in the nitrogen metabolism in transformed roots of basil (*Ocimum basilicum* L.) and clover (*Trifolium repens* L.). They were sampled after thirty days of growth. The basil roots and clover presented activities of P-H<sup>+</sup>-ATPases and H<sup>+</sup>-PPases of high in the roots colonized by *Glomus clarum* (*G.cla*) when not compared with the roots colonized (ñ col.) being more expressive in the presence of HA (20 mg C L<sup>-1</sup>). This superiority in P-H<sup>+</sup>-ATPases activity can be due to the bi-directional transfer, of nutrients, carbohydrates and water among plant-fungi (FMA↔roots), they also presented the largest tenors of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, larger activity of the nitrate reductase (RN) and the smallest tenors of soluble sugars, N-amino free and activity of Glutamine Sintetase (GS). This behavior can be due to the micorrhizal symbiosis which provides improvements in the absorption of nutrients (high activity of P-H<sup>+</sup>-ATPases). However they request elaborated metabolites of the roots for your formation and maintenance, justifying the activities of RN, the high levels of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and low of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The high levels of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the basil roots and clover they can be due to the capacity that the micorrhizal hyphae have to increase the absorption of N and transporting to the plant due to the increase of the area of contact surface. These results suggest that, in the presence of great amounts of humic acid in solution, the preferential route for the assimilation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in roots colonized by *Glomus clarum* is not the GS. The micorrhiziae were more expressive in treatments submitted to low concentrations of nitrogen (0.5 mmoles L<sup>-1</sup> of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) associated to treatments with humics acids (20 mg C L<sup>-1</sup>). Treatments with 5.0 mmoles L<sup>-1</sup> had the smallest rates of colonization.

**Key Words:** H<sup>+</sup>-ATPases. Mineral nutrition. Symbiosis.

## 1. INTRODUÇÃO

A filosofia e a prática da agricultura estão mudando de um enfoque convencional para uma abordagem sustentável. Os sistemas agrícolas sustentáveis são caracterizados pela reduzida inserção de insumos sintéticos e um aumento considerável de informações relacionadas com práticas conservacionistas. Esta mudança de pensamento foi decorrente de que, a partir da segunda metade do século XX, a fertilidade dos sistemas agrícolas foi considerada, principalmente como a capacidade do solo de fornecer nutrientes às plantas em quantidades satisfatórias. O balanço negativo da equação entre o estoque de nutrientes no solo e a necessidade das culturas deveria ser suprido com a adição de fertilizantes minerais, e ficou conhecida como Revolução Verde que, manejada incorretamente, acarretou sérios problemas de degradação ambiental. Dentre os elementos minerais essenciais para o desenvolvimento dos vegetais, o nitrogênio ocupa posição de destaque. Por ser requerido em maiores quantidades e apresentarem alta mobilidade no solo o torna um dos nutrientes mais limitantes e que devem ser repostos em maiores quantidades para a produtividade da maioria das culturas (CANTARELLA et al., 2008; SOUZA & FERNANDES, 2006; WILLIAMS & MILLER, 2001)

Com ênfase nesta visão, alguns trabalhos têm sido conduzidos utilizando a matéria orgânica como única fonte de nutrientes do solo e como promotora do desenvolvimento das plantas, juntamente a microrganismos benéficos do solo a fim de manter a produtividade vegetal sem prejuízo ao ambiente (BÜNEMANN et al., 2004; BACA et al., 1995). No solo o N está disponível em diversas formas, incluindo  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , aminoácidos, peptídeos solúveis e formas complexas insolúveis. Esta diversidade de formas é importante pela variedade de espécies de plantas que diferem entre si na preferência por fontes de N, absorvendo-o primariamente em formas inorgânicas como  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , via sistema radicular (WILLIAMS & MILLER, 2001) após a mineralização do N, oriundo de resíduos orgânicos do solo (ciclagem de nutrientes) (STEVENSON & COLE, 1999) que em sistemas naturais representa a fonte mais importante de N e que, apesar disso, a maior parte encontra-se em frações cuja mineralização é bastante lenta (BÜNEMANN et al., 2004).

A eficiência de absorção e utilização do N é otimizada pelos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em parte pela extensão do volume de solo explorado, através de sua rede micelial que pode se estender de nove a doze centímetros além da superfície explorada pelas raízes (CAMEL et al., 1991) e em parte, por modificações fisiológicas da planta ainda pouco estudadas (BERBARA et al., 1995). Evidências de alterações do metabolismo do fungo são dadas pela atividade e localização de  $\text{H}^+$ -ATPases (CAVENDER et al., 1999) que são afetadas positivamente pela ação das substâncias húmicas (NANNIPIERI et al., 1993). Este aumento da extrusão de prótons ( $\text{H}^+$ ), teoricamente, pode afetar também as hifas fúngicas, proporcionando um acréscimo em seu desenvolvimento e, conseqüentemente, uma maior taxa de colonização radicular e, conseqüentemente, melhorias na absorção de nutrientes e água para as plantas (RAMOS et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da interação do ácido húmico ( $20 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) - Nitrato ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) - micorriza arbuscular (*Glomus clarum*) na atividade das bombas de prótons e no metabolismo do nitrogênio em raízes transformadas de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.) aos trinta dias após a repicagem das raízes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a influência da interação ácido húmico - nitrogênio (nitrato) - micorrizas arbusculares (AH - N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - FMA) na atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase) e no metabolismo do nitrogênio (N), foram adicionadas diferentes concentrações de carbono (C) presente no ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) e de nitrogênio na forma de nitrato (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) na solução de cultivo (BÉCARD & FORTIN, 1988) de raízes transformadas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) (NICOMEDES JUNIOR, 2003) e trevo (*Trifolium repens* L.) (BERBARA, 1995) em simbiose com fungos micorrízicos *Glomus clarum* Nicolson & Schenck.

Os esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) *Glomus clarum* (*G.cla*) foram desinfestados superficialmente e distribuídos em placas Petri, 100 esporos placa<sup>-1</sup>, contendo solução Agar-água (Agar bacteriológico marca Oxoid nº 1, com 7,5 g L<sup>-1</sup>) e acondicionadas em câmaras termostáticas com temperatura controlada a 26 °C e na ausência da luz para aguardar a germinação dos esporos. A germinação dos esporos, que se caracteriza com a emissão de novas hifas, foi monitorada diariamente em lupa estereoscópica. Após a germinação, apenas um esporo germinado foi repicado juntamente com dois segmentos de cada raiz, manjeriço ou trevo, com aproximadamente cinco centímetros de comprimento cada uma, em placas Petri contendo meio mínimo (BÉCARD & FORTIN, 1988) com pH ajustado para 5,80 e enriquecido com as diferentes combinações de tratamentos com ácido húmico (AH) e nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). As coletas foram realizadas trinta dias após a repicagem (DAR).

O ácido húmico utilizado foi proveniente de uma rápida vermicompostagem, 70 dias, utilizando minhocas *Eisenia foetida*. Foi extraído conforme procedimento adotado pela sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS) descrito por SWIFT (1996) com adaptações de BENITES et al. (2003) e caracterizado quimicamente (DICK et al., 1999) e por espectroscopia de infra-vermelho com transformada de Fourier (IV-TF) (TAN, 1995; STEVENSON, 1994; STEVENSON & GOH, 1971). Os teores de C, H, N e O do ácido húmico foram de 47,0 ± 0,1; 4,87 ± 0,01; 3,02 ± 0,03 e 45,1 ± 0,03 respectivamente, juntamente com as relações atômicas C/N, O/C, H/C que foram de 15,6 ± 0,1; 0,96 ± 0,02; 0,104 ± 0,005, respectivamente, caracterizando um material estável porém, pouco humificado (E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>), devido ao rápido processo de transformação, com caráter mais aromático e no estado reduzido (ω) (descrito no Capítulo I).

O experimento foi montado em esquema fatorial 2x2x2x2, sendo duas raízes transformadas (manjeriço e trevo), duas concentrações de ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH), duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>), colonizadas ou não por FMAs (*G.cla*), em quatro repetições.

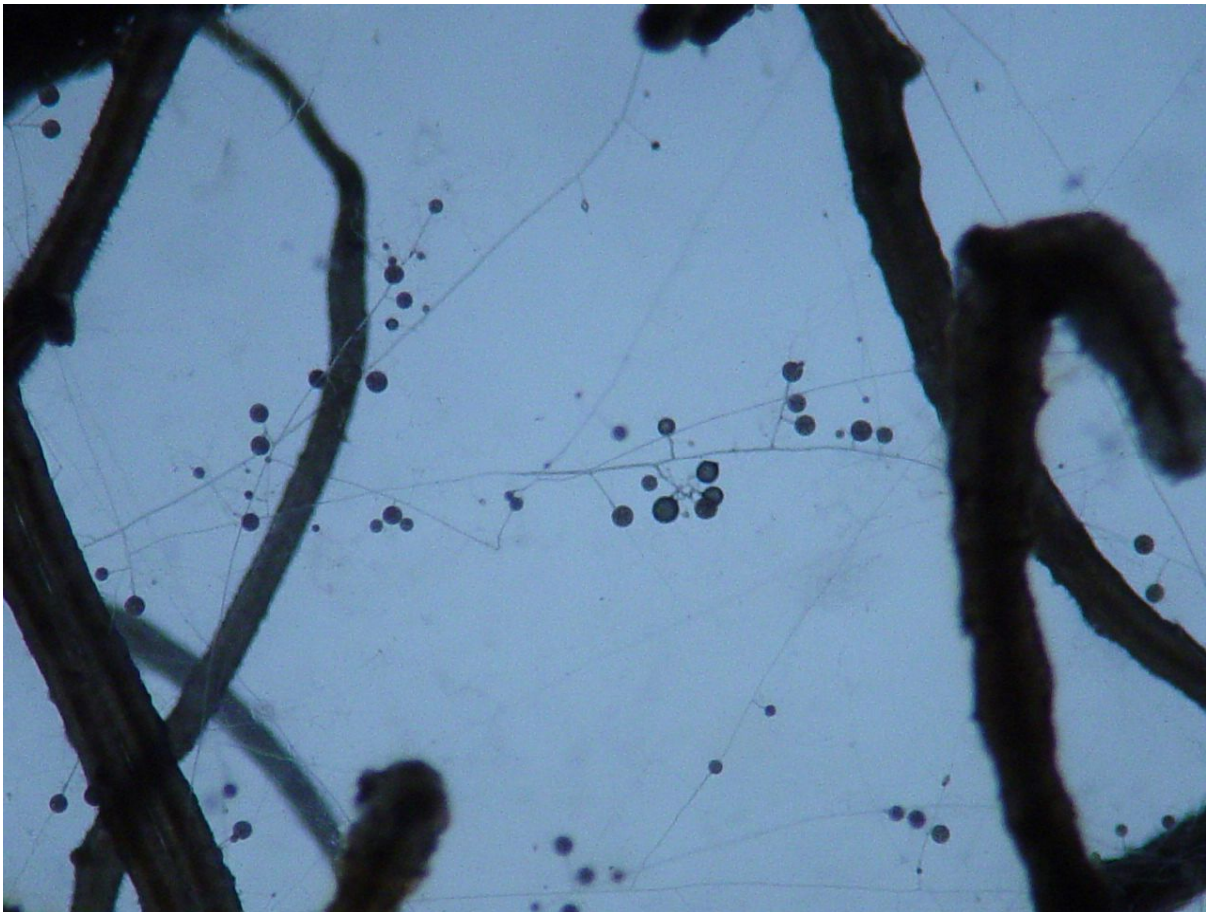
Foram avaliados: a colonização radicular (MC GONIGLE et al, 1990), a atividade da Nitrato Redutase (JAWORSKI, 1971) da Glutamina Sintetase (FARDEN & ROBERTSON, 1980) com modificações de por SOUZA et al. (2007), as frações solúveis (FERNANDES, 1978) N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (FELKER, 1977), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (CATALDO et al., 1975) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957), e a atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase) (YANG et al., 2002, com modificações de SANTOS, 2006) (Anexo 1).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo software estatístico Sisvar (FERREIRA, 1998) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p≤0,05).



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

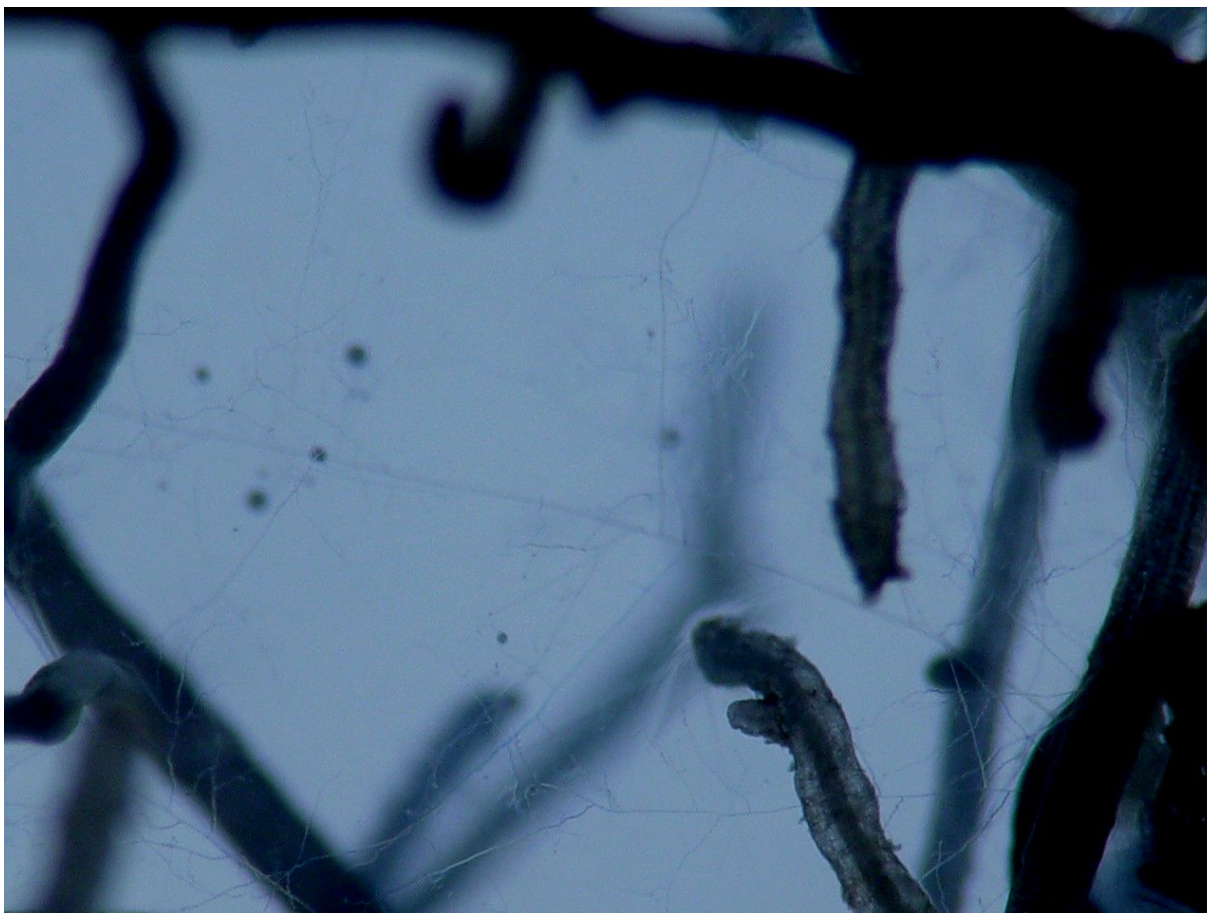
As raízes de manjeriço e trevo apresentaram atividades das P-H<sup>+</sup>ATPases e H<sup>+</sup>-PPases superiores nas raízes colonizadas por *Glomus clarum* (*G.cla*) quando comparadas com as raízes não colonizadas (ñ col.) ( $\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{ptn min}^{-1}$ ) (Figura 33). A maior atividade das P-H<sup>+</sup>ATPases pode ser em decorrência da transferência bidirecional, de nutrientes, carboidratos e água entre planta-fungo (SMITH, 1993). Como não existe conexão simplástica entre os simbiontes, os nutrientes devem ser absorvidos via apoplasto (KARANDASHOV & BUCHER, 2005; RAUSH et al., 2001), uma vez que os FMAs drenam cerca de 5 a 20% do fotossintato líquido total produzido pelo hospedeiro para a sua formação, manutenção e funcionamento das estruturas fúngicas (JAKOBSEN & ROSENDAHL, 1990) (Figura 31) sendo considerado como um dreno para o hospedeiro nos momentos iniciais de sua formação, passando a simbiose a ser considerada como não benéfica para os vegetais (LIMA, 2004).



**Figura 31.** Formação, manutenção e funcionamento das estruturas fúngicas de *Glomus clarum* (*G.cla*) aos trinta dias após a repicagem (DAR) em raízes de trevo branco (*Trifolium repens* L.) (BERBARA, 1995) crescidas em placas Petri contendo meio mínimo (BÉCARD & FORTIN, 1988) enriquecido com 20 mg C L<sup>-1</sup> e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) com pH ajustado para 5,80.

