

# SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

## ESTÍMULO NO CRESCIMENTO E NA HIDRÓLISE DE ATP EM RAÍZES DE ALFACE TRATADAS COM HUMATOS DE VERMICOMPOSTO. I - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO<sup>(1)</sup>

Maria Rita Cardoso Rodda<sup>(2)</sup>, Luciano Paqualotto Canellas<sup>(3)</sup>, Arnoldo Rocha Façanha<sup>(4)</sup>, Daniel Basílio Zandonadi<sup>(5)</sup>, José Guilherme Marinho Guerra<sup>(5)</sup>, Dejair Lopes de Almeida<sup>(6)</sup> & Gabriel de Araújo Santos<sup>(7)</sup>

### RESUMO

O vermicomposto contém uma concentração elevada de substâncias húmicas e já é bem conhecido o efeito do seu uso sobre as propriedades do solo. No entanto, a ação direta das substâncias húmicas sobre o metabolismo das plantas é menos conhecida. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de humatos extraídos de vermicomposto de esterco de curral com KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> sobre o desenvolvimento e metabolismo de ATP em plântulas de alface. Após a germinação, plântulas de alface foram tratadas com os humatos em concentrações que variaram de 0 a 100 mg L<sup>-1</sup> de C, durante quinze dias. Foram avaliados o crescimento da raiz e a atividade das bombas de H<sup>+</sup> isoladas da fração microsomal do sistema radicular. Foi observado aumento na matéria fresca e seca do sistema radicular, bem como no número de sítios de mitose, raízes emergidas do eixo principal, na área e no comprimento radiculares, com o uso do humato na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> de C. Também foi observado, nessa concentração, aumento significativo na hidrólise de ATP pelas bombas de H<sup>+</sup>, responsáveis pela geração de energia necessária à absorção de íons e pelo crescimento celular.

**Termos de indexação:** efeitos fisiológicos, substâncias húmicas, agroecologia, H<sup>+</sup>-ATPase.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro –UFRRJ. Recebido para publicação em maio de 2004 e aprovado em julho de 2006.

<sup>(2)</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. CEP 28013-602 Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: mrrodda@yahoo.com

<sup>(3)</sup> Professor do Laboratório de Solos, UENF. Bolsista do CNPq. E-mail: canellas@uenf.br

<sup>(4)</sup> Professor do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF. E-mail: arnoldo@uenf.br

<sup>(5)</sup> Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da UENF. E-mail: daniel@uenf.br

<sup>(6)</sup> Pesquisador da Embrapa-Agrobiologia. Seropédica (RJ) Bolsista do CNPq. E-mail: dejair@cnpab.embrapa.br

<sup>(7)</sup> Professor do Departamento de Solos da UFRRJ. Bolsista do CNPq. E-mail: gasantos@ufrj.br

**SUMMARY:** *IMPROVING LETTUCE SEEDLING ROOT GROWTH AND ATP HYDROLYSIS WITH HUMATES FROM VERMICOMPOST. I - EFFECT OF VERMICOMPOST CONCENTRATION*

*Vermicomposts present a high content of humic substances and their effects on soil properties are well-documented. However, direct effects of humic substances on plant metabolism are less known. The aim of this work was to evaluate the use of humates isolated from cattle manure vermicompost with 0.1 mol L<sup>-1</sup> KOH on root growth and ATP metabolism of lettuce seedlings. After germination, lettuce seedlings were treated with different humate concentrations (0 to 100 mg L<sup>-1</sup> of C) for 15 days. The root growth and the H<sup>+</sup>-ATPase activity of root cell microsomes isolated by differential centrifugation were evaluated. The humate treatment, at the concentration of 25 mg L<sup>-1</sup> of C, increased fresh and dry root mass as well as root area and total length. Also there was a large increase in the number of root mitotic sites and emerged lateral roots in addition to a significant increase of microsomal ATP hydrolysis. The data suggest that the vermicompost bioactivity could be related, at least in part, to the humate-induced activation of the plant cell H<sup>+</sup> pumps, which are responsible for generating the energy for nutrient absorption and cell growth.*

*Index terms: physiological effects, humic substances, agroecology, H<sup>+</sup>-ATPase.*

## INTRODUÇÃO

Os movimentos de agricultura orgânica têm como base a utilização eficiente dos recursos, a diversificação dos cultivos, a preservação do ambiente e conservação dos recursos naturais, além da participação ativa das comunidades rurais na geração e difusão de tecnologias (Altieri, 2002). Experiências de conversão do sistema tradicional de agricultura indicam que a transição de manejo requer um tempo relativamente longo para se alcançar os níveis anteriores de produtividade (Claro, 2001). Isto se deve, na maioria das vezes, ao tempo necessário para restauração da fertilidade do solo e para restabelecimento da população natural necessária para o controle de pragas e doenças, além da adaptação das plantas ao novo modelo de cultivo (Claro, 2001). A aceleração do tempo de conversão pode ser feita com a utilização de biotecnologia artesanal, para a produção de compostos orgânicos que existem naturalmente e podem ser utilizados como biofertilizantes. Nesse sentido, o uso de vermicomposto no solo tem sido muito promissor (Masciandaro et al., 1999; Canellas et al., 2002)

