

## **BIOATIVIDADE DE ÁCIDOS HÚMICOS EM *Arabidopsis thaliana***

Thiago Gomes dos Santos Braz<sup>1</sup>, Luciano Pasqualoto Canellas<sup>2</sup>, Leonardo Oliveira Medici<sup>3</sup>

1. Doutorando do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil ([thiagogsbz@hotmail.com](mailto:thiagogsbz@hotmail.com)).
2. Professor Associado do Laboratório de Solos da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil.
3. Professor Adjunto do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, Brasil.

### **RESUMO**

As substâncias húmicas, em solução, modificam a arquitetura radicular das plantas, porém os mecanismos dessa ação ainda não são claros. O objetivo desse estudo foi avaliar alterações na morfogênese da raiz, de plântulas de *Arabidopsis thaliana*, provocadas pela adição de ácidos húmicos (AH) na solução nutritiva, comparadas ao efeito da auxina ácido indol-3-acético (AIA). Para tanto, foi conduzido um experimento no delineamento em blocos casualizados utilizando-se diferentes concentrações de AH isolados de vermicomposto (0, 40, 80, 160 e 320 mg L<sup>-1</sup>) e AIA (0; 0,005; 0,01; 0,02 e 0,04 mmol L<sup>-1</sup>). Foram encontradas respostas diferentes na capacidade de estimular a emergência de raízes laterais. Com o uso do AIA foi verificado aumento linear ( $P < 0,0142$ ) entre o número de raízes laterais emergidas e o aumento da concentração, enquanto que com AH foi observada resposta quadrática ( $P < 0,0278$ ). O AIA induziu aumento quadrático no comprimento total das raízes ( $P < 0,0171$ ), enquanto que as plantas tratadas com 40 mg L<sup>-1</sup> de ácidos húmicos exibiram maior comprimento da raiz principal do que as plantas-controle. Os ácidos húmicos modificaram a morfologia das plântulas de *Arabidopsis thaliana*; entretanto, seus efeitos não podem ser explicados somente pela ação da auxina.

**PALAVRAS-CHAVE:** ácido húmico, ácido indol-3-acético, auxina, raízes laterais

### **BIOACTIVITY OF HUMIC ACIDS ON *Arabidopsis thaliana***

#### **ABSTRACT**

The humic substances in solution modify the root architecture of plants, however the mechanisms of this action are not yet clear. The aim of this study was to evaluate the effect of humic acids (HA) on the root morphogenesis of *Arabidopsis thaliana* plants compared to those of the auxin Indole-3-acetic acid (IAA). Therefore, an experiment was conducted in a completely randomized design with the following treatments: control; IAA concentrations: 0.005; 0.01; 0.02 and 0.04 mmol L<sup>-1</sup> and HA concentrations: 40, 80, 160 and 320 mg L<sup>-1</sup>. Different responses in the capacity of stimulating the emergency of lateral roots were found. It was observed a linear

regression ( $P < 0,0142$ ) between lateral root number and the increasing concentrations, with the use of auxin, while for HA a quadratic ( $P < 0,0278$ ) response was observed. The auxin induced a quadratic ( $P < 0,0171$ ) increase in total root length, while the plants treated with 40 mg L<sup>-1</sup> of HA exhibited higher principal root length than the control plants. The humic acids modify the morphology of *Arabidopsis thaliana* seedlings; however their effects could not be explained only by auxin action.

**KEY-WORDS:** auxin, humic acid, indole-3-acetic acid, lateral roots

## INTRODUÇÃO

A matéria orgânica humificada influencia as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. A capacidade de promoção do crescimento vegetal (bioatividade) que as substâncias húmicas (SH) apresentam está adquirindo nova importância em função da necessidade de redesenho de alternativas para a agricultura orgânica ou sustentável.