Esta simbiose caracteriza-se pela presença de hifas, arbusculos e/ou vesículas fúngicas colonizando a região do córtex das raízes das plantas hospedeiras e pela produção de hifas externas às raízes que se estendem por vários centímetros no solo, na rizosfera. Através do

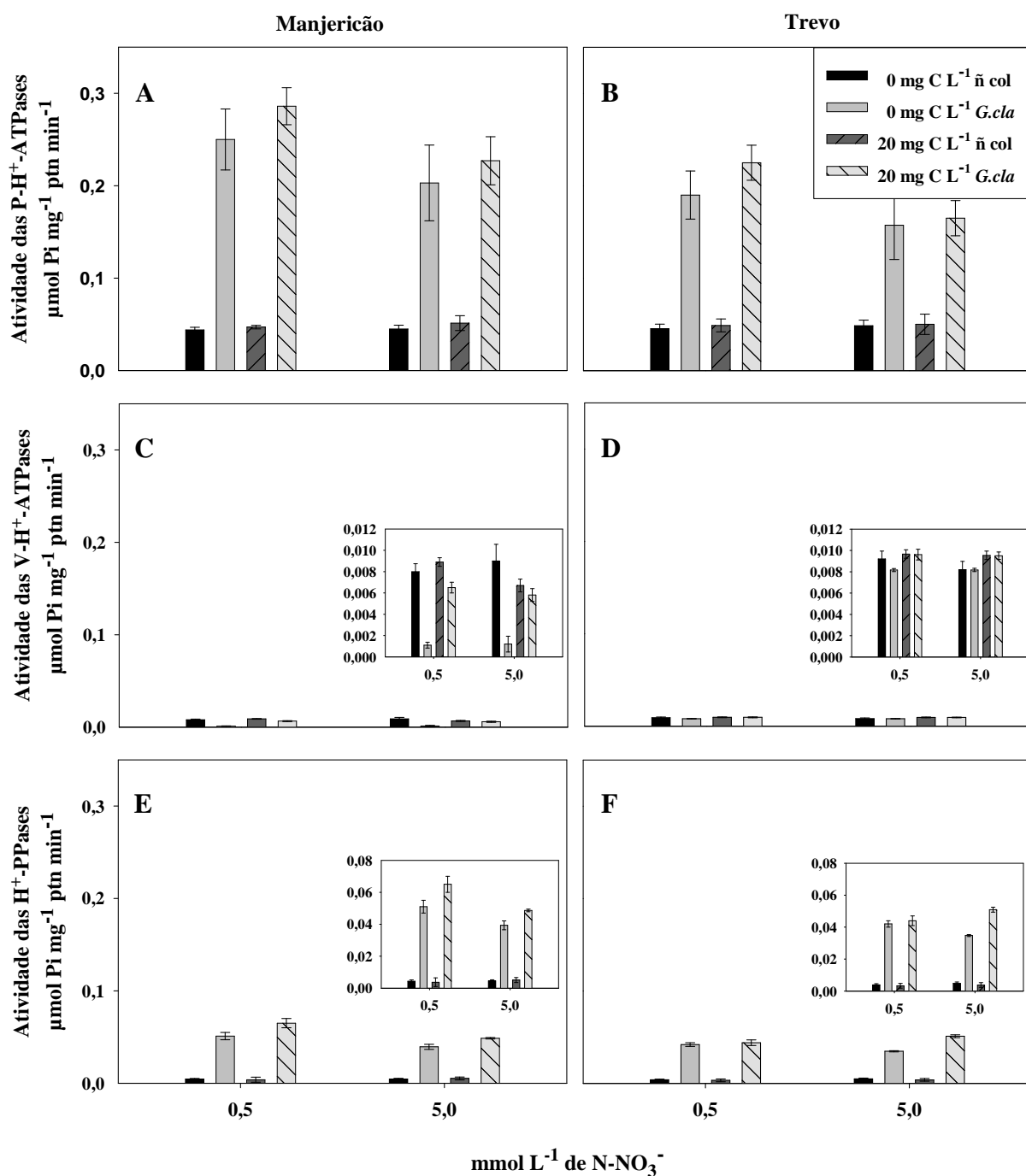
micélio os fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) conectam raízes e solo, aumentando a absorção de nutrientes, água do solo e húmus pelas hifas, que podem ser consideradas uma “extensão” da raiz. Apesar de apresentarem um pequeno diâmetro, as hifas dos FMAs possuem uma grande área superficial que podem aumentar a superfície de absorção das raízes em até 1800% (PEDERSEN & SYLVIA, 1996). Em trevo (*Trifolium repens*), leguminosa que apresenta raízes grossas, foram encontradas a produção de 3 m de hifas g<sup>-1</sup> de solo e 46 m hifas m<sup>-1</sup> de raiz colonizada (TISDALL & OADES, 1979), o que torna claro a importancia desta simbiose na exploração do solo por nutrientes e água e, conseqüentemente, para a produção vegetal (Figura 32).



**Figura 32.** Micélio extra-radicular de fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) *Glomus clarum* (*G.cla*) em raízes de trevo branco (*Trifolium repens* L.) (BERBARA, 1995) crescidas em placas Petri contendo meio mínimo (BÉCARD & FORTIN, 1988) com pH ajustado para 5,80 aos trinta dias após a repicagem (DAR).

Ainda foi determinado um ligeiro acréscimo na atividade das P-H<sup>+</sup>ATPases nas raízes, de manjeriço e trevo, submetidas ao tratamento com 20 mg C L<sup>-1</sup>, acarretando diferenças significativas entre as duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes colonizadas, sendo superior nos tratamentos com concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> nas duas raízes estudadas (Figura 33 A e B). Estes resultados sugerem uma maior eficiência da simbiose micorrízica em ambientes de baixa fertilidade uma vez que, os nutrientes absorvidos pelas raízes, em sua quase totalidade, podem ter sido absorvidos anteriormente pelos fungos micorrízicos.

Foram determinadas diferenças significativas na atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases entre as raízes colonizadas (*G.cla*) e não colonizadas (ñ col.) submetidas ao mesmo tratamento de ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH), sendo superior nas raízes colonizadas de manjeriço e trevo (Figura 33 A e B).



**Figura 33.** Atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases (A e B), das V-H<sup>+</sup>-ATPases (C e D) e das H<sup>+</sup>-PPases (E e F) ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) submetidas à interação de ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>) colonizadas por *Glomus clarum* (*G.cla*) ou não (ã col.). Detalhes nos inserts nas figuras internas com escalas ajustadas. Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 4.

Na atividade das V-H<sup>+</sup>ATPases ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) (Figura 33 C e D) foram determinadas o mesmo comportamento entre os tratamentos com ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) em ambas as raízes, manjeriço e trevo, colonizadas (*G.clarum*) ou não (ã col.) sendo determinada uma baixa atividade. Nas raízes de manjeriço, submetidas aos

tratamentos controle (sem AH) e colonizadas (*G.cla*) foram determinadas atividades muito baixas, simbólicas, das V-H<sup>+</sup>ATPases, nas duas concentrações de nitrato (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Esta baixa atividade pode ser em decorrência do suprimento energético que é drenado para o simbionte micorrízico, acarretando a indução das H<sup>+</sup>-PPases (Figura 33 E e F), que utilizam o pirofosfato (PPi) para ativar o metabolismo em condições de estresse energético (STITT, 1998).

Foram determinadas diferenças significativas na atividade das H<sup>+</sup>-PPases (Figura 33 E e F) ( $\mu\text{molPi mg}^{-1}\text{ptn min}^{-1}$ ) entre as raízes colonizadas (*G.cla*) e não colonizadas (ñ col.) submetidas aos mesmos tratamentos de ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH), sendo superior nas raízes colonizadas em ambas as raízes, manjeriço e trevo, e nas duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>). Nas raízes de manjeriço colonizadas (*G.cla*), foram determinadas diferenças na atividade das H<sup>+</sup>-PPases entre as concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sendo superiores em condições de baixa concentração de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 mmoles L<sup>-1</sup>) (Figura 33 E). Nas raízes de trevo colonizadas (*G.cla*) não foram determinadas diferenças nas atividades das H<sup>+</sup>-PPases entre as duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>) (Figura 33 F).

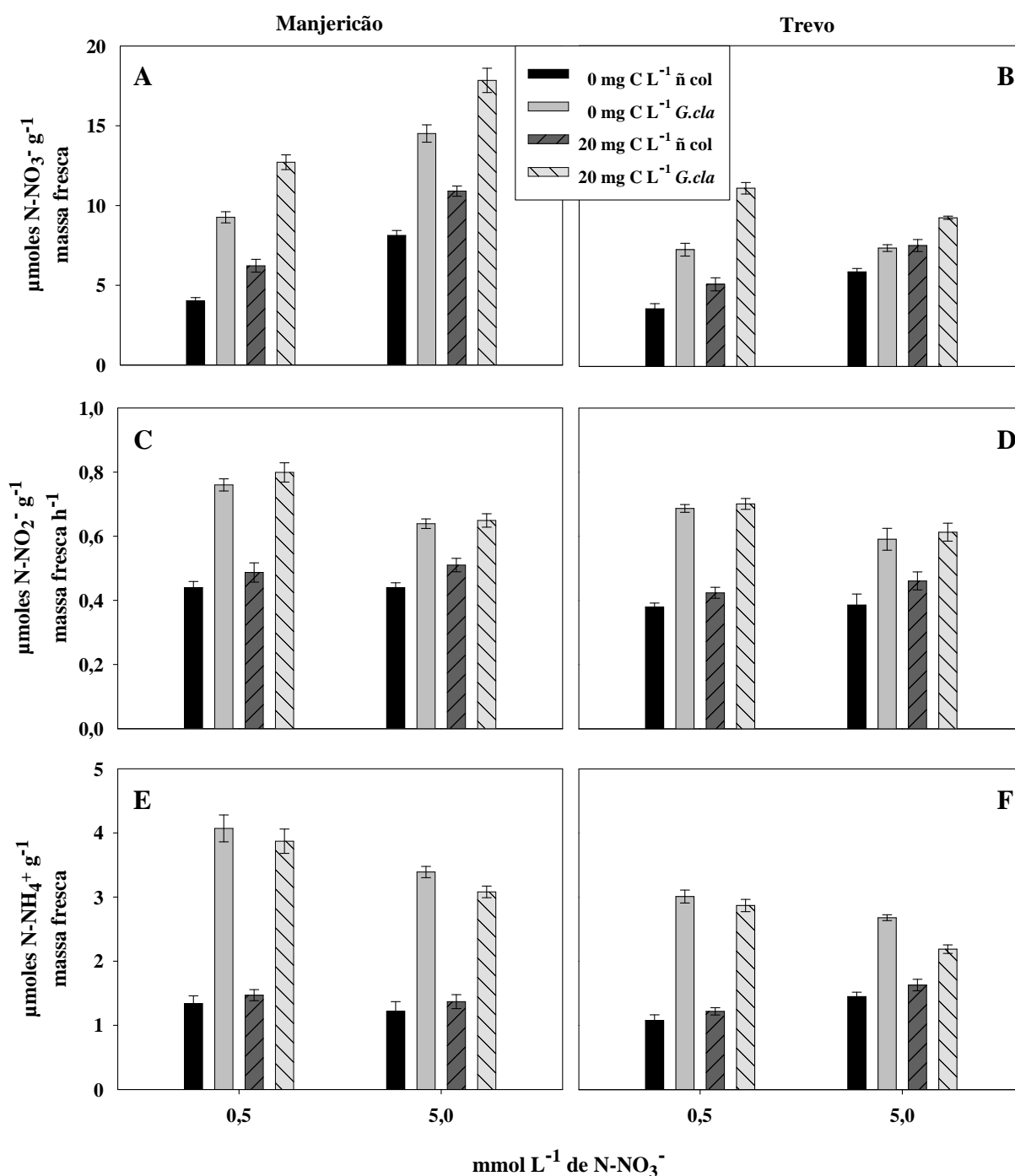
Os teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $\mu\text{moles de N-NO}_3^- \text{ g}^{-1}$  de massa fresca) (Figura 34 A e B) apresentaram comportamento similar nas raízes de manjeriço e trevo, colonizadas ou não por *Glomus clarum* (*G.cla*), quando submetidas aos diferentes tratamentos de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>). As raízes submetidas aos tratamentos com 20 mg C L<sup>-1</sup> apresentaram teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> superior ao tratamento controle (sem AH) em ambas as raízes, na mesma concentração de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>).

Foram determinados os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes submetidas aos tratamentos com 5,0 mmoles L<sup>-1</sup> em todos as concentrações com ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) nas raízes de manjeriço (Figura 34 A). Nas raízes de trevo foram determinados os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes submetidas aos tratamentos com 5,0 mmoles L<sup>-1</sup> na concentração de 20 mg C L<sup>-1</sup> nas raízes não colonizadas (ñ col.) e nos tratamentos com 0,5 mmoles L<sup>-1</sup> nas concentrações de 20 mg C L<sup>-1</sup> nas raízes colonizadas e no tratamento controle (sem AH) nas raízes não colonizadas (ñ col.) (Figura 34 B).

As raízes colonizadas apresentaram os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, em relação às raízes não colonizadas (ñ col.), sendo superior nos tratamentos com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, apenas nas raízes de manjeriço. As raízes de manjeriço apresentaram teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> superiores às raízes de trevo, submetidas aos mesmos tratamentos.

Estes resultados são contrastantes com os resultados reportados por SOUZA et al. (2006), nos quais não foram detectados teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes de trevo crescidas em meio mínimo, colonizadas ou não por *G. clarum* nas avaliações aos 49, 84 e 132 dias após a repicagem, sugerindo que todo o N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> já tivesse sido reduzido pela nitrato redutase. SOUZA et al. (2002) reportaram teores de 20  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de massa fresca em raízes de trevo crescidas em meio mínimo aos 81 dias após a repicagem. Enquanto nesse trabalho as raízes tinham 30 dias (Figura 34).

Os altos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes de manjeriço e trevo podem ser em decorrência da capacidade que as hifas micorrízicas têm de aumentar a absorção de N e o transportar do solo ou da serrapilheira em decomposição para a planta devido ao aumento da área de superfície de contato (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1991).



**Figura 34.** Teores de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\mu\text{moles de N-NO}_3^- \text{ g}^{-1}$  de massa fresca) (A e B); atividade da nitrate redutase ( $\mu\text{moles N-NO}_2^- \text{ g}^{-1}$  massa fresca  $\text{h}^{-1}$ ) (C e D) e teores de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\mu\text{moles N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$  massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriço (A, C e E) e trevo (B, D e F) submetidas à interação de ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH),  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) colonizadas por *Glomus clarum* (*G.cla*) ou não (ã col.). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra. n = 4.

Neste trabalho, os incrementos nos teores de  $\text{NO}_3^-$  foram de 130,3 e 104,3% nas raízes submetidas aos tratamentos com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de  $\text{NO}_3^-$  e de 78,6 e 63,7 nos tratamentos com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de  $\text{NO}_3^-$ , nas concentrações sem AH (controle) e com 20 mg C L<sup>-1</sup> nas raízes de manjeriço (Figura 34 A), quando comparado com os teores de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes não



colonizadas. Nas raízes de trevo foram determinados incrementos de 102,8 e 117,0% nos tratamentos com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e de 25,1 e 22,9 nos tratamentos com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nas concentrações sem AH (controle) e com 20 mg C L<sup>-1</sup>, respectivamente, o que reforçam a teoria de que as micorrizas são mais benéficas para as plantas em solos de baixa fertilidade, nitrogênio neste caso. Estes resultados foram superiores os resultados obtidos por CLIQUET et al. (1997) e AMES et al. (1983) que relataram que as plantas quando em associações com fungos micorrízicos são capazes de absorver mais nitrogênio do que as plantas não micorrizadas numa proporção de 20% - 31%, sendo absorvido tanto na forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como na de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (BAGO et al., 1996).

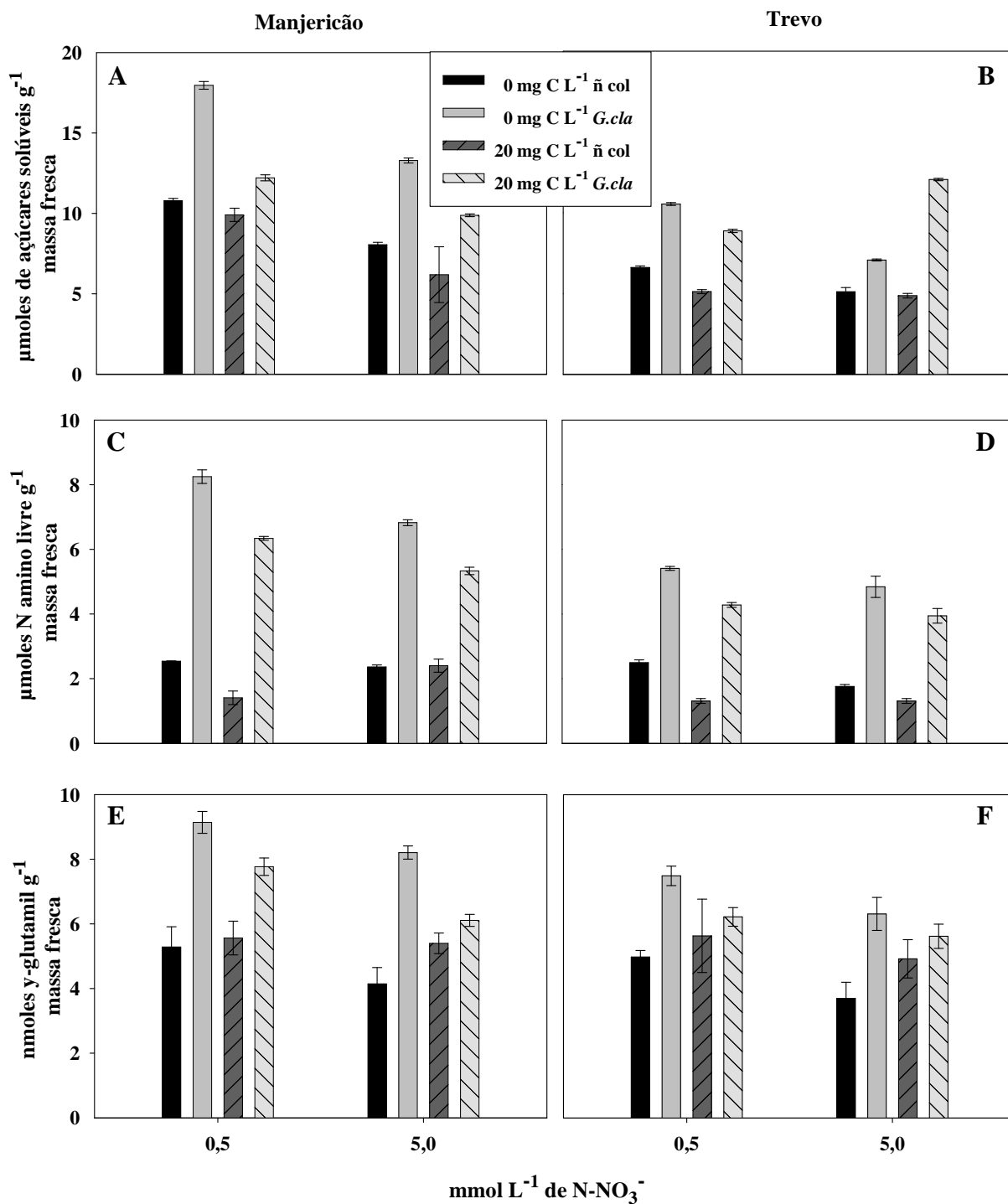
Na atividade da nitrato redutase (NR) (μmoles N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca h<sup>-1</sup>) (Figura 34 C e D) não foram determinadas diferença entre os tratamentos com ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) nas duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>) em ambas as raízes, manjeriço e trevo, sendo superior nas raízes colonizadas (*G.cla*). Nos tratamentos com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram determinadas as maiores atividades da NR na concentração de 0,5 mmoles L<sup>-1</sup> em ambas as raízes. As raízes, manjeriço e trevo, colonizadas por *G. clarum* apresentaram altas atividades da NR quando comparadas às raízes não colonizadas (ñ col.), submetidas ao mesmo tratamento de ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>) (Figura 34 C e D).