A vermicompostagem é a transformação da matéria orgânica, resultante da ação combinada das minhocas e dos microrganismos que vivem em seu trato digestivo, aumentando a velocidade de decomposição dos resíduos orgânicos (Albanell et al; 1988; Loquet & Vincelas, 1987). O vermicomposto difere do composto convencional, dentre outras características, pela maior estabilização dos resíduos que, ao passarem pelo trato digestivo da minhoca, sofrem reações enzimáticas adicionais, convertendo rapidamente os resíduos em substâncias húmicas (Hartenstein & Hartenstein, 1981; Albanell et al., 1988; Almeida, 1991), com maior proporção de compostos aromáticos e polissacarídeos (Loquet & Vincelas, 1987).

Já é bem estabelecido o efeito do uso do vermicomposto sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo que inclui melhorias na estruturação e armazenamento de água (Landgraf et al., 1999), aumento da capacidade de troca de cátions pela geração de cargas elétricas negativas, fonte de liberação lenta de nutrientes para as plantas e aumento da população de microrganismos do solo (Cavender et al., 1999). Além disso, uma série de trabalhos tem encontrado uma atividade reguladora de crescimento de plantas nas substâncias húmicas (SH) isoladas do vermicomposto, muito semelhante à ação de auxinas e giberelinas (Albuzio et al., 1996; Dell'Agnola & Nardi, 1987; Nardi et al., 1991, 1994; Muscolo et al., 1996; 1998; 1999; Masciandaro et al., 1999).

O efeito das substâncias húmicas sobre o desenvolvimento vegetal depende do tipo da fonte de onde são isoladas, do tipo e da idade das plantas e da concentração de substâncias húmicas no meio (Kononova, 1982). Vaughan & Malcolm (1985) avaliaram diversas substâncias húmicas e verificaram estímulo no crescimento das raízes em concentrações que variavam de 10 a 500 mg L<sup>-1</sup>. Chen & Aviad (1990) reportaram que concentrações acima de 1.000 mg L<sup>-1</sup> têm efeito nocivo sobre o desenvolvimento de raízes.

A ação promotora de crescimento vegetal que as substâncias húmicas apresentam já é bem estabelecida (Bottomley, 1917). Todavia, os mecanismos bioquímicos envolvidos nesse processo não são claros até hoje. As substâncias húmicas podem favorecer o crescimento das plantas por meio do aumento da eficiência na absorção de nutrientes (Vaughan & Malcolm, 1985). Chen & Aviad (1990) compilaram os resultados de promoção de crescimento vegetal induzido por SH e verificaram que a promoção do desenvolvimento das plantas em solução nutritiva é

aumentada significativamente na presença de diferentes doses de SH. A resposta das plantas, segundo esses autores, estaria relacionada com o aumento da solubilidade de alguns elementos traços (e.g., Fe e outros micronutrientes) por meio da formação de um complexo solúvel com as SH. A maior absorção de uma série tão distinta de íons, como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  (Adani et al., 1998), na presença de SH, evidencia, no entanto, uma ação mais geral sobre os mecanismos de absorção. O incremento da absorção de nutrientes proporcionado pelas SH em solução tem sido justificado pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática graças à ação surfactante e ativação da  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática por SH de baixo peso molecular (essencialmente ácidos fúlvicos) (Nardi et al., 1991; Varanini et al. 1993). Por exemplo, Visser (1989) indica o aumento da permeabilidade da membrana plasmática como responsável pelo maior *status* nutricional celular. Se, por um lado, o aumento da permeabilidade da membrana pode favorecer a absorção, por outro, pode também promover a saída de íons do citoplasma sem favorecer a homeostase celular.

Façanha et al. (2002) demonstraram que substâncias húmicas de massa molecular relativamente elevada (essencialmente ácidos húmicos), isoladas de vermicomposto e de lodo obtido de estação de tratamento de esgoto, promoveram o desenvolvimento radicular de plântulas de milho e café e a ativação da  $\text{H}^+$ -ATPase de membrana plasmática. As  $\text{H}^+$ -ATPases (bombas de  $\text{H}^+$ ) são enzimas transmembranares capazes de hidrolisar ATP, gerando energia e um gradiente eletroquímico que está diretamente envolvido em dois mecanismos fundamentais para o desenvolvimento vegetal.