As SH exercem forte estímulo no crescimento radicular em plântulas de milho, aumentando o número de sítios de mitose e de raízes laterais emergidas e a área superficial (CANELLAS & SANTOS, 2005). Em *Arabidopsis thaliana*, foi observado efeito de SH no aumento do número de raízes laterais e de pêlos absorventes (DOBBSS et al., 2007; SCHMIDT et al., 2007). Estas modificações na arquitetura radicular conferem vantagem na absorção de nutrientes pouco móveis, principalmente em solos com baixa capacidade de troca catiônica (HODGE, 2004).

Apesar da promoção do crescimento vegetal pelas SH ser bem documentada, os mecanismos de ação ainda precisam ser esclarecidos. Um conjunto de evidências indica que a ação das SH pode ser comparada com atividade do hormônio auxina. Uma das evidências é a demonstração de que SH ativam bombas de prótons da plasmalema e aumentam a expansão celular de forma análoga ao observado pela auxina, de acordo com a “teoria do crescimento ácido” (CANELLAS et al., 2002). Esta bioatividade pode ser justificada pela presença de grupamentos funcionais com características semelhantes à auxina (CANELLAS & FAÇANHA, 2004). SCHMIDT et al. (2007), entretanto, indicaram que o aumento da densidade de pêlos absorventes, obtido com SH, não foi mediado por ação auxínica. No trabalho de DOBBSS et al. (2007), as SH também não apresentaram efeito similar ao AIA na concentração de 0,001 mmol L<sup>-1</sup>. No presente trabalho, diferentemente da abordagem de DOBBSS et al. (2007) e de SCHMIDT et al. (2007), foram usadas diferentes concentrações de AIA para serem comparadas com as diferentes concentrações de SH. Outra diferença entre estes trabalhos está relacionada com a origem das SH; no presente trabalho a fonte foi vermicomposto, enquanto que DOBBSS et al. (2007) e SCHMIDT et al. (2007) utilizaram, respectivamente, oxissolos e turfa de *Sphagnum* como fonte das SH.

Devido à complexidade estrutural das SH e heterogeneidade do comportamento químico em solução, é possível que a presença de vários tipos de substâncias capazes de promover o desenvolvimento vegetal apresentem respostas diferentes das normalmente observada com auxina.

A planta modelo de estudos de Genética e Fisiologia Vegetal, *Arabidopsis thaliana*, oferece diversas facilidades que justificam seu amplo uso nas pesquisas

científicas, tais como reduzidos tamanhos da plântula, do ciclo de vida e do genoma bem caracterizado (ESTELLE & SOMERVILLE, 1986).

Diante do exposto, torna-se importante avaliar o impacto da aplicação de ácidos húmicos na arquitetura radicular da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, o que pode permitir a elucidação do efeito bioativo destas substâncias, bem como gerar informações aplicáveis a outras plantas de interesse científico e agrônômico.

## OBJETIVOS

Comparar as mudanças na arquitetura radicular de *Arabidopsis thaliana* promovidas pela aplicação de auxinas e ácidos húmicos, os quais constituem a fração alcalino solúvel das substâncias húmicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos Ácidos húmicos

Os ácidos húmicos (AH) foram isolados de vermicomposto de esterco de curral com NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> em atmosfera inerte de N<sub>2</sub> de acordo com a metodologia descrita por SCHNITZER & SKINNER (1982). A composição elementar foi determinada em analisador automático CHN (Perkin-Elmer 1483; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). O conteúdo de cinzas foi obtido com incineração de amostras de AH a 700°C por 8 horas. Estas amostras foram incineradas em menor temperatura e durante maior tempo para evitar a formação de estruturas recalcitrantes de acordo com as recomendações do *International Humic Substances Society* ([www.ihss.gatech.edu](http://www.ihss.gatech.edu)). A acidez total foi estimada usando-se Ba (OH)<sub>2</sub> e a carboxílica com Ca(OAc)<sub>2</sub> de acordo com metodologia descrita por SCHNITZER & GUPTA (1965). O grau de humificação foi estimado pela relação E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> como descrita por KONONOVA (1982) medindo-se a absorvância em 465 e 665 nm de uma solução de 20 mg L<sup>-1</sup> de C de AH e NaHCO<sub>3</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> em pH de 8,2. A absorvância foi mensurada em espectrofotômetro Shimadzu DMS 8000 (Tokyo, Japão).