Nos teores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (μmoles N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca) (Figura 34 E e F) foi observado um comportamento similar à atividade da nitrato redutase, na qual, foi observado maiores teores nas raízes colonizadas (*G.cla*) sendo superiores nos tratamentos com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Nas raízes submetidas aos tratamentos com ácido húmico (20 mg C L<sup>-1</sup> e controle sem AH) não foram determinadas diferenças em ambas as raízes. Estes resultados reforçam as teorias descritas por VARMA (1995) e GIANINAZZI-PEARSON & AZCON-AGUILAR (1991) no qual reportam que algumas espécies de FMAs contêm enzimas que quebram o N orgânico e contém N-redutases que reduzem NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> alterando as formas de N no solo, e conseqüentemente aumentando estes teores no interior das células vegetais.

SOUZA et al. (2006) reportaram que os teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, em raízes transformadas de trevo crescidas em meio mínimo, foram maiores nas raízes não colonizadas a partir de 84 dias após a repicagem. SOUZA et al. (2007) relataram queda nos teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em raízes de trevo não colonizadas com o decorrer do tempo.

As raízes de manjeriço e trevo apresentaram comportamentos distintos entre as duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>). Na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> foram determinadas altas atividades das P-H<sup>+</sup>-ATPases, H<sup>+</sup>-PPases e NR, também foram determinados baixos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e altos teores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes colonizadas (*G.cla*). Este comportamento pode ser decorrente da simbiose micorrízica que proporciona melhorias na absorção de nutrientes (alta atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases) porém requerem metabólitos elaborados das raízes para a sua formação e manutenção, justificando as altas atividades da NR, os altos teores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e os baixos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Os teores de açúcares solúveis (μmoles de açúcares solúveis g<sup>-1</sup> massa fresca) nas raízes de manjeriço e trevo (Figura 35 A e B) decresceram com a adição de ácido húmico ao meio de cultivo (20 mg C L<sup>-1</sup>) quando comparados na mesma concentração de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sendo superiores na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup>, e a única exceção foi determinada no tratamento com 5,0 mmol L<sup>-1</sup> nas raízes de trevo. As raízes de manjeriço colonizadas (*G.cla*) apresentaram os maiores teores de açúcares solúveis em relação às raízes não colonizadas (ñ col.) nas duas concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 e 5,0 mmol L<sup>-1</sup>) de concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o que pode ser uma estratégia das raízes em drenar energia para o fungo com o intuito de aumentar sua rede de hifas extraradulares a fim de aumentar a absorção de nutrientes, neste caso para nitrato, e água (Figura 34 A).



**Figura 35.** Teores de açúcares solúveis ( $\mu\text{moles}$  de açúcares solúveis  $\text{g}^{-1}$  massa fresca) (A e B), de N amino livre ( $\mu\text{moles}$  N amino livre  $\text{g}^{-1}$  massa fresca) (C e D) e atividade da Glutamina Sintetase ( $\eta\text{moles}$   $\gamma$ -glutamil  $\text{g}^{-1}$  massa fresca) (E e F) nas raízes transformadas de manjeriçao (A, C e E) e trevo (B, D e F) submetidas à interação de ácido húmico ( $20 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle sem AH),  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmoles L}^{-1}$ ) colonizadas por *Glomus clarum* (*G. cla*) ou não (ã col.). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 4$ .

Os teores de N-amino livre ( $\mu\text{moles N amino livre g}^{-1}$  massa fresca) (Figura 35 C e D) apresentaram um ligeiro decréscimo com a adição de ácido húmico na solução sendo superiores nos tratamentos controle (sem AH), acompanhando o mesmo comportamento dos teores de açúcares solúveis. Nas raízes não colonizadas (ñ col.) os teores de N-amino foram semelhantes entre as raízes nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$ . As raízes de manjeriço colonizadas por *Glomus clarum* (*G.cla*) apresentaram teores de N-amino superiores na concentração de 0,5 mmol de  $\text{N-NO}_3^-$  e o tratamento controle (sem AH) foi superior ao tratamento com ácido húmico ( $20 \text{ mg C L}^{-1}$ ), sendo o mesmo comportamento observado nas raízes de trevo.

Foi determinado estímulo na atividade da glutamina sintetase (GS) (nmoles  $\gamma$ -glutamil  $\text{g}^{-1}$  massa fresca) nas raízes não colonizadas nas duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  (0,5 e 5,0 mmoles  $\text{L}^{-1}$ ) quando foi adicionado ácido húmico na solução de cultivo ( $20 \text{ mg C L}^{-1}$ ) (Figura 35 E e F). Nas raízes colonizadas por *Glomus clarum* (*G.cla*) foi observado uma atividade inferior da GS nos tratamentos com ácido húmico quando comparado com a atividade determinada nos tratamentos controle (sem AH) nas duas concentrações de nitrato. Estes resultados sugerem que, na presença de grandes quantidades de ácido húmico na solução, a rota preferencial para a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes colonizadas por *Glomus clarum* não seja a via da GS.

Os FMA podem assimilar o N tanto através da via GS/GOGAT como GDH. A via GS/GOGAT é mais importante quando os níveis de  $\text{NH}_4^+$  são baixos e que, em níveis elevados predomina a GDH, provavelmente, devido ao elevado  $K_M$  desta enzima pelo substrato (KARUNARATNE et al., 1987; PLASSARD et al., 1986; St. JOHN et al., 1985; SMITH et al., 1985). Segundo QUORESHI et al., 1995, a atividade das enzimas GS e GDH-NADPH foram maiores quando o N foi suprido na forma de  $\text{NO}_3^-$ . Quando o N foi suprido na forma de  $\text{NH}_4^+$  a atividade da GDH-NADH, foi maior. Segundo JOHANSEN et al. (1996), isto indica que a glutamina tem um papel chave na entrada de N em compostos orgânicos e como precursores de outros aminoácidos.

A atividade da nitrato redutase (NR) foi encontrada em esporos de FMAs germinados (HO & TRAPPE, 1975) e em extratos de raízes micorrizadas (SUBRAMANIAN & CHAREST, 1998). Níveis elevados de um transcrito como homólogo próximo aos genes da NR fúngica foram encontrados em arbúsculos de FMAs *Glomus intraradices* (KALDORF et al., 1998). Diversas evidências indicam que o ciclo da glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT) é o responsável pela assimilação da amônia na hifa fúngica extra-radical (JOHANSEN et al., 1996), entretanto, a participação da glutamato dehidrogenase (GDH) não foi excluída experimentalmente.

Não há nenhuma evidência direta a respeito da forma química em que o N é transferido longitudinalmente da hifa dos FMAs às plantas, embora a atividade da nitrato redutase (NR) nos arbúsculos conduza à hipótese de que, ao menos, alguma quantidade de N seja transferido como nitrato (KALDORF et al., 1998). JOHANSEN et al. (1996) reportaram que os aminoácido, especificamente arginina (Arg), são os mais prováveis formas transferidas por causa da assimilação ativa do amônio e do nitrato aos aminoácidos em raízes colonizadas e da observação de Arg em níveis substanciais nos FMAs (BAGO et al., 1999). Também a favor da Arg como uma candidata para a translocação de N é requerido um fluxo substancial de cátions do solo às raízes colonizadas para acompanhar os translocados polifosfatos polianiónicos (poliP) pelos FMAs (SMITH & READ, 1997; BÜCKING & HEYSER, 1999).

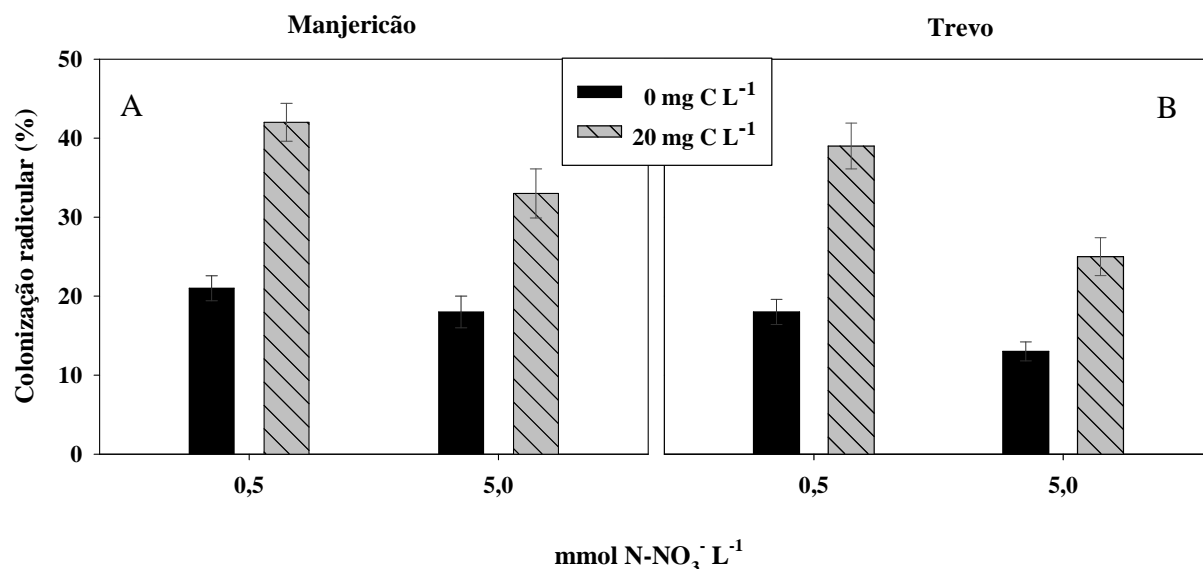
O modelo de transferência de N do simbionte fúngico para os vegetais, sugerido por BAGO et al. (2001), é especulativo e requer a atividade de várias enzimas e transportadores em lugares específicos nas micorrizas arbusculares. Entretanto, CHALOT et al. (2006) evidenciaram que em associações micorrízicas a amônia realça o potencial para transferência direta de N do fungo para as células das plantas, e que esta perspectiva foi caracterizada através



de estudos em proteínas de membrana que poderiam cumprir a função de transportar o amônio. A assimilação rápida de N inorgânico no local de absorção pode assegurar que as demandas internas sejam satisfatórias antes da transferência à planta hospedeira e também podem impedir a acumulação tóxica de íons amônio (GOVINDARAJULU et al., 2005; JIN et al., 2005).

CHALOTE et al. (2006) sugerem que uma maior atenção também deve ser dedicada aos canais não-específicos como as aquaporinas ou os sistemas de cátion dependentes de gradiente elétrico que também poderia contribuir para a importação do amônio do apoplasto interfacial ao citoplasma da célula vegetal.

Nas raízes de manjeriço e trevo foram determinadas taxas da colonização micorrízica relativamente baixas (Figura 36 A e B) e que os tratamentos com ácido húmico associados a uma baixa concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  na solução ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) proporcionaram as maiores taxas de colonização (%), o que pode ter influenciado em maior atividade das bombas de prótons (Figura 33) decorrente do maior número de pontos de contato entre os simbiontes (FMA↔raízes) podendo influenciar na eficiência na absorção de íons da solução. Altas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) reduziram a colonização radicular nas raízes de manjeriço e trevo, o que pode ser uma estratégia dos vegetais em controlar a taxa de colonização dos FMAs, uma vez que, quanto mais colonizadas, maiores serão os pontos de troca entre os simbiontes e maior será o dreno proporcionado pelos FMAs, o que seria um gasto desnecessário já que as raízes se encontram em um meio rico em nutrientes.



**Figura 36.** Colonização micorrízica (%) nas raízes transformadas de manjeriço (A) e trevo (B) aos 30 dias após a repicagem, submetidas aos tratamentos com ácido húmico (AH) ( $20 \text{ mg C L}^{-1}$  e controle sem AH) e duas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $0,5$  e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Barras verticais indicam o erro padrão da amostra.  $n = 4$ .

A eficiência da transferência de nutrientes (FMA→raízes) e metabólitos (raízes→FMA) pode ser beneficiada pela taxa de colonização radicular aumentando os pontos de contatos (trocas) entre os simbiontes.

#### 4. CONCLUSÕES

Os teores de nitrogênio na forma de nitrato na solução (0,5 e 5,0 mmols L<sup>-1</sup>) influenciaram diretamente nos efeitos proporcionados pela associação micorrízica nas raízes de manjerição e trevo, sendo que nos tratamentos com 0,5 mmols L<sup>-1</sup> nas raízes micorrizadas foram observados as maiores atividades das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase), da nitrato redutase e da glutamina sintetase, nos teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, açúcares solúveis e N-amino livre, bem como na taxa de colonização radicular.

As associações micorrízicas foram mais expressivas na atividade das bombas de prótons e no metabolismo do nitrogênio nos tratamentos submetido a baixas concentrações de nitrogênio (0,5 mmols L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) associado aos tratamentos com ácidos húmicos (20 mg C L<sup>-1</sup>).

As raízes de manjerição e trevo, submetidas aos tratamentos com 5,0 mmols L<sup>-1</sup> apresentaram as menores taxas de colonização radicular, o que pode ser considerado um efeito inibidor para as associações micorrízicas.

A adição de ácidos húmicos na solução de cultivo (20 mg C L<sup>-1</sup>) estimulou a colonização de *Glomus clarum* nas raízes de manjerição e trevo, e também na atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase), nos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e na atividade da nitrato redutase nas raízes colonizadas ou não pelos FMAs.

A presença do ácido húmico no meio de cultivo proporcionou uma atividade inferior da glutamina sintetase (GS) nas raízes colonizadas por *Glomus clarum* (*G.cla*) submetidas aos tratamentos com ácido húmico quando comparadas às atividades determinadas no tratamento controle (sem AH) nas duas concentrações de nitrato. Estes resultados sugerem que a rota preferencial para a assimilação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes colonizadas por *Glomus clarum* na presença do ácido húmico não seja a via da GS.

A presença de ácido húmico proporcionou as maiores taxas de colonização micorrízica em ambas às raízes estudadas, sendo mais expressivas em baixos níveis de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,5 mmol L<sup>-1</sup>).

## CONCLUSÕES GERAIS

A concentração de 20 mg de C L<sup>-1</sup>, presente no ácido húmico, foi a que apresentou os maiores e mais homogêneos resultados no desenvolvimento das raízes, área e comprimento, em todos os períodos estudados (15, 30 e 45 dias após a repicagem), sendo aos 30 dias observados os melhores resultados, e que concentrações superiores a 40 mg C L<sup>-1</sup> na solução de cultivo não proporcionaram grandes benefícios para o desenvolvimento radicular.

O ácido húmico influenciou, positivamente, na atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPases, V-H<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>-PPases) e no metabolismo do nitrogênio avaliado pelas frações solúveis (teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-amino livre, açúcares solúveis e nas atividades da Nitrato Redutase e da Glutamina Sintetase) nas raízes de manjeriço e trevo.

Os teores de nitrogênio na forma de nitrato na solução (0,5 e 5,0 mmoles L<sup>-1</sup>) influenciaram diretamente nos efeitos proporcionados pela associação micorrízica nas raízes de manjeriço e trevo, sendo que nos tratamentos com 0,5 mmoles L<sup>-1</sup> nas raízes micorrizadas foram observados as maiores atividades das bombas de prótons (P H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase), da nitrato redutase e da glutamina sintetase, nos teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, de açúcares solúveis e de N-amino livre, bem como na taxa de colonização radicular.

A adição de ácidos húmicos na solução de cultivo (20 mg C L<sup>-1</sup>) estimulou a colonização de *Glomus clarum* nas raízes de manjeriço e trevo, e também a atividade das bombas de prótons (P H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase), os teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e a atividade da nitrato redutase nas raízes colonizadas ou não pelos FMAs.

As associações micorrízicas foram mais expressivas na atividade das bombas de prótons e no metabolismo do nitrogênio nos tratamentos submetido a baixas concentrações de nitrogênio (0,5 mmoles L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) associado aos tratamentos com ácidos húmicos (20 mg C L<sup>-1</sup>).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desta curva de calibração, os benefícios da adição da matéria orgânica do solo poderão ser melhores estudados, desde os seus efeitos no crescimento radicular e na nutrição vegetal até sua importância na produtividade das culturas em condições de campo.