Esse sistema primário de transporte de prótons (a) energiza o sistema secundário de translocação de íons, o que é fundamental para absorção de macro e micronutrientes, e (b) promove o aumento da plasticidade da parede celular por meio da acidificação do apoplasto, fator fundamental para o processo de crescimento e alongamento da célula vegetal (Cosgrove, 1997). Esse último mecanismo está relacionado com a teoria do crescimento ácido, segundo a qual o aumento de extrusão de prótons mediado pela  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática provoca a ação de enzimas específicas que atuam sobre a parede celular, aumentando sua plasticidade e, conseqüentemente, permitindo o alongamento da célula (Rayle & Cleland, 1992).

Canellas et al. (2002) detectaram a presença de auxinas em SH isoladas de vermicomposto e observaram aumento na atividade e na síntese da  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática isoladas de raízes de milho. Frias et al. (1996) demonstraram que auxinas promovem a síntese de  $\text{H}^+$ -ATPase de membrana plasmática pela modulação de genes *Mha2*. Quaggiotti et al. (2004) também observaram que SH isolados de vermicomposto podem modular a expressão

dos genes *Mha2*, confirmando o efeito anteriormente observado por Canellas et al. (2002) sobre a síntese de ATPases. Canellas & Façanha (2004) utilizaram a hidrólise de ATP em microssomos de raízes de plântulas de milho como método eficiente para avaliar a bioatividade de ácidos húmicos e fúlvicos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de humatos extraídos de vermicomposto sobre o desenvolvimento de plântulas de alface, utilizando a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase vanadato-sensível isolada do sistema radicular como marcador metabólico da bioatividade das substâncias húmicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produção do vermicomposto

O vermicomposto foi preparado em anéis de concreto de 0,50 m de altura e 0,80 m de diâmetro, utilizando esterco bovino obtido de gado de leite criado em regime semi-extensivo na área da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro). O esterco foi deixado em pousio por cerca de 30 dias, até atingir temperatura igual ou inferior a 35 °C. Três anéis para a vermicompostagem foram instalados na área do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA – Fazendinha Agroecológica, km 47). A “Fazendinha” está localizada no município de Seropédica - RJ, a uma latitude de 22 ° 45 ' Sul, longitude de 43 ° 42 ' Oeste e altitude média de 33 m. O experimento foi feito em parceria entre o Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Embrapa Agrobiologia) e o Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Embrapa Solos), a Universidade Federal do Rio de Janeiro e a Pesagro (Estação Experimental de Itaguaí).

Foram colocadas 200 minhocas (*Eisenia foetida*) em cada anel e estes cobertos com palha de capim-colonião para sombrear e manter a umidade do ambiente. A maturação dos vermicompostos foi acompanhada por meio do monitoramento da temperatura até sua estabilização. Após a estabilização, o vermicomposto foi peneirado para retirada das minhocas.

### Extração dos humatos de vermicomposto

A extração das SH alcalino-solúveis do vermicomposto foi realizada com KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> na relação vermicomposto/extrator de 1:10 (v/v), por 16 h. Em seguida, as SH alcalino-solúveis foram separadas do resíduo por decantação e sifonação. O excesso de íons foi retirado por meio do uso de resina de troca de íons Amberlite IRA-120 (forma  $\text{H}^+$ ). A dosagem de carbono no humato foi determinada por oxidação em meio ácido com dicromato de potássio e determinação do excesso de Cr por titulação com sulfato ferroso amoniacal ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

### Obtenção das plântulas de alface e tratamento com humatos

Sementes de alface (*Lactuca sativa var - Regina*), obtidas comercialmente, foram semeadas em copos plásticos de 300 mL com substrato comercial Plantmax sem turfa. As mudas permaneceram em casa de vegetação com temperatura entre 22 e 28 °C e irrigadas diariamente com solução que continha doses de humato de vermicomposto de esterco. As doses de humato utilizadas foram de 0, 25, 50, 75 e 100 mg L<sup>-1</sup> de C. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constituído por três repetições (com 50 plantas por vaso) e cinco tratamentos. Após quinze dias de crescimento nestas condições, as plântulas foram coletadas. Para a análise do desenvolvimento radicular, cada repetição constou da média de 10 plântulas de cada vaso. Para a avaliação do número de sítios de mitose e raízes emergidas, cada repetição constou de seis plântulas de cada vaso. Para a preparação microsomal, foi tomada uma só massa de 30 plântulas de cada um dos vasos em três preparações independentes.

### Avaliação da área e comprimento radicular

As raízes das plantas tratadas foram digitalizadas (300 dpi) e a área e o comprimento radiculares foram estimados pelo programa computacional DeltaT-scan™.