### Ensaio com *Arabidopsis*

As plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia, foram cultivadas em sistema hidropônico, constituído de camadas de materiais sobrepostos, como descrito detalhadamente em DOBBSS et al. (2007). A estrutura de suporte, na qual as plantas se desenvolveram, foi constituída de: um pedaço de plástico transparente de 6 cm x 5 cm, sobre o qual as sementes foram colocadas na borda superior; sobre as sementes e o plástico foi colocado um pedaço de tecido, a base de nylon transparente, e sobre este tecido foi colocado papel de germinação. O uso de materiais transparentes teve objetivo de permitir a captura de imagens sem que houvesse movimentação das raízes. Essa estrutura foi envolvida por plástico preto, que deixava vazadas a superfície superior, por onde emergiam as plântulas, e a inferior, por onde penetrava água por capilaridade, para repor a perda por evapotranspiração. As estruturas de cultivo foram dispostas na posição vertical, em reservatórios individuais de formas de gelo, com água mantida em nível constante.

Cada estrutura recebeu dez sementes de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia, as quais, após a germinação, passaram por desbaste, deixando-se apenas 5 plantas.

Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados com três repetições e 9 tratamentos: controle; ácido indol-3-acético (AIA) nas concentrações de 0,005, 0,01, 0,02 e 0,04 mmol L<sup>-1</sup>; e AH nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 mg L<sup>-1</sup>.

As plantas receberam solução contendo as diferentes concentrações de AH ou auxina a partir do 4º dia após a semeadura e receberam solução nutritiva modificada de HOAGLAND & ARNON (1950) com 2 mmol/L de nitrogênio (pH 5,8), nos 7º e 10º dias após plantio. A modificação na solução nutritiva se deu pela substituição dos nitratos de cálcio e potássio por nitrato de amônio, cloreto de cálcio e sulfato de potássio.

No 13º dia após a semeadura, os envoltórios pretos e os papéis de germinação foram retirados, deixando as plantas entre as camadas de plástico transparente e tecido de polietileno, para a coloração das raízes com Azul de Toluidina (0,05%). O uso do corante teve o objetivo de obter-se contraste entre as raízes e o fundo branco do scanner CanoScan D646U ex (Hong Kong, Canon Inc.) no qual as imagens foram captadas, e posteriormente convertidas em imagens preto-e-branco 1 bit para serem analisadas no programa *Delta T Scan*, que determinou os valores de comprimento total das raízes, comprimento médio da raiz principal e comprimento médio das raízes laterais. O número total de raízes laterais foi determinado através de contagem visual nas imagens.

Os efeitos das regressões lineares e quadráticas, das concentrações de AH ou AIA na morfologia radicular, foram submetidos à análise de variância, usando o teste F ( $P < 0,05$ ). Para as variáveis sem efeito significativo para regressão, foi feito o teste de Dunnett.