A busca de alternativas de fontes de matéria orgânica eficientes no processo de reciclagem de biomassa e na recuperação e fertilização do solo é uma necessidade de estudo constante. A adequação da reciclagem desses resíduos resolve, em parte, a questão ambiental e, em contrapartida, promove a geração de insumos orgânicos para a agricultura, o que é um dos aspectos mais importantes envolvidos nesse sistema de produção.

Para o emprego do processo de vermicompostagem torna-se necessário um melhor conhecimento da qualidade das fontes de matéria orgânica, que podem alterar a qualidade do vermicomposto, e oferecer alternativas viáveis técnica e economicamente aos agricultores, principalmente para os de sistemas orgânicos de produção.

As substâncias húmicas favoreceram a micorrização, podendo ser sugerido para trabalhos futuros a prática de adição destas substâncias nos substratos de crescimento das plantas, tornando necessários estudos voltados para a relação benefício/custo da adubação orgânica.

Em estudo de nutrição de plantas, as simbioses micorrízicas são melhores estudadas para o nutriente fósforo (P) devido a sua baixa disponibilidade e mobilidade nos solos. Entretanto, outros nutrientes de interesse, como o nitrogênio, podem ter quantidades significativas de transferência para as plantas, mesmo que estas tenham desenvolvido mecanismos de alta eficiência na aquisição destes nutrientes via sistema radicular ou pela formação de simbiose com outros microrganismos, como é o caso da fixação biológica de nitrogênio.

O uso de matéria orgânica combinada com a inoculação de micorrizas permite obter substratos mais eficientes e apresentam indicadores morfológicos e fisiológicos semelhantes aos obtidos com adubação mineral completa e, conseqüentemente, aumentam a eficiência do uso do N, principalmente o  $N-NO_3^-$ , minimizando os riscos de poluição ambiental.

Como os resultados obtidos neste trabalho foram altamente expressivos, torna-se necessário uma melhor avaliação e compreensão da importância dos efeitos proporcionados pela matéria orgânica e da simbiose micorrízica, juntos ou separadamente, na produtividade das culturas nos diferentes sistemas de produção isto porque as taxas de absorção de nutrientes e posterior transferência para as plantas variam de acordo, principalmente, com o tipo de micorriza e estágio de desenvolvimento das culturas.

Estes resultados propiciaram elementos importantes para o entendimento da atividade biológica das substâncias húmicas e dos mecanismos bioquímicos envolvidos no crescimento radicular e na colonização micorrízica por FMAs.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. B. R.; MONTEIRO, F. A. Efeito de doses de nitrogênio na produção da parte aérea e raiz dos capins gordura, marandu e tanzânia-1. *Resumo*. FERTBIO-98; XXIII Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas; VII Reunião Brasileira sobre Micorrizas; V Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo e II Reunião Brasileira de Biologia do Solo. Caxambu, MG. p. 695, 1998.
- AHN, S. J.; SIVAGURU, M.; OSAWA, H.; CHUNG, G. C.; MATSUMOTO, H. Aluminum inhibits the  $H^+$ -ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiology*, v. 126, p. 1381-1390, 2001.
- AQUINO, A. M.; ALMEIDA, D. L.; GUERRA, J. G. M.; DEPOLI, H. Biomassa microbiana, colóides orgânicos e N inorgânico durante a vermicompostagem de diferentes substratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 40, n. 1, p. 1087-1093, 2005.
- AQUINO, A. M.; ALMEIDA, D. L.; FREIRE, L. R.; DE-POLLI, H. Reprodução de minhocas (*Oligochaeta*) em esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 29, p. 161-168, 1994.
- AQUINO, A. M.; ALMEIDA, D. L.; SILVA, V. F. *Utilização de minhocas na estabilização de resíduos orgânicos: vermicompostagem*. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa Biológica do Solo 13p. (Comunicado técnico, 8). 1992.
- ALBANELL, E.; PLAIXATS, J.; CABRERO, T. Chemical changes during vermicomposting (*Eisenia foetida*) of sheep manure mixed with cotton industrial wastes. *Biology and Fertility of Soils*, v. 6, p. 266-269. 1988.
- ALBUZIO, A.; FERRARI, G.; NARDI, S. Effects of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings. *Canadian Journal of Soil Science*, v. 66, p. 731-736. 1986.
- ALLEN, E. B.; ALLEN, M. F.; HELM, D. J.; TRAPPE, J. M.; MOLINA, R.; RINCON, E. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil*, Hague, v.170, p.47-62, 1995.
- ALLEN, M.F. *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 184p.
- AMES, R. N.; REID, C. P. P.; PORTER, L. K.; CAMBARDELLA, C. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two  $^{15}N$ -labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*. v. 95. p. 381-396. 1983.
- ANGELI A.; MONACHELLO D., EPHRITIKHINE G., FRACHISSE J.M., THOMINE S., GAMBALE F., BARBIER-BRYGOO H. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* (London), v. 442, p. 939-942. 2006.
- ARANGO, M.; GEVAUDANT, F.; OUFATTOLE, M.; BOUTRY, M. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta*, v. 216, p. 355-365, 2003.
- ATIYEH, R. M.; LEE, S.; EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q.; METZGER J.D. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*. v. 84. p. 7-14. 2002.
- ATIYEH, R. M.; DOMINGUEZ, J.; SUBLER, S.; EDWARDS, C. A.; Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*) and the effects on seedling growth. *Pedobiologia*, v. 44, p. 709-724. 2000.
- ATTINÀ, E.; NOSTRO, G.; SIDARI, M.; CACCO, G. *Changes in gene structure and its expression induced by humic substances in plant tissues*. First Workshop of International Soil Science Society, Working Group, MO, Canada, p. 11-15. 1992.

- AZCON-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, v. 6, p. 457-464. 1996.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Saprotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. In: VARMA, A.; HOCK, B. (Ed.). *Mycorrhiza, structure, function, molecular biology and biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag, p. 391-407. 1991.
- BACA, M.T.; DELGADO, I. C.; DE NOBILI, M.; ESTEBAN, E.; SANCHEZ-RAYA, A. J. Influence of compost maturity on nutrient status of sunflower. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.26, p.169-181, 1995.
- BAGO, B.; SHACHAR-HILL, Y.; PFEFFER, P. E. Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytologist*, v. 149, p. 4-8. 2001.
- BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; DOUDS, D. D.; BROUILLETTE, J.; BÉCARD, G.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology*. v. 121, p. 263-271. 1999.
- BAGO, B.; VIERHEILIG, H.; PICHE, Y.; AZCÓN-AGUILAR, C. Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytologist*. v. 133, p. 273-280. 1996.
- BALTSCHIEFFSKY, M.; SCHULTZ, A.; BALTSCHIEFFSKY, H. H<sup>+</sup>-PPase: a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters*, v.457, p.527-533, 1999.
- BARLEY, K.P. The abundance of earthworms in agricultural land and their possible significance in agriculture. *Advances in Agronomy*, v.13, p. 249-268, 1961.
- BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F. Eucalypt nutrition and fertilizer regimes in Brazil. In: ATTIWILL, P. M.; ADAMS, M. A. (Eds.). *Nutrition of Eucalypts*. Australia, p. 335-356. 1996.
- BÉCARD, G.; DOUDS, D. D.; PFEFFER, P. E. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Appl. Environm. Microbiol.* v. 58, n. 3, p. 821-825, 1992.
- BÉCARD, G.; FORTIN, J. A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, Oxford, v. 108, p. 211-218, 1988.
- BÉCARD, G.; PICHE, Y. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. *Methods in Microbiology*, London, v. 24, p. 89-108, 1992.
- BELOGUROV, G. A.; LAHTI, R. A lysine substitute for K<sup>+</sup>. *J. Biol. Chem.* v. 277, p. 49651-49654. 2002.
- BENHAMOU, N.; FORTIN, J. A.; HAMEL, C.; ST-ARNAUD, M.; SHATILLA, A. Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathology*. v. 84, p. 958-968, 1994.
- BENITES, V. M.; MADARI, B.; MACHADO, P. L. O. A. *Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo*. Comunicado Técnico 16, EMBRAPA Solos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 7pp. 2003.
- BERNA, M. P.; NAVARRO, A. F.; ROIG, A.; CEGARRA, J.; GARCÍA, D. Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse. *Biology and Fertility of Soils*, v.22, p.141-148, 1996.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. *Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição*. v. VIII, p. 53-88. In: FERNANDES, M S. (ed) *Nutrição Mineral de Plantas*. SBCS. 1 ed. Viçosa, 432p. 2006.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A. ; FONSECA, H. M. A.; SOUZA, S. R. Transgenic root systems in arbuscular mycorrhizal fungi studies. *Revista Agronomia*, v. 35, n. 1/2, p. 58-65, 2001.

- BERBARA, R. L. L.; FREIRE, L. R.; FERNANDES, M. S. Influência da colonização micorrízica arbuscular sobre a nutrição do quiabeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 9, p.1645-1653. 1999.
- BERBARA, R. L. L.; FONSECA, H. M. A. C. Colonização e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.) *Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas*. Lavras, 1996. p. 39-65.
- BERBARA, R. L. L.; MORRIS, B. M.; FONSECA, H. M. A. C.; REID, M.; GOW, N. A. R.; DAFT, M. J. Electrical currents associated with arbuscular mycorrhizal interactions. *New Phytologist*, Oxford, v. 129, p. 433-438, 1995.
- BERBARA, R. L. L. Ionic fluxes in arbuscular mycorrhizal systems. Tese PhD, University of Dundee. 215 pp. 1995.
- BETHLENFALVAY, G. J.; CAUNTRELL, I. C.; MILHARA, K. L.; SCHEREINER, R. P. Relationships between soil aggregation and mycorrhizae as influenced by soil biota e nitrogen nutrition. *Biology and Fertility of Soil*, Berlin, v. 28, p. 356-363, 1999.
- BLAUDEZ, D.; CHALOT, M.; DIZENGREMEL, P.; BOTTON, B. Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* (Roth.). II. Metabolic changes during mycorrhiza formation. *New Phytology*, v. 138, p. 543-552. 1998
- BOTTOMLEY, W. B. Some effects of organic-promotion substances auxinones) on the growth of *Lema minor* in mineral cultural solutions. *Roy. Soc. Proc., B. London*. v. 89, p. 481- 507. 1917.
- BRAVARD, S.; RIGHI, D. Characterization of fulvic and humic acids from na Oxisol-Spodosol toposequence of Amazonia, Brazil. *Geoderma*, v. 48, p. 151-162. 1991.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P.M.; PARDO, J. M. Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends Plant Science*, v. 3, p. 411-412. 1998.
- BÜCKING, H.; HEYSER, W. Elemental composition and function of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi - an X-ray microanalytical study. *Mycological Research*. v. 103, p. 31-39. 1999.
- BÜNEMANN, E. K.; BOSSIO, D. A.; SMITHSON, P. C.; FROSSARD, E.; OBERSON, A. Microbial community composition and substrate use in a highly weathered soil as affected by crop rotation and P fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 36, p. 889-901, 2004.
- CACCO, G.; ATTINÀ, E.; GELSOMINO, A.; SIDARI, M. Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 163, p. 313-320. 2000.
- CACCO, G.; DELL'AGNOLA, G. Plant growth regulator activity of soluble humic complex. *Can J Soil Sci.*, v. 64, p. 225-228. 1984.
- CALDAS, R. A.; CALDAS, L. S. Nitrate, ammonium and kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose callus. *Physiol Plant*. v. 37, p. 111-116. 1976.
- CAMARGO, F. A. O.; SANTOS, G. A.; GUERRA, J. G. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Eds). *Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre, Gênese, p. 27-40. 1999.
- CAMARGO, F. A. O.; GIANELLO, C.; VIDOR, C. Potencial de Mineralização do Nitrogênio em Solos do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, CAMPINAS - SP, v. 22, n. 4, p. 575-580, 1997.

- CAMEL, S. B.; REYES-SOLIS, M. G.; FERRERA-CERRATO R.; FRANSON, R. L.; BROWN, M. S.; BETHLENFALVAY, G. J. Growth of VA mycorrhizal mycelium through bulk soil. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 55, p. 389-393, 1991.
- CAMONI, L.; VISCINTI, S.; MARRA, M.; ADUCCI, P. Adenosine 5'-monophosphate inhibits the association of 14-3-3 proteins with the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 34, p.3 1709-317012, 2001.
- CAMONI, L.; IORI, V.; MARRA, M.; ADUCCI, P. Phosphorylation-dependent interaction between plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* v. 275. p. 9919-9923. 2000.
- CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure function and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, v. 580, p. 277-303, 1999.
- CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. *Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. 345p. Campos dos Goytacazes, 2005.
- CANELLAS, L. P. *Avaliação de características físico-químicas de ácidos húmicos*. 164 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ. 1999.
- CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. (eds.) *In: Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes. 309p. 2005.
- CANELLAS, L. P., OLIVARES, F. L., FAÇANHA, A. L. O.; FAÇANHA, A. R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.*, v. 130, p. 1951-1957. 2002.
- 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<sup>-1</sup>. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, p. 131-132, 2001.
- CANTARELLA, H.; ANDRADE, C. A.; MATTOS Jr., D. *Matéria orgânica do solo e disponibilidade de N para as plantas*. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P. & CAMARGO, F. A. O. (Eds.). *Fundamentos da Matéria orgânica do solo*. 2. ed. Porto Alegre, v. 1. p. 581-595. 2008.
- CANTARELLA, H.; ABREU, C. A.; BERTON, R. S. Fornecimento de nutrientes pela matéria orgânica do solo. In: ENCONTRO SOBRE MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO - PROBLEMAS E SOLUÇÕES, 1992, Botucatu. *Anais*. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônomicas. GUERRINI, I. A.; BULL, L. T. (Eds) p.63-122, 1992.
- CANTARELLA, H. *Matéria Orgânica e Nitrogênio do Solo*. In: BÜLL, L. T.; ROSOLEM, C. A. (Eds.). *Interpretação de Análise Química do Solo e Planta para Fins de Adubação*. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, p. 37-74, 1989.
- CANTO-CANCHÉ, B.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Chemical from roots, hairy roots, and their application. *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. 1999.
- CAPRONI, A. L. *Fungos micorrízicos arbusculares em áreas reflorestadas remanescentes da mineração de bauxita em Porto Trombetas/PA*. 205 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ. 2001.
- CARENHO, R.; TRUFEM, S. F. B. ; BONONI, V. L. R. Efeitos da adição de argila, areia, calcário, superfosfato e/ou sphagnum na colonização micorrízica arbuscular de amendoim, sorgo e milho cultivados em latossolo vermelho-amarelo. In: *Fertbio 2000 - Biodinâmica do Solo*, Santa Maria, RS. (cd-room). Santa Maria, 2000.



- CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, New York, US, v. 6, p. 853-855, 1975.
- CAVENDER, N. D.; ATIYEH, R. M.; EDWARDS, C. A. Influence of vermicomposts in arbuscular mycorrhizal infection of *Sorghum bicolor* and plant growth. In: II International Soil Ecology Conference, 1999, Chicago. *Abstracts...* Chicago. p. 23, 1999.
- CAYET, C.; LINCHTFOUSE, E. <sup>13</sup>C plant-derived n-alkanes in soil particle-size fractions. *Organic Geochemistry*, Oxford, v. 23, p. 253-258, 2001.
- CHALOT, M.; BLAUDEZ, D.; BRUN, A. Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *TRENDS in Plant Science*, v. 11, n. 6, p. 263-266. 2006.
- CHEN, Y.; AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. In MACCARTHY, P.; Clapp, C. E.; MALCOLM, R. L.; BLOOM, P. R. (Eds). *Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Readings*. American Society of Agronomy Inc., Soil Science of America, Inc., Madison, WI, p 161-186. 1990.
- CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHINITZER, M. Information provided on humic substances by E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> ratios. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 41, p. 352-358, 1977.
- CHUCOV, S. N. Study by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of humic acids and molecular parameters in anthropogenically disturbed soils. In: INTERNATIONAL MEETING OF THE INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY, 10, 2000, Toulouse. *Abstracts...* Toulouse. v. 2, p. 81-84, 2000.
- CLAPP, C. E.; HAYES, M. H. B.; SENESI, N.; BLOOM, P. R.; JARDINE, P. M. (Eds.). *Humic Substances and Chemical Contaminants*, Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, 2001.
- CLIQUET, J. B.; MURRAY, P. J.; BOUCAUD, J. Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* on the uptake of amino nitrogen by *Lolium perenne*. *New Phytologist*, v. 137, P.345-349, 1997.
- COOKSON, S. J.; WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. light-dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in Arabidopsis leaf cells. *Plant Physiology*. v. 138, p. 1097-1107. 2005.
- COSGROVE, D. J. Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell*, Rockville, v. 9, p. 1031-1041, 1997.
- COSGROVE, D. J. Cell wall loosening by expansin. *Plant Physiology*, Rockville, v. 118, p. 333-339, 1998.
- CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell*, v.7, p.859-868, 1995.
- DAVIES, J. M.; HUNT, I.; SANDERS, D. Vacuolar H<sup>+</sup>-pumping ATPase variable transport coupling ratio controlled by pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. v. 91, p. 8547-8551. 1994.
- DECLERCK, S.; SÉGUIN, S.; DALPÉ, Y. The Monoxenic Culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi as a Tool for Germplasm Collections. In: FORTIN, J.; DECLERCK, S.; STRULLU, D. G. (Eds.) *In Vitro Culture of Mycorrhizas*, p. 17-30. 2006.
- DELL'AGNOLA, G.; FERRARI, G.; NARDI, S. Antidote action of humic substances on atrazine inhibition of sulfate uptake in barley roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 15, p. 101-104, 1981.
- DELL'AGNOLA, G.; NARDI, S., Hormone-like effect and enhanced nitrate uptake induced by depolycondensed humic fractions obtained from *Allolobophora rosea* and *A. caliginosa* faeces. *Biology and Fertility of Soils*, v. 4, p. 115-118. 1987.