### Determinação do número de sítios formadores de raízes laterais

Segmentos nodais de raízes de seis plântulas, submetidas aos diferentes tratamentos, foram coletados, lavados em água destilada e submetidos ao clareamento, utilizando KOH a 5 % solução aquosa, em banho-maria, a 75 °C, por 20 min. Decorrido este período, o material foi lavado em água destilada e colocado para corar por um período de 14–24 h em hematoxilina-férrica. As raízes foram lavadas em água destilada e, em seguida, clareadas com solução aquosa de ácido láctico a 80 % em banho-maria, a 75 °C, por 30 a 90 seg. Este material foi lavado em tampão fosfato 50 mM pH 7,2 e, em seguida, observado em microscópio estereoscópico para contagem dos sítios mitóticos, que aparecem como pontos vermelhos em um fundo claro (Canellas et al., 2002).

### Obtenção da fração microsomal

A fração microsomal foi isolada das raízes de alface por meio de centrifugação diferencial (De Michelis & Spanswich, 1986). As raízes foram cortadas e pesadas e então homogeneizadas em meio tamponado, usando grau e pistilo. O tampão de extração foi composto de sacarose 250 mM, glicerol a 10 %, ditiotreitil (DTT) 3,3 mM, 5 mM ácido tetra acético etileno diamina (EDTA), 0,5 % de polivinil pirrolidona (PVP-40), KCl 150 mM, soro albumina bovina (BSA) 0,13 %, Fenil metil sulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM, hidroximetil aminometano hidrocloreto (Tris-HCl)

(pH 8,0) 0,1 M, na relação peso de tecido/volume de tampão de 1:2. As soluções usadas na preparação estavam geladas e toda a manipulação foi realizada na temperatura entre 0 e 4 °C. O pH foi monitorado durante a homogeneização, mantendo-se entre 7,6 e 8,0. O homogenato resultante foi então filtrado e submetido à centrifugação a 3.000 g, durante dez minutos. Para o isolamento das mitocôndrias, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 10.000 g, por mais 15 min. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, agora a 100.000 g, por 40 min. O precipitado dessa segunda centrifugação foi solubilizado em solução-tampão com glicerol a 15 %, DTT 1 mM, PMSF 0,02 mM, Hepes-KOH 10 mM pH 7,6 e EDTA 1 mM, resultando numa concentração de proteína total de 8 a 12 mg mL<sup>-1</sup>.

### Determinação da hidrólise de ATP da fração microsomal vanadato-sensível

A atividade de hidrólise de ATP foi determinada colorimetricamente por meio da medida do (Pi) liberado, segundo o método clássico descrito por Fiske & Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína obtida da fração microsomal e parada pela adição de ácido tricloroacético (gelado) para uma concentração final de 10 % (v/v). A composição do meio reacional foi constituída de: MOPS-Tris pH 6,5, 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 a 5 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM e 50 mg de proteína. A hidrólise de ATP representa a atividade sensível a 0,2 mM de vanadato.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização da solução aquosa de humato de vermicomposto de esterco de curral no substrato para produção de mudas de alface favoreceu o desenvolvimento tanto da área como do comprimento do sistema radicular das plântulas (Figura 1a e b). O efeito foi dependente da concentração do humato na água de irrigação. A concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> de C de Humato proporcionou o maior acréscimo na área radicular. Todavia, mesmo na maior concentração utilizada (100 mg L<sup>-1</sup> de C), foi observado estímulo no desenvolvimento radicular em relação às plantas crescidas no substrato comercial sem a adição de humato. A faixa de concentração de substâncias húmicas em solução que, normalmente, inibe o crescimento de plantas encontra-se acima de 500 mg L<sup>-1</sup> de C (Chen & Avid, 1990).

Verificou-se incremento na massa fresca das raízes não observado na massa seca (Quadro 1), indicando que o estímulo verificado na área e no comprimento radiculares poderiam ser atribuídos à ação dos humatos sobre o alongamento celular por turgescência vacuolar (Rayle & Cleland, 1992).

Em nível celular, o crescimento radicular ocorreu através de dois estádios: o crescimento meristemático

e o crescimento vacuolado. No crescimento meristemático, as células se dividem por mitose e iniciam um processo de aumento de tamanho relativamente lento. Estas células são então deslocadas para uma região posterior de rápida expansão, situada entre 4 e 15 mM atrás do ápice radicular, denominada zona de alongamento. A célula meristemática recém-dividida contém muitos vacúolos. À medida que os vacúolos aumentam de volume, estes passam a se fundirem num só vacúolo central. O crescimento vacuolado que ocorre na zona de alongamento é caracterizado por uma rápida expansão celular sustentada pelo aumento da captação de água pelos vacúolos (Cosgrove, 2000). O efeito estimulador do humato verificou-se principalmente sobre o peso fresco das raízes, mais que sobre a massa seca, indicando que as SH atuaram principalmente sobre a atividade da zona de alongamento das raízes onde o crescimento celular se dá basicamente pelo aumento progressivo da turgescência celular promovida pela maciça captação de água nos vacúolos. Uma célula cúbica típica produzida na região meristemática da raiz divide-se em intervalos de 12 a 36 h, mas, uma vez na zona de alongamento, esta pequena célula pode aumentar em até 150 vezes seu tamanho, promovendo o crescimento rápido da raiz (Taiz & Ziegler, 2004).