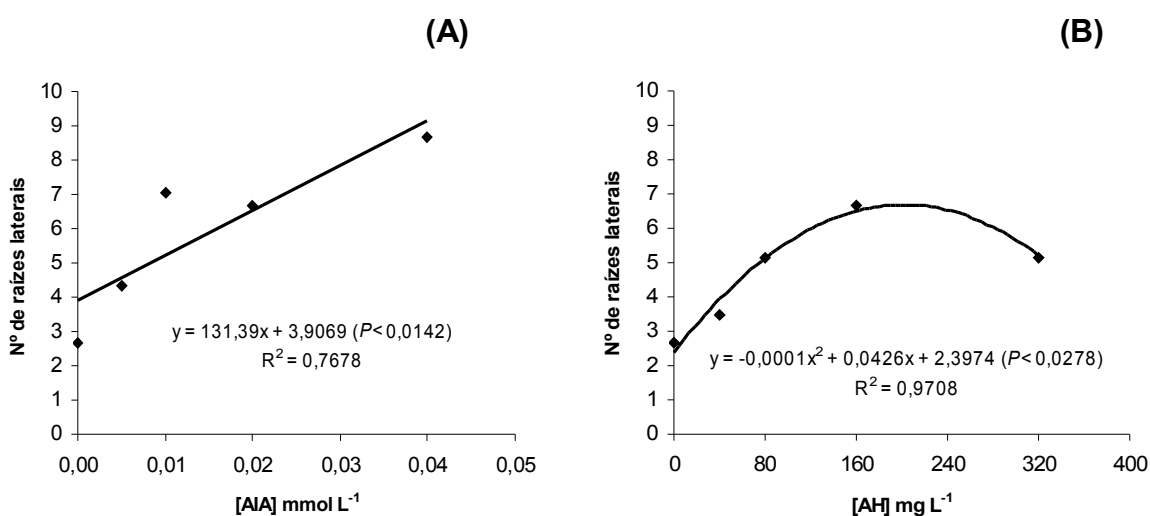
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os AH isolados do vermicomposto apresentaram conteúdo baixo de carbono (485 g kg<sup>-1</sup>) e elevado de nitrogênio (32 g kg<sup>-1</sup>), enquanto os conteúdos de hidrogênio e oxigênio (56 e 420 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente) são normalmente encontrados em AH (CANELLAS et al., 2002; CANELLAS & FAÇANHA, 2004). A acidez total de 666 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup> é elevada e a maior parte constituída pela acidez carboxílica (450 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>). A análise das cinzas revelou: Si - 13,07 g kg<sup>-1</sup>, Fe - 9,78 g kg<sup>-1</sup>, Al - 0,319 g kg<sup>-1</sup>, Zn - 0,042 g kg<sup>-1</sup> e Cu - 0,012 g kg<sup>-1</sup>. O parâmetro utilizado para avaliar o grau de humificação dos AH foi a relação E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>. Esta relação, normalmente é menor que 4 para ácidos húmicos e entre 4 e 9 para ácidos fúlvicos (KONONOVA, 1982) Os AH isolados do vermicomposto apresentaram valores elevados para a relação E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>, i.e., próximo de 6 e típica de valores normalmente encontrados para ácidos fúlvicos de solos (CANELLAS et al., 2002).

O uso de auxina induziu respostas lineares em relação ao aumento do número de raízes laterais (Figura 1A). Comportamento similar para as concentrações estudadas foi observado por DONG et al. (2006).

A análise de variância revelou significância da regressão quadrática entre as concentrações de AH e número de raízes laterais (Figura 1B) e a concentração calculada de máximo estímulo foi 213 mg AH L<sup>-1</sup>. Efeitos semelhantes foram observados por RAUTHAN & SCHNITZER (1981) com ácidos fúlvicos sobre a