- DELL'AGNOLA, G.; FERRARI, G. *Effect of humic acids on anion uptake by excised barley roots*. Proceedings of the International Symposium Humus et Planta V. Prague, p. 567-570. 1971.
- DETTMER, J.; HONG-HERMESDORF, A.; STIERHOF, Y. D.; SCHUMACHER, K. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell.*, v. 18, p. 715-730. 2006.
- DEWITT, N. D.; SUSSMAN, M. R. Immunocytological Localization of an Epitope-Tagged Plasma Membrane Proton Pump (H<sup>+</sup>-ATPase) in Phloem Companion Cells. *The Plant Cell*, v. 7, p. 2053-2067. 1995.
- DICK, D. P.; BURBA, P.; HERZOG, H. Influence of extractant and soil type on molecular characteristics of humic substances from two Brazilian soils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 140-145, 1999.
- DIETZ, K. J.; TAVAKOLI, N.; KLUGE, C.; MIMURA, T.; SHARMA, S. S.; HARRIS, G. C.; CHARDONNENS, A. N.; GOLLDACK, D. Significance of the V type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of experimental Botany*, v. 52, n. 363, p. 1969-1980, 2001.
- DONISA, C.; MOCANU, R.; STEINNES, E. Distribution of some major and minor elements between fulvic and humic acid fractions in natural soils. *Geoderma*, v. 111 (1-2), p. 75-84. 2003.
- DORAN, P. M. (Ed) *Hairy roots*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam. p. 43-49. 1997.
- DRORY, O.; NELSON, N. The emerging structure of vacuolar ATPases. *Physiology* (Bethesda), v. 21, p. 317-325. 2006.
- DROZDOWICZ, Y. M.; REA, P. A. Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatases: from evolutionary backwaters into mainstream. *Trends Plant Science*. 6, 206-211. 2001.
- DROZDOWICZ, Y. M.; KISSINGER, J. C.; REA, P. A. AVP2, a sequence-divergent, K<sup>+</sup>-insensitive H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase from Arabidopsis. *Plant Physiol.* v. 123, p. 353-362. 2000.
- EDWARDS, C. A.; BURROWS, I., The potential of earthworm composts as plant growth media. In: EDWARDS, C. A., NEUHAUSER, E. (Eds.), *Earthworms in Waste and Environmental Management*. SPB Academic Press, The Hague, The Netherlands, p. 21-32. 1988.
- ELIAS, K. S.; SAFIR, G. R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. *Appl Environ Microbiol.* v. 53, p. 1928-1933. 1987.
- ELVIRA, C.; SAMPEDRO, L.; BENÍTEZ, E.; NOGALES, R. Vermicomposting of sludges from paper mill and dairy industries with *Eisenia andrei*: a pilot-scale study. *Bioresource Technology*, v. 63, p. 205-211, 1998.
- FAÇANHA, A. R.; FAÇANHA, A.; OLIVARES, F. L.; GURIDI, F.; SANTOS, G. A.; VELLOSO, A. C. X.; RUMJANEK, V. M.; BRASIL, F.; SCHRISPEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M. A.; CANELLAS, L. P. Bioatividade de ácidos húmicos: Efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 37, p. 1301-1310, 2002.
- FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. *Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen*. In: BERGSEN, F. J. Ed. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, 1980.
- FRANÇA, M. G. C.; ROSSIELLO, R. O. P.; RAMOS, F. T.; ZONTA, E. Root growth and proton efflux rates of rice seedlings in a greenhouse environment. *Acta bot. bras.* v. 20, n. 1, p. 25-30. 2006.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extrates. *Analytical Chemistry*, WASHINGTON, v. 49, 1080 p. 1977.
- FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. *Critical Reviews in Plant Science.*, v. 14, n. 2, p. 111-148. 1995.

- FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. *Absorção de nutrientes*. In: Fernandes, M. S. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 115-152, 2006.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. *Turrialba*, v. 33, p. 297-301. 1983.
- FERNANDES, M. S.; FREIRE, L. R. Efeitos de Nitrogênio Nítrico Aplicado no Solo, na Atividade da Nitrato Redutase e na Acumulação de N-Solúvel em 'Brachiária' Sp. *TURRIALBA*, v. 26, n. 3, p. 268-273, 1976.
- FERREIRA, D. F. Sistema de análise estatística para dados balanceados. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 145p. 1998.
- FISCHER, W. N.; ANDRE, B.; RENTSCH, D.; KROLKIEWICS, S.; TEGEDER, M.; BRITKEUZ, K.; FROMMER, W. B. Amino acid transport in plants. *Trends Plant Science*, v. 3, p. 188-195. 1998.
- FISK, H. J.; DANDEKAR, A. M. The introduction and expression of transgenes in plants. *Sci. Hort.*, v. 55, p. 5-36, 1993.
- FITTER, A. H.; GARBAYE, J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and Soil*, v. 159, p. 123-132, 1994.
- FLAIG, W. An introductory review on humic substances: aspects of research on their genesis, their physical and chemical properties, and their effect on organisms. In: POVOLEDO, D.; GOLTERMAN, H. L. (Eds.), *Humic substances. Their structure and function in the biosphere*. Proc. Inter. Meeting. Wageningen, The Netherlands. p. 19-42. 1975.
- FLORES, H.; FILNER P. Metabolic relationships of putrescine GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae. In: NEUMANN, K.; BARZ, W.; REINHARD, E. (Eds.). Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Berlin: Springer-Verlag. p. 174-85, 1985.
- FLORES, H. E. Plant roots as chemical factories. *Chem. Ind.*; 10: 374-377, 1992.
- FLORES, H. E.; CURTIS, W. R. Approaches to understanding and manipulating the biosynthetic potential of plant roots. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, v. 665, p. 188-209, 1992.
- FLORES, H. E.; DAI, Y.; CUELLO, J. L.; MALDONADO-MENDOZA, I. E.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Green roots: photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. *Plant Physiology*, v. 101, p. 361-371, 1993.
- FONSECA, H. M. A. C. *Some aspects of the physiology of endomycorrhizal plants with associated nitrogen fixing bacteria*. Tese PhD, University of Dundee, 1994, 187 pp.
- FORDE, B. G. Nitrate transport in plants: structure, function, and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1469, p. 219-235. 2000.
- FORERO, E. G. *Micorriza: Fundamentos biológicos y estado del arte*. In: GUERRERO, E. (Ed.) *Micorrizas, recurso biológico del suelo*. Fondo Fen Colombia: Bogotá, p. 1-46. 1996.
- FOX, T. C.; GUERINOT, M. L. Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v. 49, p. 669-696. 1998.
- FUKUNAGA, Y.; RING, J.; CHILD, J. J. The influence of TCA-cycle acids on nitrate utilization by cultured plant cells. *Plant Sci. Lett.* v. 19, p. 9-19, 1978.
- FRANCIS, R.; READ, D. J. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *Plant and Soil*, v. 159, p. 11-25. 1994.
- FRANCO, A. A.; BALIEIRO, F. C. The role of biological nitrogen fixation in land reclamation, agroecology and Sustainability of Tropical Agriculture. In: ROCHA-MIRANDA, C. E. (Org.). Rio de Janeiro: *Academia Brasileira de Ciências*, p. 209-234. 2000.

- FREIXO, A. A. *Caracterização da matéria orgânica de latossolos sob diferentes sistemas de cultivo através de fracionamento físico e espectroscopia de infravermelho*. 2000. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.
- FRIES, 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. A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, Rockville, v. 8, p. 1533-1544, 1997.
- FUGLSANG, A. T.; TULINIUS, G.; CUI, N.; PALMGREN, M. G. Protein phosphatase 2A scaffolding subunit A interacts with plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase C-terminus in the same region as 14-3-3 protein. *Physiol. Plant.* v. 128, p. 334-340. 2006.
- FUKUDA, A.; TANAKA, Y. Effects of ABA, auxin, and gibberellin on the expression of genes for vacuolar H<sup>+</sup>-inorganic pyrophosphatase, H<sup>+</sup>-ATPase subunit A, and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in barley. *Plant Physiol. Biochem.* v. 44, p. 351-358. 2006.
- GAMBORG, O. L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiology.* v. 45, p. 372-375. 1970.
- GAMBORG, O. L.; SHYLUK, J. The culture of the plant cells with ammonium salts as the Sole nitrogen source. *Plant Physiology.* n. 45, p. 598-600. 1970.
- GAMPER, H.; HARTWIG, U. A.; LEUCHTMANN, A. Mycorrhizas improve nitrogen nutrition of *Trifolium repens* after 8 yr of selection under elevated atmospheric CO<sub>2</sub> partial pressure. *New Phytology*, v. 167, p. 531-542. 2005.
- GARCÉS, N. P. *Características actuales del humus en los principales tipos de suelos de Cuba*. 200 f. Tese (Doutorado) Universidad de Agricultura de Nitra, Cuba. 1987.
- GAXIOLA, R. A.; PALMGREN, M. G.; SCHUMACHER, K. Plant proton pumps. Minireview. *FEBS Letters*, v. 581, p. 2204-2214. 2007.
- GAXIOLA, R. A.; LI, J.; UNDURRAGA, S.; DANG, L. M.; ALLEN, G. J.; ALPER, S. L.; FINK, G. R. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 98, p. 11444-11449. 2001.
- GIANINAZZI-PEARSON, V.; AZCON-AGUILLAR, C. Fisiología de las micorrizas vesiculo-arbusculares. In: OLIVARES, J.; BAREA, M. (Coord.) *Fijación y movilización biológica de nutrientes*. VII. Raycar: Madrid, p. 175-202, 1991.
- GIOVANNETTI, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol.* v. 98, n. 7, p. 705-715, 1994.
- GLASS, A. D. M.; BRITO, D.; KRONZUCKER, H. J.; KAISER, B.; OKAMOTO, S.; SIDDIQI, M. Y.; SILIM, S.; VIDMAR, J. J.; ZHUO, D. Nitrogen transport in plants, with an emphasis on regulation of fluxes to match plant demand. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 164, p. 199-207. 2001.
- GOGALA, N. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia*, v. 47, p. 331-340, 1991.
- GOULD, A. B.; HENDRIX, J. W., and FERRISS, R. S. Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentucky. 1. Propagule and spore population densities. *Canadian Journal Botany*, v. 74, p. 247-261, 1996.
- GOVINDARAJULU, M.; PFEVER, P. E.; JIN, H.; ABUBAKER, J.; DOUDS, D. D.; ALLEN, J. W.; BÜCKING, H.; LAMMERS P J.; SHACHAR-HILL, Y. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*. v. 435, p. 819-823. 2005.

- GUILLON, S.; TRÉMOUILLAUX-GUILLER, J.; PATI, P. K.; RIDEAU, M.; GANTET, P. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, p. 341-346. 2006.
- GUMINSKI, S. Present days view on physiological effects induced in plant organisms by humic compounds. *Soviet Soil Science*, Washington, v. 9, p. 1250-1255, 1968.
- GURIDI, F. I. *O fósforo, a matéria orgânica e a micorriza no cafeeiro*. 2000. 123 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)-Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- HAND, P.; HAYES, W.A.; FRANKLAND, J.C.; SATCHELL, J.E. Vermicomposting of cow slurry. *Pedobiologia*, v.31, p. 199-209, 1988.
- HAROLD, F. M. Transcellular ion currents in tip-growing organisms: where are they taking us? In: NUCCITELLI, R. (Ed.) *Ionic currents in development*. Alan Liss, Inc. New York, 359-366p. 1986.
- HARRISON, M. J. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* . v. 14, p. 2413-2429. 2002.
- HARRISON, M. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 59, p. 19-42. 2005.
- HAYES, M. H. B.; WILSON, W. R., Eds. *Humic Substances, Peats and Sludges*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997.
- HAYES, M. H. B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R. SWIFT, R. S. *Humic substances II. In search of structure*. New York, Wiley, 764p. 1989.
- HAYMAN, D. S. (VA mycorrhizas in field crop systems. In: G. R. Safir (ed.), *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*: 171-192. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1987.
- HEDGES, J. I.; OADES, J. M. Comparative organic geochemistries of soil and marine sediments. *Organic Geochemistry*, Oxford, v. 27, p. 319-361, 1997.
- HERNANDEZ, A.; COOKE, D. T.; CLARKSON, D. T. In vivo activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase hydrolytic activity by complex lipid-bound unsaturated fatty acids in *Ustilago maydis*. *European Journal of Biochemistry*. v. 269, p. 1006-1011. 2002.
- HETRICK, B. A. D. Mycorrhizas and root architecture. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 47, n. 4, p. 355-362. 1991.
- HIRSCHI, K. D.; ZHEN, R. G.; CUNNINGHAM, K. W.; REA, P. A.; FINK GR. CAX1, na H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 93, p. 8782-8786. 1996.
- HO, I.; TRAPPE, J. M. Nitrate reducing capacity of two vesiculararbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*. v. 67, p. 886-888. 1975.
- IMAMURA, H.; TAKEDA, M.; FUNAMOTO, S.; SHIMABUKURO, K.; YOSHIDA, M.; YOKOYAMA, K. Rotation scheme of V1-motor is different from that of F1-motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 102, p. 17929-17933. 2005.
- INOUE, S.; KINOSHITA, T.; SHIMAZAKI, K. Possible involvement of phototropins in leaf movement of kidney bean in response to blue light. *Plant Physiol.* 138, 1994–2004. 2005.
- JAKOBSEN, I.; ROSENDAHL, L. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants . *The New Phytologist*, v.115, p.77-83, 1990.
- INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY – IHSS Samples. Disponível em: <<http://www.ihss.gatech.edu/>> Acesso em 15 março 2004.
- JANICKA-RUSSAK, M.; KLOBUS, G. Modification of plasma membrane and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases in response to NaCl and ABA. *J. Plant Physiol.*, v. 164, p. 295-302. 2007.

- JANOS, D. P. VA mycorrhizas in humid tropical ecosystems. In: SAFIR, G. R. (ed.) Ecophysiology of VA mycorrhizal plants. Boca Raton, CRC Press, p. 107-134, 1987.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 43, n. 6, p. 1274-1279, 1971.
- JIN, H.; PFEVER, P. E.; DOUDS, D. D.; PIOTROWSKI, E.; LAMMERS, P. J.; SHACHAR-HILL, Y. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* v. 168, p. 687-696. 2005.
- JOHANSEN, A.; FINLAY, R. D.; OLSSON, P. A. Nitrogen metabolism of the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist.* v.133, p.705-712. 1996.
- JORGE, L. A. C.; CRESTANA, S. SIARCS 3.0: Novo aplicativo para análise de imagens digitais aplicado à ciência do solo. In: XII Congresso Latino Americano de Ciência do Solo; I Reunião Brasileira de Biologia do Solo; IV Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia Do Solo; 1996, Águas de Lindóia, SP. *Resumos...* Águas de Lindóia, SP: USP/SLCS/SBCS, 1996. 5 p. CD ROM.
- JOUANIN, L.; BRASILEIRO, A. C. M.; LEPLÉ, J. C.; PILATE, G.; CORNU, D. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. *Annu. Sci. For.*, v. 50, p. 325-336, 1993.
- JULLIARD, J.; PELESE, F.; SOTTA, B.; MALDINEY, R.; PRIMARD-BRISSET, C.; JOUANIN, L.; MIGINIAC, E. T<sub>L</sub>-DNA transformation decreases ABA level. *Physiol. Plant.*, v. 88, p. 654-660, 1993.
- KALDORF, M.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H. Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* v. 11, p. 439-448. 1998.
- KANE, P. M. The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, v. 70, p. 177-191. 2006.
- KARANDASHOV, V.; BUCHER, M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.*, v. 10, p. 22-29. 2005.
- KARUNARATNE, R. S.; BAKER, J. H.; BAKER, A. V. Benefits of mycorrhizae to soybean grown on various regimes of nitrogen nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, v. 10, n. 8, p. 871-886, 1987.
- KASAI, M.; SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress increase H<sup>+</sup> efflux and activities of ATP- and PPI- dependent H<sup>+</sup> pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots. *Plant cell physiol.* V.33, p. 1035-1039, 1992.
- KARANDASHOV, V.; KUZOVKINA, I.; HAWKINS, H. J.; GEORGE, E. Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. *Mycorrhiza*, v. 10, p. 23-28. 2000.
- KAUSHIK, P.; GARG V. K. Dynamics of biological and chemical parameters during vermicomposting of solid textile mill sludge mixed with cow dung and agricultural residues. *Bioresource Technology*, v. 94, p. 203-209. 2004
- KHADEMI, S.; O'CONNELL, J.; REMIS, J.; ROBLES-COLMENARES, Y.; MIERCKE, L. J. W.; STROUD, R. M. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35Å. *Science.* v. 305, p. 1587-1594. 2004.
- KLYCHNIKOV, K.; LI, W.; LILL, H.; BÔER, A. The V-ATPase from etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) shoots is activated by blue light and interacts with 14-3-3 proteins. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, n. 5, p. 1013-1023. 2007.
- KLUGE, C.; LAHR, J.; HANITZSCH, M.; BOLTE, S.; GOLLDACK, D.; DIETZ, K. J. New Insight into the Structure and Regulation of the Plant Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* v.35, n. 4, p. 377-388. 2003.