Tal processo, em geral, envolve a ativação da captação de íons pela célula, os quais se acumulam no vacúolo, promovendo a pressão osmótica necessária para a entrada de água através de proteínas específicas que constituem canais de água (aquaporinas) na membrana plasmática e no tonoplasto (Maurel & Chrispeels, 2001).

Neste contexto, a ativação do sistema primário de transporte de  $H^+$  provocada pelos humatos também pode estar relacionada com o aumento da matéria fresca. O aumento do gradiente de  $H^+$  gerado pelas bombas de  $H^+$  implica uma ativação dos transportadores secundários de íons, promovendo sua entrada na célula

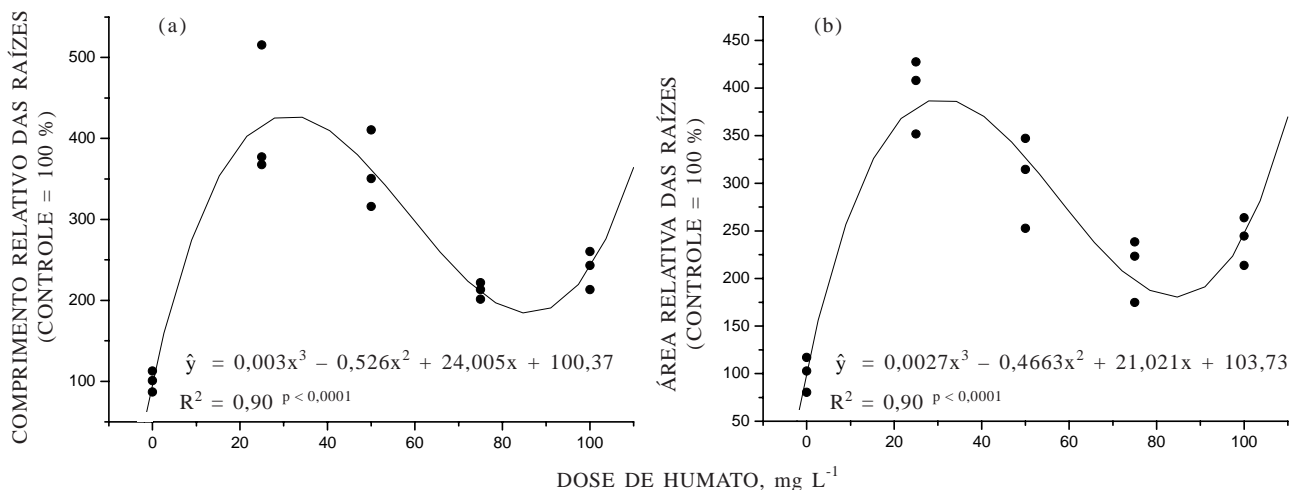
e posterior acúmulo no vacúolo e geração da pressão osmótica, que possibilita a entrada de água (Maurel & Chrispeels, 2001). A regulação dos canais de água (aquaporinas) também parece depender de oscilações do pH citoplasmático regulado pelas bombas de  $H^+$  (Gerbeau et al., 2002).

O tratamento com os humatos também levou ao aumento de crescimento meristemático (Figura 2). A zona de alongamento-diferenciação radicular inclui uma região com elevada densidade de células meristemáticas pequenas, que estão em constante atividade metabólica e são susceptíveis à formação de raízes laterais (Jhan et al., 1998). Essa concentração de células corresponde a sítios de elevada atividade mitótica e o número desses sítios e de raízes laterais já emergidas foi significativamente aumentado com o uso de humato na concentração de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de C (Figura 2b). Na maior concentração de humato utilizada ( $100 \text{ mg L}^{-1}$  de C), verificou-se também um número elevado de raízes emergidas em relação às