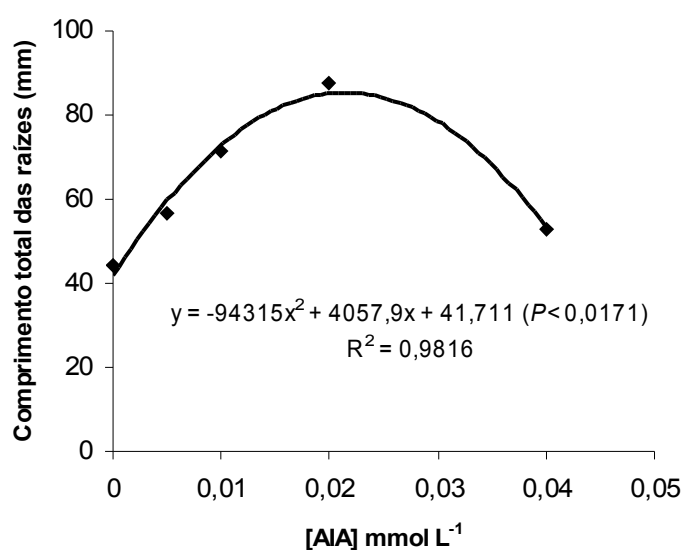
massa de raízes de pepino, com a concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> resultando no maior estímulo, e efeito inibitório nas concentrações acima desta. DOBBSS et al. (2007), trabalhando com ácidos húmicos, fúlvicos e huminas de diferentes oxissolos, observaram também efeito quadrático das concentrações de ácidos húmicos e fúlvicos sobre a densidade de raízes laterais das plantas de *Arabidopsis thaliana*, cultivadas no mesmo sistema de cultivo utilizado neste experimento, o que indica a possibilidade da presença de substâncias com atividade hormonal na matéria orgânica oriunda destes solos.



**FIGURA 1.** Número de raízes laterais em *Arabidopsis thaliana* em diferentes concentrações de (A) de AIA e (B) ácidos húmicos (AH).

O máximo efeito calculado dos AH na formação de raízes laterais é comparável ao efeito obtido com 0,01 mmol L<sup>-1</sup> de AIA, no presente trabalho. Estes resultados estão em concordância com os de DOBBSS et al. (2007), que também observaram maior formação de raízes laterais com SH do que com AIA na concentração de 0,001 mmol L<sup>-1</sup>, a qual foi a única concentração usada no trabalho destes autores. O uso de diferentes concentrações de AIA, no presente trabalho, permitiu a observação de uma diferença considerável entre as ações de auxina e AH, na formação de raízes laterais, com efeito linear e quadrático para AIA e SH, respectivamente.

A variação do comprimento total das raízes apresentou comportamento típico de dose-resposta com AIA (Figura 2) no qual foi observado significância para regressão quadrática.