- KÖGEL-KNABER, I.  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. *Geoderma*, Amsterdam, v. 80, p. 243-270, 1997.
- KONONOVA, M. M. *Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona: Oikos-tau s.a.; 364 p. 1982.
- KONONOVA, M. M. *Soil organic matter*. Oxford: Pergamon, 1966. 106 p.
- KUMADA, K. *Chemistry of soil organic matter*. Tokyo, Japan: Scientific Societies Press, 1987. 241 p.
- KUNZ, A.; LOVATO, P.E. Colonização micorrízica e crescimento de plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) após micropropagação em meios com diferentes concentrações de sacarose. *Resumos. FERTBIO-98; XXIII Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição Mineral de Plantas; VII Reunião Brasileira de Micorrizas; V Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo e II Reunião Brasileira de Biologia do Solo*. Caxambú, MG. p. 197. 1998.
- LAINÉ, P.; OURRY, A.; BOUCAUD, J. Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: Effects of localized nitrate supply. *Planta*, Berlin, v. 196, p. 77-83, 1995.
- LAM, H.-M.; COSCHIGANO, K.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; TJADEN, G.; OLIVEIRA, I.; NGAI, N.; HSIEH, M.-H.; CORUZZI, G. Use of arabidopsis mutants and genes to study amide and amino acid biosynthesis. *Plant Cell*, v. 7, p. 887-898, 1995.
- LARSSON, C.; WIDELL, S.; KIELLBOM, P. Preparation of high purity plasma membranes, *Method Enzymol.*, v. 148, p. 558-568. 1987.
- LEE, S. H.; SINGH, A. P.; CHUNG, G. C.; AHN, S. J.; NOH, E. K.; STEUDLE, E. Exposure of roots of cucumber (*Cucumis sativus*) to low temperature severely reduces root pressure, hydraulic conductivity and active transport of nutrients. *Plant Physiol.*, v. 120, p. 413-420. 2004.
- LI, J.; YANG, H.; PEER, W. A.; RICHTER, G.; BLAKESLEE, J. J.; BANDYOPADHYAY, A.; TITAPIWANTAKUN, B.; UNDURRAGA, S.; KHODAKOVSKAYA, M.; RICHARDS, E. L. Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin mediated organ development. *Science*, v. 310, p. 121-125. 2005.
- LIMA, W. L.; TAVARES, G. C. M. B.; LIMA, A. A.; MATIAS, G. C. S.; SOUZA, S. R. Teores de nitrogênio e crescimento de raízes transformadas de trevo cultivadas em meio mínimo. In: XXIX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, *Resumos*. 2003, Ribeirão Preto. 2003.
- LIMA, W. L. *Fungos Micorrízicos Arbusculares: Bioquímica e Morfologia da Interação com Ácidos Húmicos e sua Multiplicação em Aeroponia*. Seropédica, 2004. 99 f, Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, UFRRJ, 2004.
- LIMA, W. L.; OLIVEIRA, J. R.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; RAPOSO, T. P.; ALVES, G. C.; SILVA, E. M. R.; BERBARA, R. L. L. Editoração de imagens para avaliação do crescimento de plantas ou microrganismos com o programa SIARCS<sup>®</sup>. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 2006. 32 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 14). Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/bot014.pdf>
- LOGAN, H.; BASSET, M.; VERY, A.-A.; SENTENAC, H. *Plant. Physiol.*, v. 100, p. 1-15. 1997.
- LINDSEY, K. Plant tissue culture manual. Department of Botany-University of Leicester. *Kluwer Academic Publishers Dordrecht*, London. Supplement 3, February. 1998.
- LINEHAN, D. J.; SHEPHERD, S. A comparative study of the effects of natural and synthetic ligands on iron uptake by plants. *Plant and Soil*, v. 52, p. 281-289. 1979.
- LOQUÉ D.; LUDEWIG U.; YUAN L.; von WIRÉN N. Tonoplast Intrinsic Proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole. *Plant Physiology*, v. 137, p. 671-680. 2005.
- LOUREIRO, D. C.; AQUINO, A. M.; ZONTA, E.; LIMA, E. Compostagem e vermicompostagem de resíduos domiciliares com esterco bovino para a produção de insumo orgânico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.42, n.7, p.1043-1048. 2007.

- LUO, H.; MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The two major types of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases show different enzymatic properties and confer differential pH sensitivity of yeast growth. *Plant Physiol.* v. 119, p. 627–34. 1999.
- LUTSENKO, S.; KAPLAN, J. H. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry.* v. 34, p. 15607–15613. 1995.
- MAATHUIS, F. J.; FILATOV, V.; HERZYK, P.; KRIJGER, G. C.; AXELSEN, K. B.; CHEN, S.; GREEN, B. J.; LI, Y.; MADAGAN, K. L.; SANCHEZ-FERNANDEZ, R. Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Plant J.*, v. 35, p. 675-692. 2003.
- MACIEL, A. L. R.; CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; SPERA, M. R. N. Influência do ácido indol butírico no enraizamento *in vitro* de explantes de *Saintpaulia ionantha* WENT. *Resumos.* V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. UFLA, Lavras MG. p. 124. 1995.
- MAESHIMA, M. Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica*, Amsterdam, v. 1465, p. 37-51, 2000.
- MAESHIMA, M.; MIMURA, T.; SATO, T. Distribution of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and the membrane integral protein in a variety of green plants. *Plant Cell Physiol.* v. 35, p. 323-328. 1994.
- MAGGIONI, A.; VARANINI, Z.; NARDI, S.; PINTON, R. Action of soil humic matter on plant roots: stimulation of ion uptake and effects on (Mg<sup>2+</sup> + K<sup>+</sup>) ATPase activity. *Science of the Total Environment*, v. 62, p. 355-363. 1987.
- MAHESHARI, S. C. Tissue culture, molecular biology and plant biotechnology - a historical review. In the impact of biotechnology in agriculture; SANGWAN, R. S.; SANGWAN-NORREEL, B. S. (Eds.): *Kluwer Academic Publishers*. The Netherlands. p. 1-12. 1990.
- MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 394, p. 27-34, 2004.
- MARTIN, D.; SRIVASTAVA, P. C.; GHOSH, D.; ZECH, W. Characteristics of humic substances in cultivated and natural forest soil of sikkin. *Geoderma*, Amsterdam, v. 84, p. 345-362, 1999.
- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. London: Academic Press. 1995.
- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil*, v. 159, p. 89-102. 1994.
- MARTZ, F.; SUTINEN, M. L.; KIVINIEMI, S.; PALTA, J. P. Changes in freezing tolerance, plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity and fatty acid composition in *Pinus resinosa* needles during cold acclimation and de-acclimation. *Tree Physiol.*, v. 26, p. 783-790. 2006.
- MASCIANDARO, G.; CECCANTI, B.; GARCIA, C. Soil agro-ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores Technol*, v. 59, p. 199-206. 1999.
- MATSUOKA, K.; HIGUCHI, T.; MAESHIMA, M.; NAKAMURA, K. A vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell*, v. 9, p. 533-546. 1997.
- McGONIGLE, T. P.; FITTER, A. H. Ecological specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations. *Mycological Research*, Cambridge, v. 94, p. 120-122, 1990.
- McGONIGLE, T. P.; MILLER, M. H.; EVANS, D. G.; FAIRCHILD, G. L.; SWAN, J. A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytology*, v. 115, p. 495-501. 1990.
- MICHELET, B.; BOUTRY, M. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. A highly enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol*, v. 108, p. 1-6. 1995.



- MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. *Microbiological Review*, v. 59, p. 604-622, 1995.
- MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed). *Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, p. 01-08. 1999.
- MIMURA, H.; NAKANISHI, Y.; HIRONO, M.; MAESHIMA, M. Membrane topology of the H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of *Streptomyces coelicolor* determined by cysteine-scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* v. 279, p. 35106-35112. 2004.
- MITSUDA, N.; ENAMI, K.; NAKATA, M.; TAKEYASU, K.; SATO, M. H. Novel type *Arabidopsis thaliana* H<sup>+</sup>-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* v. 488, p. 29-33. 2001.
- MOHAMMAD, A.; MITRA, B.; KHAN, A. G. Effects of sheared-root inoculum of *Glomus intraradices* on wheat grown at different phosphorus levels in the field. *Agriculture Ecosystems & Environment*. v. 103, p. 245-249. 2004.
- MOLLER, J. V.; JULL, B.; LE MAIRE, M. Structural organization, ion transport and energy transduction of P-type ATPases, *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1286, p. 1-51. 1996.
- MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica*, Amsterdam, v. 1465, p. 1-16, 2000.
- MOSSE, B.; STRIBLEY, D. P.; LETACON, F. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi, *Microbial Ecology*, New York, v. 5, p. 137-162, 1981.
- MORTON, J. B.; BENNY, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon*, v. 37, p. 471-491. 1990.
- MOSSE, B.; HEPPEL, C. M. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ culture. *Physiol. Plant Pathol.* v. 5, p. 215-223. 1975.
- MUGNIER, J.; MOSSE, B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology*, St. Paul, v. 77, p. 1045-1050, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, v. 15, p. 473-497. 1962.
- MUSCOLO, A.; NARDI, S. Effetti di due frazioni umiche sul metabolismo azotato de cellule di *Daucus carota*. IV Convegno Nazionale dell' IHSS, Le ricerche di base e le applicazioni delle sostanze umiche alle soglie del 2000. Italy, p 103-106. 1999.
- MUSCOLO, A.; BOVALO, F.; GIONFRIDDO, F.; NARDI, S. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol Biochem*, v. 31, p. 1303-1311. 1999.
- MUSCOLO, A.; FELICIM, M.; CONCHERI, G.; NARDI, S. Effect of earthworm humic substances on estrase and peroxidase activity during growth of leaf explants of *Nicotina plumbaginifolia*. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 15, p. 125-131.1993.
- NAIR, J.; SEKIOZOIC, M. Effect of pre-composting on vermicomposting of kitchen waste. *Bioresources Technology*, v.16, p.2091-2095, 2006.
- NANNIPIERI, P.; GREGO, S.; DELL'AGNOLA, G.; NARDI, S. Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. In NANNIPIERI, P (Ed.): *Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici & selvicolturali*. Bologna: Patron Editore, p. 67-78. 1993.
- NARDI, S.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; BAIANO, S.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 39, p. 3138–3146. 2007.

- NARDI, S., PIZZEGHELLO, D., MUSCOLO, VIANELLO, A. Physiological effects os humic substances on higher plants. *Soil Biology & Biochemistruy*. n. 34. p. 1527-1536. 2002.
- NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; GESSA, G.; FERRARESE, L.; TRAINOTTI, L.; CASADORO, G. A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis en maize seedlings. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 32, p. 415-419, 2000.
- NARDI, S.; CONCHERI, G.; PIZZEGHELLO, D.; STURARO, A.; RELLA, R.; PARVOLI, G. Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere*, v. 41, p. 653-658. 2000.
- NARDI, S.; CONCHERI, G.; DELL'AGNOLA, G. Biological activity of humic substances. In: Piccolo, A. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, p. 361-406. 1996.
- NARDI, S.; CONCHERI, G.; DELL'AGNOLA, G.; SCRIMIN, P. Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 23, p. 833-836, 1991.
- NARDI, S.; ARNOLDI, G.; DELL'AGNOLA, G. Release of the hormone-like activities from *Allophobora rosea* (sav.) and *Allophobora caliginosa* (sav.) feces. *Can. J. Soil Sci.*, v. 68, p. 563-567, 1988.
- NEWSHAM, K. K.; FITTER, A. H.; WATKINSON, A. R. Multifunctionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology & Evolution*, Amsterdam, v. 10, n.10, 1995.
- NICOMEDES JUNIOR, J. *Produção de raízes transformadas por infecção com Agrobacterium rhizogenes em diferentes espécies vegetais*. 2003. 82 p, Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- OLIVEIRA, J. R.; ALVES, G. C.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.; RESENDE, L. V. Uso do software SIARCS para avaliação do crescimento de abacaxi inoculados com fungos micorrízicos arbusculares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29.; Ribeirão Preto, 2003. *Resumos...* Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 4 p. CD ROM.
- OJIMA, K.; OHLRA, K. Nutritional requirements of callus and cell suspension cultures. In: THORPE, T. A. (Ed.), *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary, University of Calgary, p. 265-275, 1978.
- ORLOV D. S. *Humic substances of soils and general theory of humification*. A.A. Balkema, Rotterdam, 1995.
- ORLOV, D. S. *Humus Acids of Soils*. A. A. Balkema/Rotterdam, 1985.
- OROZCO, F.H.; CEGARRA, J.; TRUJILLO, L.M.; ROIG, A. Vermicomposting of coffee pulp using the earthworm *Eisenia foetida*: effects on C and N contents and the availability of nutrients. *Biology and Fertility of Soils*, v.22, p.162-166, 1996.
- ORTAS, I.; HARRIS, P. J.; ROWELL, D. L. Enhanced uptake of phosphorus by mycorrhizal sorghum plants as influenced by forms of nitrogen, *Plant and Soil*, Hague, v. 184, p. 255-264, 1996.
- PALMGREN, M. G. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for nutrition uptake. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 52, p. 817-845, 2001.
- PALMGREN, M.G. Proton gradients and plant growth: Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Adv. Bot. Res.*, v. 28, p. 1-70. 1998.
- PALMGREN, M. G. Regulation of plasma membrane HC-ATPase activity. *Physiol. Plant*. v. 83, p.314-23. 1991.
- PALMGREN, M. G.; LARSSON, C.; SOMMARIN, M. Proteolytic activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by removal of a terminal segment. *J. Biol. Chem.* v. 265, p. 13423-13426. 1990.

- PAULA, M. A.; SIQUEIRA, J. O. Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension-cultured *Pueraria phaseoloides* cells and cell products. *The New Phytologist*, London, v. 115, p. 69-75, 1990.
- PAULA, M. A.; SIQUEIRA, J. O. A adição de nitrato de amônio e superfosfato triplo e a simbiose *Glycine Bradyrhizobium-Glomus macrocarpum*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 13, p. 155-162, 1989.
- PEDERSEN, P. L.; CARAFOLI, E. Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 12, p. 186-189, 1987.
- PEREIRA, E. W.; AZEVEDO, C. M. S. B. Produção de vermicomposto em diferentes proporções de esterco bovino e palha de carnaúba. *Caatinga*, v.18, p.112-116, 2005.
- PEREIRA, E. G.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N.; MOREIRA, F. M. S.; PURCINO, A. A. C. Efeitos da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 8, p. 59-65, 1996.
- PINTON, R.; CESCO, S.; IACOLETTIG, G.; ASTOLFI, S.; VARANINI, Z. Modulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 215, p. 155-161, 1999.
- PINTON, R.; CESCO, S.; SANTI, S.; VARANINI, Z. Soil humic substances stimulate proton release by intact oat seedling roots. *Journal of Plant Nutrition*, v. 20, p. 857-869, 1997.
- PINTON, R.; VARANINI, Z.; VIZZOTTO, G.; MAGGIONI, A. Soil humic substances affect properties of tonoplast vesicles isolated from oat roots. *Plant and Soil*, v. 142, p. 203-210, 1992.
- PLASSARD, C.; MARTIN, F.; MOUSAIN, D. SALSAC, L. Physiology of nitrogen assimilation by micorrhiza. IN: GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. (Eds.) *Physiological genetical aspects of mycorrhizae*. INRA. p.111-120, 1986.
- QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. 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.*, v. 55, p. 803-813, 2004.
- QUORESHI, A.; AHMAD, I.; MALLOCH, D.; HELLEBST, J. A. Nitrogen metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*. *New Phytologist*, v. 131, p. 263-271, 1995.
- RAMOS, A. C.; MARTINS, M. A.; FAÇANHA, A. R. . Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microsomas de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 29, n. 2, p. 207-213, 2005.
- RAPOSO, T. P.; DOBBSS, L. B.; FERNANDES, M. V. L.; SOUZA, J. L. P.; LIMA, W. L.; BERBARA, R. L. L. Frações húmicas em áreas sob sucessão vegetal. In: XXVI Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. X Reunião Brasileira Sobre Micorrizas. VIII Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo. V Reunião Brasileira de Biologia do Solo. 2004, Lages - SC. CD ROM. FERTBIO. 2004.
- RATAJCZAK, R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar  $\text{H}^+$ -Translocating ATPase. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1465, p. 17-36, 2000.
- RAUSCH, C.; DARAM, P.; BRUNNER, S.; JANSKA, J.; LALOL, M.; LEGGEWIE, G.; AMRHELN, N.; BUCHER, M. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature*, v. 414, p. 462-466, 2001.
- RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, Rockville, v. 99, p. 1271-1274, 1992.
- REA, P. A.; POOLE, R. J. Vacuolar  $\text{H}^+$ -translocating pyrophosphatase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.44, p.157-180, 1993.