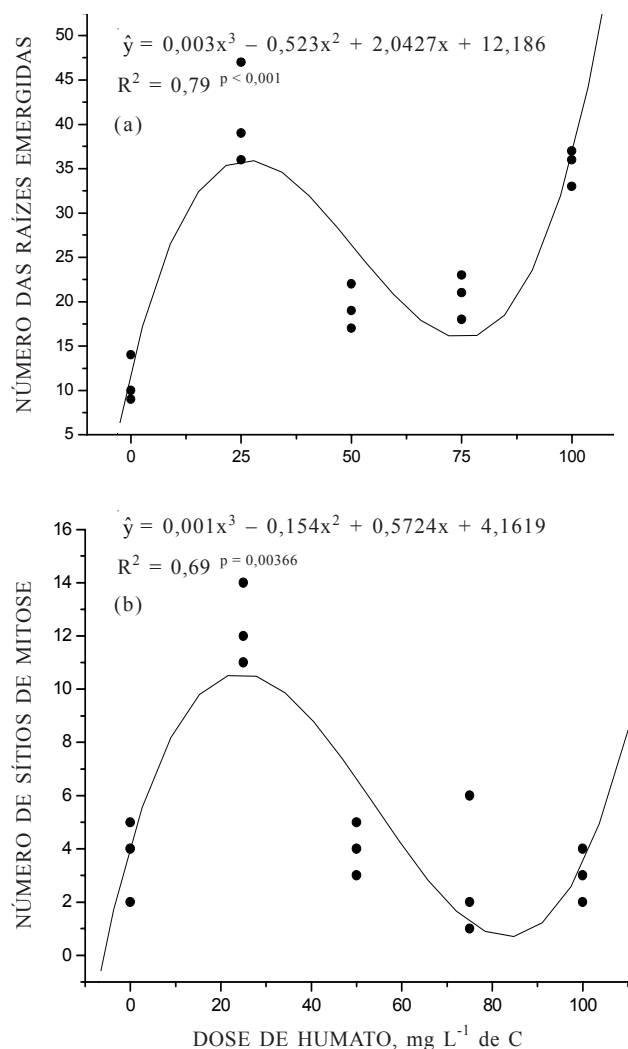
**Quadro 1. Valores médios de massa fresca e seca das raízes das plântulas de alface tratadas com diferentes doses de humatos**

Dose de humato	Massa fresca		Massa seca	
mg L <sup>-1</sup> de C	g	%	g	%
0	0,01499	(0)	0,00185	(0)
25	0,02793	(86)	0,00187	(1)
50	0,02328	(55)	0,00181	(-2)
75	0,02553	(70)	0,00180	(-3)
100	0,01731	(15)	0,00154	(-27)

Valores entre parêntese representam a percentagem de estimulação/inibição da massa fresca e seca das raízes.



**Figura 1. Incremento do comprimento (a) e da área radicular (b) da alface em relação ao controle.**



**Figura 2. Número de raízes laterais emergidas (a) e de sítios de mitose (b) em plântulas de alface.**

plantas-controle, mas não foi observado estímulo sobre o desenvolvimento de sítios de mitose (Figura 2b).

Esses resultados evidenciam uma ação combinada de concentração de humato com a idade da planta (Kononova, 1982). Canellas et al. (2002) verificaram uma hiperindução de sítios de mitose em plântulas de milho tratadas com ácidos húmicos isolados de vermicomposto, durante sete dias. Os maiores valores de sítios de mitose foram encontrados entre o terceiro e o quarto dia de exposição das raízes às substâncias húmicas. A maior área superficial e o número de raízes emergidas nas plântulas de alface tratadas com o humato, em comparação com o controle, mostram a existência de raízes mais finas, que são fisiologicamente mais ativas, concorrendo para a maior absorção de íons e de água.

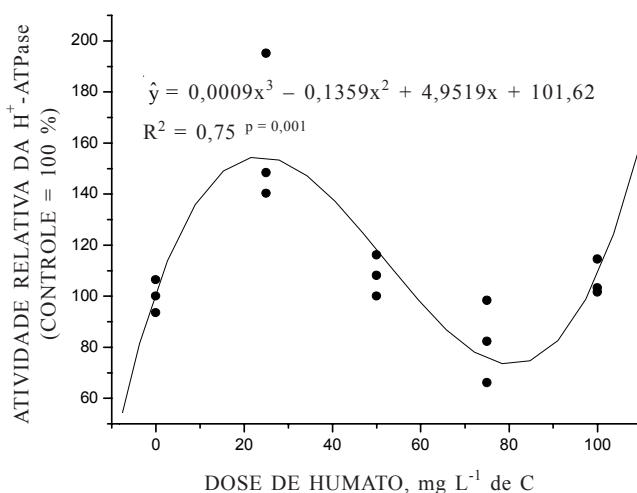
A atividade de hidrólise de ATP pelas H<sup>+</sup>-ATPases vanadato-sensível da fração microsomal isolada das raízes das plântulas de alface foi utilizada como

marcador bioquímico da atividade biológica do humato de vermicomposto. Houve uma indução de cerca de 60 % na atividade de hidrólise de ATP na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> de C, em relação ao controle, seguida do declínio no estímulo da atividade de hidrólise com o uso das doses maiores (Figura 3).