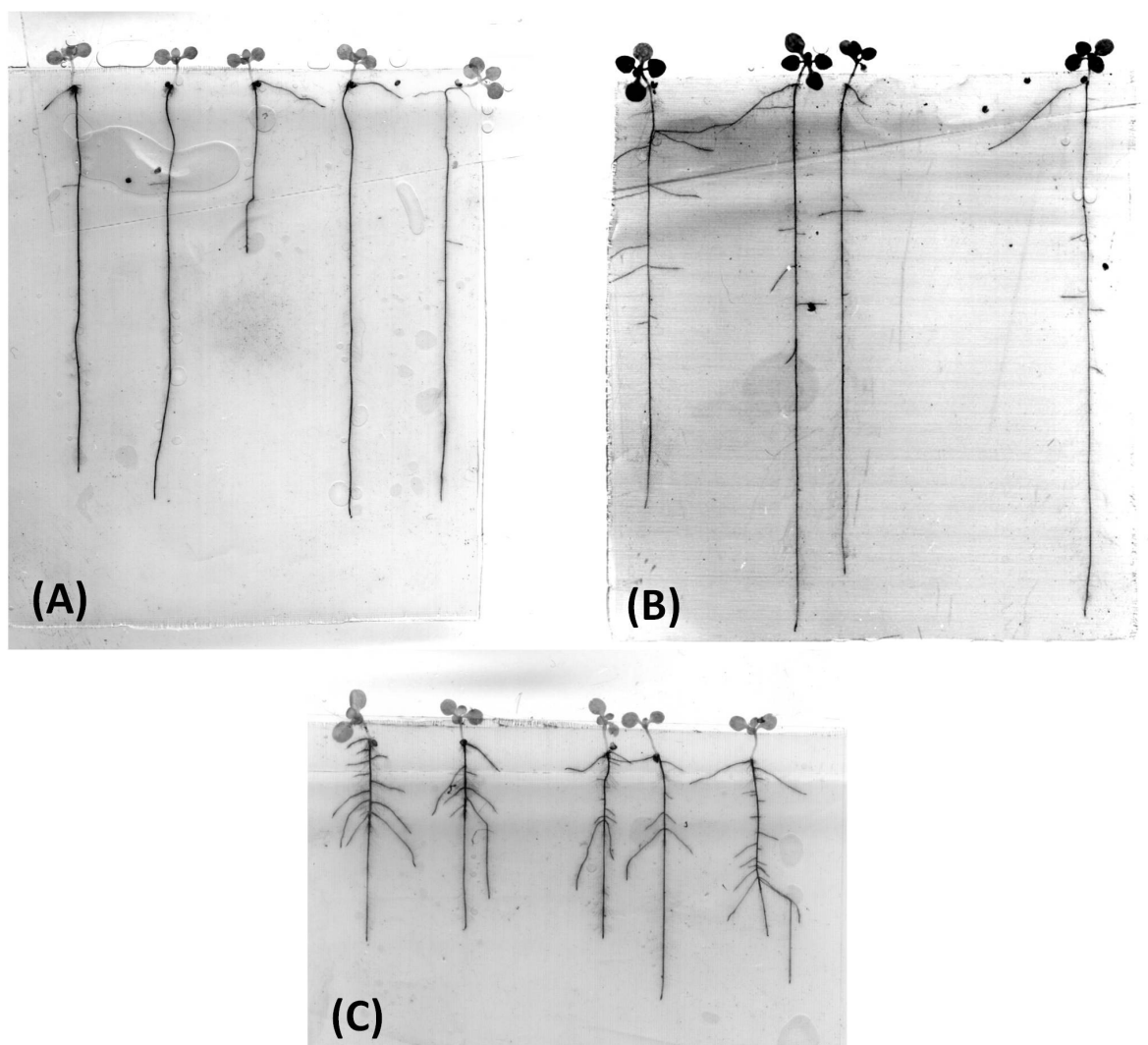
**FIGURA 2.** Comprimento total de raízes de *Arabidopsis thaliana* em diferentes concentrações de ácido indol-3-acético (AIA).

Não foi verificado efeito significativo das regressões entre as concentrações tanto dos AH como AIA em relação ao comprimento médio das raízes laterais e da raiz principal. Contudo, em comparação com as plantas-controle, o AIA apresentou tendência de diminuir o comprimento da raiz principal, como esperado (DONG et al., 2006), embora sem significância estatística, enquanto que os AH tenderam a induzir o aumento desta variável em todas as concentrações estudadas, com efeito significativo para a concentração de 40 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 1). A figura 3 também apresenta os efeitos opostos do AIA e dos AH sobre o comprimento da raiz principal de *Arabidopsis thaliana*.

**TABELA 1.** Médias do comprimento da raiz principal *Arabidopsis thaliana* tratadas com concentrações de ácido indol-3-acético (AIA) e ácidos húmicos (AH). Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem significativamente ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Dunnett.

Tratamento	Médias (mm)	Diferenças	5%
Controle	36,12	0%	B
AIA 0,005 mmol L <sup>-1</sup>	28,60	-21%	B
AIA 0,01 mmol L <sup>-1</sup>	29,26	-19%	B
AIA 0,02 mmol L <sup>-1</sup>	31,98	-14%	B
AIA 0,04 mmol L <sup>-1</sup>	28,11	-22%	B
AH 40 mg L <sup>-1</sup>	52,84	+46%	A
AH 80 mg L <sup>-1</sup>	42,63	+18%	B
AH 160 mg L <sup>-1</sup>	46,34	+28%	B
AH 320 mg L <sup>-1</sup>	46,86	+30%	B