- REA, P. A.; KIM, Y.; SARAFIAN, V.; POOLE, R. J.; DAVIES, J. M.; SANDERS, D. Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends Biochem Sci.*, v. 17, p. 348-353, 1992.
- REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, v. 289, p.1920-1921. 2000.
- REMY, W.; TAYLOR, T. N.; HASS, H.; KERP, H. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 91, p. 11841-11843. 1994.
- RICE, J. A.; MACCARTHY, P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Organic Geochemistry*, v. 17, p. 635-648. 1991.
- RILLIG, M. C.; WRIGHT, S. F.; EVINER, V. T. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil*, v. 238, p. 325-333. 2002.
- ROBERTS, D. M. & TYERMAN, S. D. Voltage-dependent cation channels permeable to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> in the symbiosome membrane of the model legume lotus japonicus. *Plant Physiology*, v. 128, n. 2, p. 370-378. 2002.
- RODDA, M. R. C.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R.; ZANDONADI, D. B.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L.; SANTOS, G. A. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto I: efeito da concentração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, p. 649-656, 2006.
- RODDA, M. R. C.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R.; ZANDONADI, D. B.; ALMEIDA, D. L.; GUERRA, J. G. M.; SANTOS, G. A. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto II: efeito da fonte de vermicomposto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, p. 657-664, 2006.
- RÖMHELD, V.; MULLER, C.; MARSCHNER, H. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiol*, v.76, p. 603-606. 1984.
- SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; RESENDE, J. M.; SILVA, D. J. Efeito de micorrizas arbusculares e matéria orgânica no cultivo de espécies arbóreas sobre rejeito de mineração de cobre. In: XXIV Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas; VIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, VI Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2000, Santa Maria-RS. *Biodinâmica do solo...* Santa Maria: SBCS, SBM, 2000. 216p. CD ROM. FERTBIO 2000a.
- SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; RESENDE, J. M.; SILVA, D. J. Efeito de micorrizas arbusculares e níveis de matéria orgânica no crescimento e nutrição fosfatada de algarova em rejeito de mineração de cobre. In: XXIV Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas; VIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, VI Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2000, Santa Maria-RS. *Biodinâmica do solo...* Santa Maria: SBCS, SBM, 2000. 216p. CD ROM. FERTBIO 2000b.
- SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SIQUEIRA, J. O.; GUIMARÃES, P. T. G.; OLIVEIRA, E. Interação fungos micorrízicos versus superfosfato e seus efeitos no crescimento e teores de nutrientes do cafeeiro em solo não fumigado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v. 18, n. 1, p. 27-36, 1994.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in maize roots induced for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake, *Plant Physiol*, v. 109, p. 1277-1283. 1995.
- SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. (Eds.). *Fundamentos da Matéria orgânica do solo*. 2. ed. Porto Alegre, v. 1. 654p. 2008.

- SANTOS, L. A. *Absorção e Remobilização de  $\text{NO}_3^-$  em Arroz (*Oryza sativa* L.): Atividade das Bombas de Prótons e a Dinâmica do Processo*. 88 f. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, UFRRJ, 2006.
- SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. *Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, 1999. 544 p.
- SANTOS, G. A. *Contribution a l'étude des interaction matière organique et phosphore dans un sol ferrallitique*. 1984. 147 f. Tese (Doutorado em Engenharia-Ciência do Solo) INPL, Nancy, France.
- SCHACHTMAN, D.; REID, R.; AYLING, S. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol*, v. 116, p. 447-453. 1998.
- SCHNITZER, M. *Organic matter characterization*. In: PAGE, A. L. (Ed.). *Methods of soil analysis*. Madison: American Society of Agronomy, p. 581-594. 1982.
- SCHNITZER, M.; GUPTA, V. C. Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Science Society of America Proceedings*, Madison, v. 27, 1965.
- SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. *Soil organic matter*. Amsterdam: Elsevier, 1978. 319p.
- SCHONTZ, D.; ROBIN, C.; GUCKERT, A. Study of the two pathways of nitrogen nutrition in white clover (*Trifolium repens* L.): nitrogenase and nitrate reductase activities. Proceedings of the XVI International Grassland Congress, Nice, France. p. 491-492, 1989.
- SERRANO, R. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v. 40, p. 61-94. 1989.
- SELLE, A.; WILLMANN, M.; GRUNZE, N.; GEßLER, A.; WEIß, M.; NEHLS, U. The high-affinity poplar ammonium importer PttAMT1.2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* v. 168, p. 697-706. 2005.
- SERRANO, R.; MONTESINOS, C.; SANCHEZ, J. Lipid requirements of the plasma membrane ATPase from oat roots and yeast. *Plant Science*, v. 56, p. 117-122. 1988.
- SERRANO, R. Purification of the proton-pumping ATPase from plant plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 121, p. 735-740. 1984.
- SIEVERDING, E. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical Cooperation, Federal Republic of Germany, *Eschborn*. 317p. 1991.
- SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LEVESQUE, R. C.; LALONDE, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. v. 363, p. 67-69. 1993.
- SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T. D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol*, v. 58, p. 291-295. 1992.
- SILVA, L. R. C.; SILVEIRA, A. P. D.; AZEVEDO, L. C.; OLIVEIRA, E.; FOLTRAN, D. E. Influência de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de mudas de mamoeiro, em substrato com e sem matéria orgânica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 24.; 1993, Goiânia. *Cerrados: Fronteira Agrícola no Século XXI. Resumos...* Goiânia: SBCS, v. 1. p. 363-364. 1993.
- SIMONEAU, P.; LOUISY-LOUIS, N.; PLENCHETTE, C.; STRULLU, D. G. Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Appl. Environmental Microbiology*. v. 60. p. 1810-1813, 1994.
- SIQUEIRA, J. O. Cultura axênica e monoxênica dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. In: Reunião Brasileira de micorrizas, 2., São Paulo. *Resumos...* Secretaria de Meio Ambiente e da Agricultura. p. 44-70. 1987.

- SIQUEIRA, J. O.; HUBBELL, D. H.; VALLE, R. R. Effect of phosphorus on formation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 2, p. 1465-1474, 1984.
- SKJEMSTAD, J. O.; JANIK, L. J.; TAYLOR, J. A. Non-living soil organic matter: what do we know about it? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v.38, p.667-680, 1998.
- SMITH, E.; St. JOHN, B. J.; SMITH, F. A.; NICHOLAS, D. J. D. Activity synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytol.*, v. 99, p. 211-227. 1985.
- SMITH, F. A.; RAVEN, J. A. Intracellular pH and its regulation. *Annual Rev Plant Physiol*, v. 30, p. 289-311. 1979.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London. 1997.
- SMITH SE, GIANINAZZI-PEARSON V, KOIDE R, CAIRNEY JWG. Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant and Soil* v. 159, p. 103-113. 1994.
- SMITH, S.E. Transport at the mycorrhizal interface. *Mycorrhiza News*, v.5, n.1, p.1-4. 1993.
- SONNTAG, C. The role of nonliving organic matter in soils. In: ANDERSON, D. W.; ZEPP, R. G.; (Ed.) *The role of nonliving organic matter in the Earth's carbon cycle*. Berlin: J. Wiley, p. 81-92.1995.
- SOUZA, S. R.; SOUZA, E. S.; BERBARA, R. L. L. ; FERNANDES, M. S.; STARCK, M. L. Enzymes of Nitrogen Metabolism and Proteases Activity in Hairy Roots of Clover and Carrots, with and without Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Journal of Plant Nutrition*, v. 30, p. 1185-1204, 2007.
- SOUZA, S. R. ; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: Fernandes, M. S. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 215-252, 2006.
- SOUZA, E. S.; STARK, E. M. L. M.; BERBARA, R. L. L.; MAGALHÃES, J. R.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Growth, and Accumulation of Nitrogen and Soluble Sugars in Growth, and accumulation of nitrogen and soluble sugars in carrot and clover hairy roots in two culture media with and without arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, India, v. 12, n. 1, p. 29-33, 2006.
- SOUZA, E. S.; STARK, E. M. L. M.; SOUZA, S. R.; FONSECA, H. M. C.; BERBARA, R. L. L. Protease activity and desenvolvimento in *Daucus carota* and *Trifolium repens* hairy roots in culture media containing different nitrogen source and levels. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 8 (2): 251-259. 2002.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; MAGALHÃES, J. R. Effects of Supplemental Nitrogen on Nitrogen-Assimilation Enzymes, Free Amino Nitrogen, Soluble Sugars, and Crude Protein of Rice. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, New York, US., v.30, n.5 & 6, p.711-724, 1999.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M. & FERNANDES, M. S. Nitrogen Remobilization During the Reproductive Period in Two Brazilian Rice Varieties. *Journal of Plant Nutrition*, New York, US, v.21, n.10, p.2049-2063, 1998.
- SOUZA, F. A.; BERBARA, R. L. L. Desenvolvimento de esporos de *Glomus clarum* (Nicolson and Schenck) e raízes Ri T DNA transformadas. In: *Congresso Brasileiro de Ciência do Solo*, 26.; Rio de Janeiro: SBCS, 1997, 5p. Seção Temática 3. 1 CD-Rom. 1997.
- SOUZA, S. R. *Efeitos da aplicação foliar de nitrogênio pós-antese sobre as enzimas de assimilação de N e acúmulo de proteínas em grãos de arroz*. 1995. 152 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 1995.

- St. JOHN, B. J.; SMITH, S. E.; NICOLAS, D. J. D.; SMITH, F. A. Enzymes of ammonium assimilation in the mycorrhizal fungus *Pezizella ericae* Read. *New Phytologist*, v.100, n.4, p. 579-584, 1985.
- STEELINK, C. *Implications of elemental characteristics of humic substances*. In: AIKEN, G.R.; McKNIGHT, D.M.; WERSHOW, R.L.; MACCARTHY, P. (Ed.). *Humic substances in soil, sediment and water*. New York: J. Wiley, 1985. p.457-476.
- STEVENSON, F. J. *Humus chemistry*. Mississauga, Canada: J. Wiley & Sons, 1982. 443p.
- STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley, 1994. 402 p.
- STEVENSON, F. J.; COLE, M. A. Cycles of soil, carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. New York: John Wiley & Sons, p.5-45.1999.
- STEVENSON, F. J.; GOH, K. M. INFRARED SPECTRA OF HUMIC ACIDS AND RELATED SUBSTANCES. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 35, n. 5, p. 471. 1971.
- STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; SMITH, J. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *Am. Journal Botany*. v. 45. p. 693-703. 1958.
- STILES, K. MCCLINTICK, A.; VOLKENBURGH, E. A developmental gradient in the mechanism of K<sup>+</sup> uptake during light-stimulated leaf growth in *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, v. 217, p. 587-596. 2003.
- STITT, M. Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Bot. Acta*, 111:167-175, 1998.
- STITT, M.; SONNEWALD, U. Regulation of metabolism in transgenic plants. Annual Review Plant Physiology. *Plant Mol. Biol.* 46: 341-368, 1995.
- STEVENS, T. H.; FORGAC, M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 13, p. 779-808. 1997.
- STROMPEN, G.; DETTMER, J.; STIERHOF, Y. D.; SCHUMACHER, K.; JURGENS, G.; MAYER, U. Arabidopsis vacuolar HATPase subunit E isoform 1 is required for Golgi organization and vacuole function in embryogenesis. *Plant Journal*. 41, 125–132. 2005.
- SUBRAMANIAN KS, CHAREST C. Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Physiologia Plantarum*. v. 102, p. 285–296. 1998.
- SUSSMAN, M. R. Molecular analysis of proteins in the plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 211-234. 1994.
- SWIFT, R. S. *Organic matter characterization*. In: SPARKS, D. L.; PAGE, A. L.; HELMKE, P. A.; LOEPPERT, R. H.; SOLTANPOUR, P. N.; TABATABAI, M. A.; JOHNSTON, C. T.; SUMNER, M. E. (Eds.) *Methods of soil analysis: chemical methods*. Vol. 3. Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, Madison. (SSSA. Book Series, 5). p. 1011-1020. 1996.
- SYLVIA, D. M.; JARSTFER, A. G. Production of inoculum and inoculation with arbuscular Mycorrhizal fungi. In: ROBSON, A. D.; ABBOTT, L. K. ; MALAJCZUK, N. (Ed.) *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry*. Netherlands: Kluwer, p. 231-238. 1994.
- SZE, H. H<sup>+</sup>-Translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *NU Rev. Plant Physiol.* v. 36, p. 175-208, 1985
- SZE, H.; LI, X.; PALMGREN, M. G. Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup> pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *The Plant cell*, v.11, p 677-689, 1999.
- SZE, H.; SCHUMACHER, K.; MULLER, M. L.; PADMANABAN, S.; TAI, L. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase. *Trends Plant Science*. 7, 157-161. 2002.

- TAN, K. H. *Humic Matter in Soil and the Environment: Principles and Controversies*. New York basel, New York: Marcel Dekker, INC., 386p. 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.
- TANNER, W.; CASPARI, T. Membrane transport carriers. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:595-626, 1996.
- TAWARAYA, K. SAITO, M. MORIOKA, M.; WAGATSUMA, T. Effect of concentration of phosphate on spore germination and hyphal growth of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v. 42, p. 667-671, 1996.
- THENG, B. K. G.; TATE, K. R.; SOLLINS, P. Constituents of organic matter in temperate and tropical soils. In: COLEMAN, D. C.; OADES, J. M.; UEHARA, G.; (Ed.). *Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems*. Honolulu: University of Hawaii, 1989. p. 5-32.
- TIDSDALL, J. M. Possible role of soil microorganisms in aggregation of soils. *Plant and Soil*, 159: 115-121, 1994.
- TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment*. v.23, p.1005-1024, 2000.
- TISDALL, J. M.; OADES, J. M. Stabilization of soil aggregates by the root systems of ryegrass. *Australian Journal of Soil Research* 17: 429-441. 1979.
- TOGNETTI, C.; LAOS, F.; MAZZARINO, M.J.; HERNANDES, M.T. Composting vs. vermicomposting: a comparison of end product quality. *Compost Science & Utilization*, v. 13, p. 6-13, 2005.
- TOMATI, U.; GALLI, E.; PASETTI, L.; VOLTERRA, E. Bioremediation of olive-mill wastewaters by composting. *Waste Management and Research*, v.13, p.509-518, 1995.
- TOMMERUP, I. C.; KIDBY, D. K. Production of aseptic spores of vesicular-arbuscular endophytes and their viability after chemical and physical stress. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 39, p. 1111-1119. 1980.
- TRAPPE, J. M. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: SAFIR, G. R., (Ed.) *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. Boca Raton: CRC, p. 5-25. 1987.
- VALE, F. R., GAZELLI, E. M. F., FURTINI NETO, A. E.; FERNANDES, L. A. Cultivo do feijoeiro em solução nutritiva sob proporções variáveis de amônio e nitrato. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. v. 22. p. 35-42. 1998.
- VAN AARLE, I. M.; SODERSTROM, B.; OLSSON, P. A. Growth and interactions of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from limestone and acid rock habitats. *Soil Biology & Biochemistry*. v. 35, p. 1557-1564. 2003.
- VARANINI, Z., PINTON, R. *Humic substances and plant nutrition*. In: LÜTTGE, U. (Ed.), *Progress in Botany* 56. Springer, Berlin. 1995.
- VARANINI, Z.; PINTON, R. Direct versus indirect effect of soil humic substances on plant growth and nutrition. In: PINTON, R., VARANINI, Z., NANNIPIERI, P. (Eds.), *The Rhizosphere*. Marcel Dekker, Basel, pp. 141-158. 2001.
- VARANINI, Z.; PINTON, R.; DE BIASE, M. G.; ASTOLFI, S.; MAGGIONI, A. Low molecular weight humic substances stimulate H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 153, p. 61-69, 1993.
- VARMA, A. Ecophysiology and application of arbuscular mycorrhizal fungi in arid soils. In: VARMA, A.; HOCK, B. *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Berlim, p.561-591, 1995.



- VAUGHAN, K. C.; CAMPBELL, W. H. Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiology*, v. 88, p. 1354-1357, 1988.
- VAUGHAN, D. *Effetto delle sostanze umiche sui processi metabolici delle piante*. In: BURNS, R. G.; DELL'AGNOLA, G.; MIELE, S.; NARDI, S.; SAVOINI, G.; SCHNITZER, M.; SEQUI, P.; VAUGHAN, D.; VISSER, S. A. (Eds.). *Sostanze Umiche effetti sul terreno e sulle piante*. Roma, Italy: Ramo Editoriale degli Agricoltori, p. 59-81. 1986.
- VAUGHAN D.; MALCOLM, R. E. Influence of humic substances on growth and physiological process. In: VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. (Ed.) *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht: Kluwer, p. 37-75. 1985.
- VAUGHAN, D. MACDONALD, I. R. Effects of humic acids on protein synthesis and ion uptake in beet roots. *J. Exp. Bot.*, v. 22, p. 400-410, 1971.
- VISSER, S. A. Effetto delle sostanze umiche sulla crescita della piante. In: VAUGHAN, D.,; MALCOM, R. E. (Eds.), *Soil Organic Matter and Biological Activity*. Martinus Nijhoff, Dordrecht/Dr junk W. Publishers, Dordecht, The Netherlands, pp. 77-108. 1986.
- VON DER FECHT-BARTENBACH J.; BOGNER M.; KREBS M.; STIERHOF Y.; SCHUMACHER K.; LUDEWIG U. Function of the anion transporter AtCLC-d in the trans-Golgi network. *Plant Journal*. 2007.
- WASEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Eds.) *Plant roots - The hidden half*. Madison, Marcel Dekker, 2002. 1120p.
- WAKSMAN, S. A. *Humus, origin, chemical composition and importance in nature*. Ballière. London: Tindall & Cox, 1936.
- WALLACE, A. Soil organic matter is essential to solving soil and environmental problems. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.25, p.15-28, 1994.
- WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol*, v. 9, p. 585-600. 1934.
- WILLIAMS, P. G. Axenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi. *Methods in Microbiology*, v. 24, p. 203-220, 1992.
- WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters Responsible for the Uptake and Partitioning of Nitrogenous solutes. *Annual Review In Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, CA-USA, v.52, p.659-688, 2001.
- WIGAND, C.; STEVENSON, C. Facilitation of phosphate assimilation by aquatic mycorrhizae of *Vallinaria amaricana* Michx. *Hydrobiologia*, 342/343, p. 35-41, 1997.
- WIRÉN, N. V.; GAZZARRINI, S.; FROMMER, W. B. Regulation of mineral uptake in plants. *Plant and Soil*, v.196, p.191-199, 1997.
- YAGI, R.; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P.; BARBOSA, J. C. Organic matter fractions and soil fertility under the influence of liming, vermicompost and cattle manure. *Sci. Agric.*, 60: 549-557. 2003.
- YAN, F.; SCHUBERT, S.; MENGEL, K. Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiology*, v. 99, p. 415-421. 1992.
- YAN, F.; ZHU, Y.; MÜLLER, C.; ZÖRB, C.; SCHUBERT, S. Adaptation of H<sup>+</sup>-Pumping and Plasma Membrane H<sup>+</sup>ATPase Activity in Proteoid Roots of White Lupin under Phosphate Deficiency. *Plant Physiology*, v. 129, p. 50-63. 2002.
- YATAZAMA, M.; FURUHASHI, K. Nitrogen source for the growth of rice calls tissue. *Soil Science Plant Nutrition*. n. 4, p. 73-79. 1968.