De acordo com a teoria do crescimento ácido (Rayle & Cleland, 1992), o bombeamento de H<sup>+</sup> e a acidificação do apoplasto podem favorecer o processo de alongamento celular. Neste trabalho, foi observada uma coincidência entre o maior estímulo no crescimento radicular e na atividade de hidrólise de ATP pelo uso de humato na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> de C (Figuras 1 e 3).

A matéria orgânica humificada extraída da vermicompostagem apresenta uma atividade hormonal comprovada (Muscolo et al., 1999; Canellas et al., 2002). A possível presença de substâncias indutoras de crescimento radicular do tipo auxínicas no humato de vermicomposto promove o desenvolvimento de raízes laterais e de sítios meristemáticos (Figura 2) e indução da atividade de hidrólise de ATP da plasmalema (Figura 3), concorrendo para maior acidificação do apoplasto e energização dos transportadores de íons (Sze, 1985).

Apesar de não ser observada diferença no estímulo no comprimento (Figura 1a) e na área radicular (Figura 1b) nas doses mais elevadas de humatos (75 e 100 mg L<sup>-1</sup> de C), a função matemática que também se aplica ao número de sítios de mitose, de raízes laterais emergidas e atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática (Figuras 2a, 2b e 3, respectivamente) revela a existência de um segundo pico de bioatividade dos humatos. Esta possibilidade indica que a heterogeneidade e a complexidade química das SH abrigam diferentes componentes estruturais



**Figura 3. Estímulo da atividade vanadato-sensível de hidrólise de ATP da fração microsomal extraída de raízes de plântulas de alface.**

bioativos. Alguns destes componentes atingiriam sua concentração ótima, para sensibilizar os respectivos receptores celulares em níveis próximos a 25 mg L<sup>-1</sup> de C, enquanto outros numa concentração acima de 100 mg L<sup>-1</sup> de C. Entretanto, o pico de estimulação das raízes das plântulas de alface observado na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> mostra que essa seria a concentração mais econômica para aplicação de humatos de vermicomposto numa escala maior de produção.

A aceleração do desenvolvimento do sistema radicular nas plântulas de alface tratadas com humato de vermicomposto na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> de C pode favorecer a adaptação das plântulas no período de pós-transplante. O sistema orgânico de produção de alimentos não utiliza fontes prontamente solúveis de nutrientes e depende da liberação lenta dos íons provenientes da mineralização da matéria orgânica. Numa fase inicial, esse aumento do sistema radicular de plântulas antes do transplante pode ser um aliado importante para os sistemas de agricultura em conversão para o sistema orgânico de produção.

## CONCLUSÕES

1. O uso de humato de vermicomposto na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> na água de irrigação mostrou-se eficiente em promover o desenvolvimento do sistema radicular de plântulas de alface.

2. Nessa concentração de humato, observou-se forte estímulo na atividade de hidrólise da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática, indicando que as bombas de H<sup>+</sup>, graças ao seu papel central no crescimento e na absorção de íons, têm sido um marcador eficiente da bioatividade das substâncias húmicas.