Os resultados do presente trabalho estão em concordância com a indicação de que os efeitos das SH não podem ser explicados apenas pela ação auxínica (DOBBSS et al., 2007; SCHMIDT et al., 2007). No trabalho de DOBBSS et al. (2007) o crescimento da raiz principal também foi promovido por algumas SH. As alquilamidas, uma nova classe de compostos com ação hormonal, também apresentam estímulo do crescimento da raiz principal e de forma independente da sinalização auxínica (RAMÍREZ-CHAVEZ et al., 2004). Desta forma, uma das hipóteses que se pode formular é que as SH contenham substâncias relacionadas às alquilamidas. O teste desta hipótese poderá indicar novas explicações para a discrepância entre as ações das auxinas e das SH no desenvolvimento de raízes.



**FIGURA 3.** Imagens de plantas de *Arabidopsis thaliana* nos tratamentos: controle (A), concentração 160 mg L<sup>-1</sup> de AH (B) e concentração 0,04 mmol L<sup>-1</sup> de AIA (C).

## CONCLUSÕES

Os ácidos húmicos modificam a morfogênese das raízes de *Arabidopsis thaliana* provocando aumento quadrático do número de raízes laterais emitidas, bem como aumentando significativamente o comprimento da raiz principal na dose de 40 mg L<sup>-1</sup>. Portanto, a sua ação sobre as raízes é próxima ao efeito da auxina na planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Apesar disto, novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos atuantes na bioatividade de ácidos húmicos em plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; FAÇANHA, A. R. Humic acids isolation from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence and plasma membrane H<sup>+</sup>-atpase activity in maize roots, **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, p. 1951-1957, 2002.
- CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Natureza química do húmus do solo e sua bioatividade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.3, p.233-240, 2004.
- CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. **Humosfera: Tratado Preliminar Sobre a Química das Substâncias Húmicas**. Seropédica e Campos dos Goytacazes. 2005. 309 p.
- DOBBSS, L. B.; MEDICI, L. O.; PERES, L. E. P. ; PINO-NUNES, L. E.; RUMJANEK, V. M.; FAÇANHA, A. R.; CANELLAS, L. P. Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols, **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v.151, p.199-211, 2007.
- DONG, L.; WANG, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; DENG, X.; XUE, Y. An auxin-inducible F-box protein CEGENDUO negatively regulates auxin-mediated lateral root formation in *Arabidopsis*, **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.60, p.599-615, 2006.
- ESTELLE, M. A.; SOMERVILLE C. R. The mutants of *Arabidopsis*, **Trends in Genetics**, Cambridge, v.2, p.89–93, 1986.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station. Circular 347 (Berkeley, CA), 1950.
- HODGE, A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients, **New Phytologist**, Lancaster, v.162, p.9–24, 2004.
- IHSS. International Humic Substances Society. Disponível em: < <http://www.ihss.gatech.edu/>>. Acesso em: 25 de novembro de 2010.
- KONONOVA, M.M. **Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación**. Barcelona: Oikos-tau, 1982. 364p.

RAUTHAN, B. S.; SCHNITZER, M. Effects of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumis sativus*) plants, **Plant and Soil**, Dordrecht, v.63, p. 491-495, 1981.

SCHNITZER, M.; GUPTA, U. C. Determination of acidity in soil organic matter. **Soil Science Society of American Proceedings**, v.29, p.274–277, 1965.

SCHNITZER, M.; SKINNER, L. (1982) Organic matter characterization. In American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, eds, Method of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Mineralogical Properties. Agronomic Monograph. ASA/SSSA Publishers, Madison, WI, pp 581.

SCHMIDT, W.; SANTI, S.; PINTON, R.; VARANINI, Z. Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in Arabidopsis, **Plant and Soil**, Dordrecht, v.300, p. 259-267, 2007.

RAMÍREZ-CHAVEZ E.; LOPEZ-BUCIO, J.; HERRERA-ESTRELLA, L.; MOLINA-TORRES, J. Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in Arabidopsis, **Plant Physiology**, Lancaster, v.134, p.1058–1068, 2004.