- YEMM, E. W.; COCCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, v. 80, p. 209-213, 1955.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemistry Journal*, v. 57, p. 508-514, 1954.
- ZHANG, Y.; WANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; WEI, Q.; ZHANG, W. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in the tonoplast. *Planta* 224, 545–555. 2006.
- ZANDONADI, D. B.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta*, v. 225, p. 1583-1595, 2007.
- ZAMBOLIN, L.; REIS, M. A.; COSTA, L. M. Substratos para a multiplicação de inóculo do fungo micorrízico vesículo-arbuscular *Glomus etunicatum*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 17, p. 28-31, 1992.
- ZAMBRYSKI, P.; TEMPÉ, J.; SCHELL, J. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell*, 56:193-201, 1989.
- ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, Amsterdam, v. 79, p. 117-161, 1997.
- ZHEN, R. G.; KIM, E. J.; REA, P. A. The molecular and biochemical basis of pyrophosphate-energized proton translocation at the vacuolar membrane. *The Plant Vacuole Advances in Botanical Research*, v. 25, p. 298–337, Academic Press Limited. 1997.
- ZONTA, E.; BRASIL, F. C.; GOI, S. R.; ROSA, M. M. T. *O sistema radicular e suas interações com o ambiente edáfico*. In: FERNANDES, M. S. (Ed.) *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 7-52. 2006.
- ZHU, Y. G.; MILLER, R. M. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. *Trends in Plant Science*. v. 8, p. 407-409. 2003.

## ANEXOS

Procedimentos realizados nas coletas e análises da atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPases, V-H<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>-PPases) e do metabolismo do nitrogênio em raízes transformadas de manjeriço (*Ocimum basilicum*) e trevo (*Trifolium repens* L.) conforme objetivo descrito nos capítulos III, IV, V e VI. Para a avaliação das frações solúveis (FERNANDES, 1983) sendo N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (CATALDO et al., 1975), N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (FELKER, 1977), açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957) e N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955) foram coletadas com pinça anatômica 0,5 g de raízes, lavadas vagarosamente em água destilada corrente com auxílio de uma peneira de plástico, secadas cuidadosamente com papel toalha. Foram pesadas e acondicionadas em frascos contendo 20 mL de etanol (80%) e armazenados em geladeira (4°C) para posterior extração alcoólica e partição com clorofórmio.

### Anexo 1. Avaliação das Atividades Enzimáticas

#### Isolamento das vesículas de membrana plasmática e tonoplasto

Para a avaliação da atividade das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPases, V-H<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>-PPases), foram feitas extrações de vesículas de membrana plasmática e do tonoplasto por fracionamento celular conforme YANG et al. (2002) com modificações de SANTOS (2006).

Todo o processo descrito para o isolamento das vesículas de plasmalema e tonoplasto foi realizado de 0 a 4°C. Amostras de 5g de massa fresca de raízes foram maceradas em graal e pistilo com 8 mL do meio de extração (sacarose 250 mmoles L<sup>-1</sup>, glicerol 100 mL L<sup>-1</sup>, KCl 250 mmoles L<sup>-1</sup>, Tris/acetato 50 mmoles L<sup>-1</sup> (pH 7,5), EGTA 2 mmoles L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP), fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) 1 mmol L<sup>-1</sup>, ditioneitol (DTT) 2 mmoles L<sup>-1</sup> e 3 g L<sup>-1</sup> de albumina) filtrando o homogenato em quatro camadas de gaze e em seguida centrifugado a 4.500 *xg* por 10 minutos, este procedimento foi realizado para a retirada da fração grosseira (parede celular, células intactas, etc). O sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado a 14.600 *xg* por 10 minutos para uma maior limpeza (retirada de mitocôndrias, etc). O sobrenadante foi recolhido e agora centrifugado a 105.000 *xg* por 60 minutos. Após esta ultracentrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu o precipitado com 1 mL de um meio de suspensão (sorbitol 250 mmoles L<sup>-1</sup>, Tris-Acetado 20 mmoles L<sup>-1</sup> (pH 7,5), EGTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 2 mmoles L<sup>-1</sup> e DTT 2 mmoles L<sup>-1</sup>). O material ressuspensão foi acondicionado em tubos ependoff, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -25°C para posterior análise da atividade das bombas de prótons.

#### Quantificação das proteínas

O teor de proteína dos extratos contendo vesículas da membrana plasmática e tonoplasto foi determinada pelo método de BRADFORD, (1976), usando soro albumina bovina como padrão. Uma alíquota de 60 µL da suspensão de membranas foi adicionada em tubos de ensaio e logo depois 3 mL da solução de Bradford (coomassie brilliant blue G-250 0,12 mol L<sup>-1</sup>, etanol 0,1 mol L<sup>-1</sup>, ácido fosfórico 1 mol L<sup>-1</sup>). Agitou e depois de 10 minutos foi lida em absorvância a 595 nm.

### **Atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases, V-H<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>-PPases**

As atividades das bombas de prótons (P-H<sup>+</sup>-ATPases, V-H<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>-PPases) foram determinadas pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise de ATP (para as P H<sup>+</sup>-ATPase e V H<sup>+</sup>-ATPase) e PPI (para as H<sup>+</sup>-PPase):

#### **• P-H<sup>+</sup>-ATPase**

O meio de reação é composto de MOPS-BTP 30 mmoles L<sup>-1</sup> (pH 6,5), sorbitol 50 mmoles L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 5 mmoles L<sup>-1</sup>, KCl 50 mmoles L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup>, 0,2 mL L<sup>-1</sup> de Triton X-100, KNO<sub>3</sub> 50 mmoles L<sup>-1</sup>, NaN<sub>3</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup> e ATP 5 mmoles L<sup>-1</sup>.

A reação foi iniciada pela adição de 4 µg de proteína (o mesmo para as V H<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>-PPase) por mL de meio. Após 30 min a 30°C a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL do meio de reação contendo as proteínas e 1 mL do meio de parada contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 mL L<sup>-1</sup>), SDS 50 g L<sup>-1</sup> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 7 g L<sup>-1</sup> previamente em tubos de ensaio submersos em gelo. Em seguida foram adicionados 50 µL de ácido ascórbico 100 g L<sup>-1</sup>. Após 10 minutos 1,45 mL de um meio contendo 40 g L<sup>-1</sup> de citrato de sódio e 20 g L<sup>-1</sup> de ácido acético glacial foi adicionado para prevenir a medição do fosfato (Pi) liberado pela atividade residual das H<sup>+</sup>-ATPases e hidrólise ácida do ATP. A cor foi totalmente desenvolvida após 30 minutos e a leitura espectrofotométrica realizada a 820 nm.

Para verificar a ação de inibidores sobre a atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase, foi usado um meio com 0,2 mmoles L<sup>-1</sup> de Vanadato (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). A atividade desta proteína foi calculada pela diferença entre a atividade observada sem e com a presença de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> no meio de reação.

#### **• V-H<sup>+</sup>-ATPase**

O meio de reação é composto de HEPES-BTP 30 mmoles L<sup>-1</sup> (pH 7,5), sorbitol 50 mmoles L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 5 mmoles L<sup>-1</sup>, KCl 50 mmoles L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup>, 0,2 mL L<sup>-1</sup> de Triton X-100, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,2 mmoles L<sup>-1</sup>, NaN<sub>3</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup> e ATP 5 mmoles L<sup>-1</sup>.

Para verificar a ação de inibidores sobre a atividade da V H<sup>+</sup>-ATPase, foi usado um meio de reação como acima descrito, mas contendo 100 ηmoles L<sup>-1</sup> de bafilomicina A<sub>1</sub> (inibidor específico da V-H<sup>+</sup>-ATPases quando em baixas concentrações e inibidor das P-H<sup>+</sup>-ATPases quando em altas concentrações) ou 200 µmoles L<sup>-1</sup> de DCCD (inibidor da P-H<sup>+</sup>-ATPases) (neste caso o DCCD foi previamente incubado com as proteínas por 10 minutos a temperatura ambiente). A atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPases foi calculada pela diferença entre a atividade observada sem e com a presença de bafilomicina A<sub>1</sub> ou DCCD.

#### **• H<sup>+</sup>-PPase**

O meio de reação é composto de HEPES-BTP 30 mmoles L<sup>-1</sup> (pH 7,2), sorbitol 100 mmoles L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 5 mmoles L<sup>-1</sup>, KCl 100 mmoles L<sup>-1</sup>, 0,2 mL L<sup>-1</sup> de Triton X-100, NaN<sub>3</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup> e PPI 1 mmol L<sup>-1</sup>.

A atividade da H<sup>+</sup>-PPase dependente de K<sup>+</sup> foi calculada pela diferença entre a atividade observada na ausência e presença de 100 mmoles L<sup>-1</sup> de KCl no meio de reação. Uma solução de NaF a 2,5 mmoles L<sup>-1</sup> também foi usada em meio de reação separado para verificar o grau de inibição das H<sup>+</sup>-PPases.

### **Atividade da nitrato redutase (NR)**

A determinação da atividade da Nitrato Redutase (ANR) segundo JAWORSKI (1971).

Uma amostra de 200 mg do tecido vegetal fresco foi incubado com 5,00 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,5, contendo n-propanol e KNO<sub>3</sub>. Os tubos foram colocados em banho-maria a 30°C por 1 hora no escuro. Em tubos separados foram adicionados 0,40 mL da solução

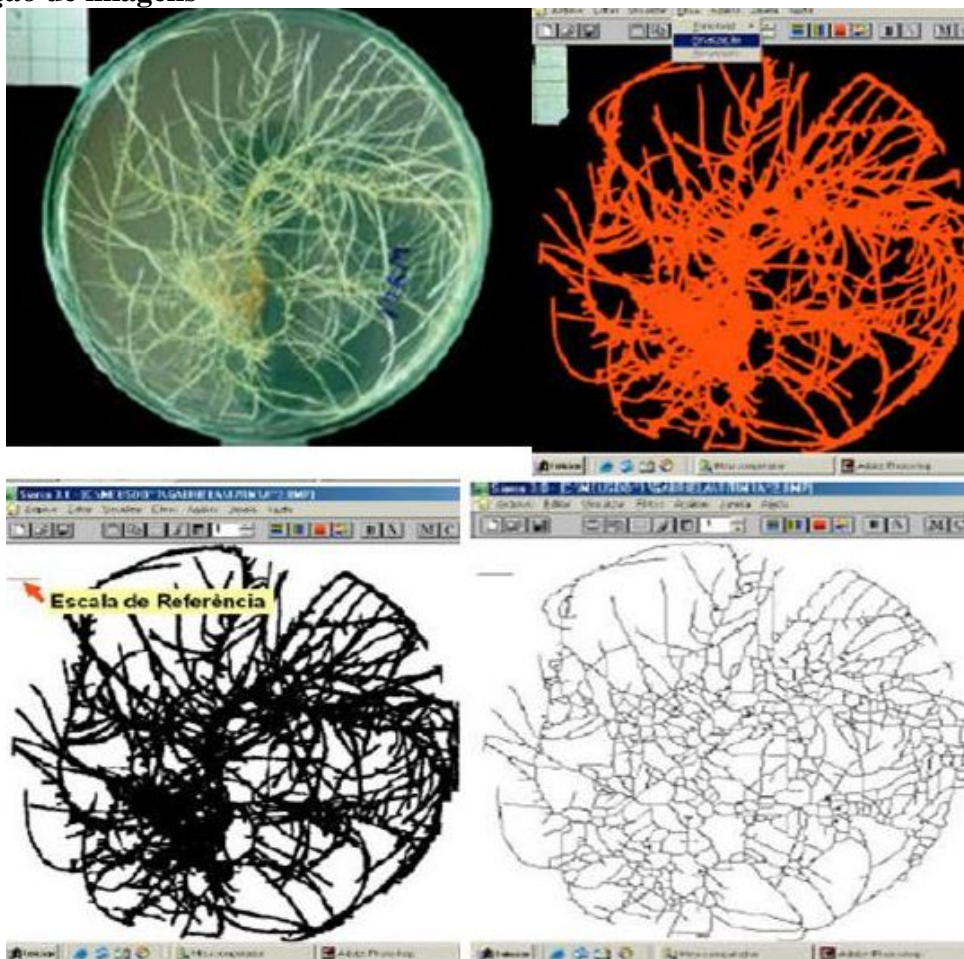
problema (amostra incubada), 0,30 mL de sulfanilamida 1%; 0,30 mL de n-naftil-etileno-diamino (0,02%), e após 20 min de repouso foi adicionado 4,00 mL de água e a leitura realizada contra um padrão de  $\text{NaNO}_2$  (0, 5, 10, 20, 25, 40 e 50  $\text{mmol L}^{-1}$ ) em absorvância a 540 nm.

### Atividade da Glutamina Sintetase (GS)

A determinação da atividade da Glutamina Sintetase foi realizada segundo FARDEN & ROBERTSON (1980), modificada por SOUZA et al. (2007).

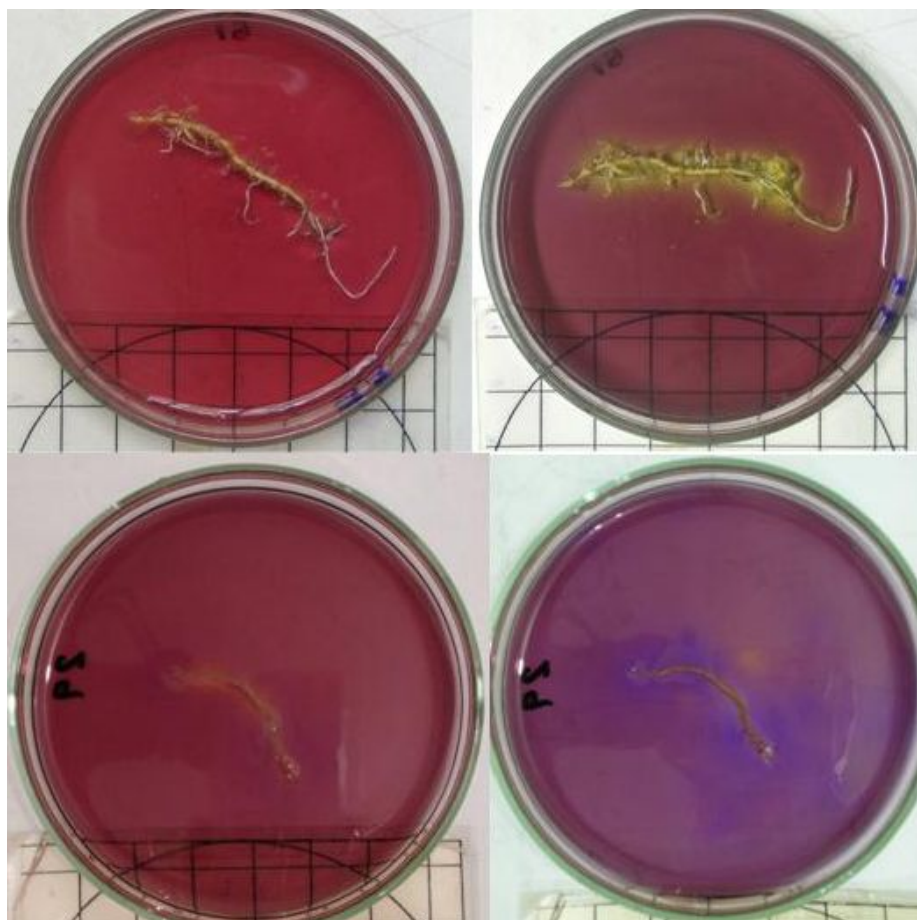
Um grama de tecido vegetal fresco foi macerado com  $\text{N}_2$  líquido e em seguida adicionou 4 ml de tampão de extração (TRIS ou Imidazol). O material foi filtrado em quatro camadas de gaze e o filtrado centrifugado por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e  $15.000 \times g$ . O sobrenadante foi recolhido e usado para determinação da atividade da GS (0,30 mL de amostra foi incubada em 0,50 mL de tampão Imidazol-HCl ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 7,5; 0,10 mL de ATP ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), 0,1 mL de glutamato ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 7,5; 1,0 mL de água destilada. Após 30 minutos em banho-maria a  $30^\circ\text{C}$ , a reação foi paralisada com a adição de 1,5 mL de solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  em HCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). As amostras foram centrifugadas a  $2000 \times g$  por 5 minutos a  $30^\circ\text{C}$  (para retirar proteínas precipitadas) e a leitura do sobrenadante foi feita em absorvância a 540 nm e comparadas com padrão de  $\gamma$ -glutamil mono-hidroxamato.

### Editoração de imagens



**Anexo 2.** Editoração das imagens proposta por LIMA et al. (2006) desde a captura das imagens das placas Petri (A), a seleção das raízes (B) processamento das imagens pelo software “Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo” 3.0 (SIARCS<sup>®</sup> 3.0) para obtenção da área radicular ( $\text{cm}^2$ ) (C) e após afinamento para obtenção do comprimento radicular (cm) (D).

### pH rizosférico



**Anexo 3.** Solução com indicador mixto de pH para avaliação da área de influência das raízes. O pH das soluções foi ajustado para 6,0 com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , adquirindo uma tonalidade avermelhada (A e C) adquirindo uma tonalidade amarelada quando ácidas (B) e arroxeadas quando alcalinas (D).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)