## LITERATURA CITADA

- ADANI, F.; GENEVINI, P.; ZACCHEO, P. & ZOCCHI, G. The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. *J. Plant Nutr.*, 21:561-575, 1998.
- ALBANELL, E.; PLAILATS, J.; CABRERO, T. & CAPELLAS, M. Composición química del estiércol de vaca fresco y maduro durante el vermicompostaje. In: CONGRESSO DE BIOLOGIA AMBIENTAL, Barcelona, 1988. Anais. Barcelona, Universidad Autonoma de Barcelona, 1988. p.247-252.
- ALBUZIO, A.; FERRARI, G. & NARDI, S. Effects of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings. *Can. J. Soil Sci.*, 66:731-736, 1996.
- ALMEIDA, D.L. Contribuição da matéria orgânica na fertilidade do solo. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1991. 188p. (Tese de Doutorado)
- ALTIERI, M. Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. *Agr. Ecosys. Environ.*, 93:1-24, 2002.
- BOTTOMLEY, W. B. Some effects of organic-promotion substances auxinones) on the growth of *Lema minor* in mineral cultural solutions. *Proc. Royal Sci. London Biol.*, 89:481-505, 1917.
- 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.*, 130:1951-1957, 2002.
- CANELLAS, L.P. & FAÇANHA, A.R. Relationship between nature of soil humified fractions and their bioactivity. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39:233-240, 2004.
- CAVENDER, N.D.; ATIYEH, R.M. & EDWARDS, C.A. Influence of vermicomposts an arbuscular mycorrhizal infection of *Sorghum bicolor* and plant growth. In: 2<sup>nd</sup> INTERNATIONAL SOIL ECOLOGY CONFERENCE, 2., Chicago, 1990. Anais. Chicago, 1990. p.23.
- CHEN, Y. & AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. In: MaCCARTHY, P.; CAPP, C.E.; MALCOLM, R.L. & BLOOM, P.R., eds Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. Madison, American Society of America, 1990. p.161-186.
- CLARO, S.A. Referenciais tecnológicos para a agricultura familiar ecológica. Porto Alegre, EMATER/RS-ASCAR, 2001. 241p.
- COSGROVE, D.J. Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell*, 9:1031-1041, 1997.
- DE MICHELIS, M.I. & SPANSWICK, R.M. H<sup>+</sup>-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corns roots. *Plant Physiol.*, 81:542-547, 1986.
- DELL'AGNOLA, G. & NARDI, S. Hormone-like effect and enhanced nitrate uptake induced by depolycondensated humic fractions obtained from *Allolobofora rosea* and *A. caliginosa* faeces. *Biol. Fert. Soils*, 4:115-118, 1987.
- FAÇANHA, A.R.; FAÇANHA, A.R.; OLIVARES, F.L.; VELLOSO, A.C.X.; BRAZ-FILHO, R.; SANTOS, G.A. & CANELLAS, L.P. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento de prótons. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37:1301-1310, 2002.
- FISKE, C.F. & SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66:375, 1925.
- FRIAS, I.; CALDEIRA, M.T.; PEREZ, C.J.R.; NAVARRO, A.J.P.; CULIANEZ, M.F.A.; KUPPINGER, O.; STRANSKY, A.; PAGES, M.; HAGER, A. & SERRANO, R. A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8:1533-1544, 1996.
- GERBEAU, P.; AMODEO, G.; HENZLER, T.; SANTONI, V.; RIPOCHE, P. & CHRISTOPHE, M. The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J.*, 30:71-81, 2002.
- HARTENSTEIN, R. & HARTENSTEIN, F. Physicochemical changes affected in activated sludge by the earthworm *Eisenia foetida*. *J. Environ. Qual.*, 10:377-382, 1981.

- JHAN, T.; BALUSKA, F.; MICHALKE, W.; HAUPER, J.F. & VOLKMANN, D. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in root apex: evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiol. Plant*, 104:311-316, 1998.
- KONONOVA, M.M. *Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona, Oikos-Tau, 1982. 364p.
- LANDGRAF, M.D.; ALVES, M.R.; DA SILVA, S.C. & REZENDE, M.O.D. Characterization of humic acids from vermicompost of cattle manure composting by 3 and 6 months. *Química Nova*, 22:483-486, 1999.
- LOQUET, M. & VINCESLAS, M. Cellulolytic and ligninolytic activities in the gut of *Eisenia foetida*. *Rev. d'écologie. Boil. Sols*, 24:559-560, 1987.
- MASCIANDARO, G.; CECCANTI, B. & GARCIA, C. Soil agro-ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores. Technol.*, 59:199-206, 1999.
- MAUREL, C. & CHRISPEELS, M.J. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.*, 125:135-138, 2001.
- 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.*, 31:1303-1311, 1999.
- MUSCOLO, A.; CUTRUPI, S. & NARDI, S. IAA detection in humic substances. *Soil Biol. Biochem.*, 30:1199-1201, 1998.
- MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M.R.; ABENAVOLI, M.R.; CONCHERI, G. & NARDI, S. Effect of molecular complexity and acidity of earthworm faeces humic fractions on glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Daucus carota* cells. *Biol. Fertil. Soils*, 22:83-88, 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 Biol. Biochem.*, 23:833-836, 1991.
- NARDI, S.; PANUCCIO, M.R.; ABENAVOLI, M.R. & MUSCOLO, A. Auxin-like effect of humic substances extracted from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. *Soil Biol. Biochem.*, 26:1341-1346, 1994.
- QUAGGIOTTI, S.; RUPERT, 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. Exper. Bot.*, 55:803-813, 2004.
- RAYLE, D.L. & CLELAND, R.E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.*, 99:1271-1274, 1992.
- SZE, H. H<sup>+</sup>-Translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 36:175-208, 1985.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre, Artmed, 2004. 719p.
- 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 Soil*, 153:61-69, 1993.
- VAUGHAN, D. & MALCOLM, R.E. Influence of humic substances on growth and physiological processes. In: VAUGHAN, D. & MALCOLM, R.E., eds. *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht, Martinus Nijhoff Dr W. Junk Publisher, 1985. p.37-75.
- VISSER, S.A. Fluorescence phenomena of humic matter of aquatic origin and microbial cultures. In: CHRISTMAN, R.F. & GESSING, E.T., eds. *Aquatic and terrestrial humic materials*. Ann Arbor, Ann Arbor Science, 1983. p.183-202.