

**PERFIL METABÓLICO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADA COM
BIOINOCULANTE À BASE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS**

NATÁLIA DE OLIVEIRA AGUIAR

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Outubro-2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 202/2015

Aguiar, Natália de Oliveira

Perfil metabólico de cana-de-açúcar tratada com bioinoculante à base de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas / Natália de Oliveira Aguiar. – 2015.

134 f. : il.

Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 125 – 131.

1. Ácidos húmicos 2. Inoculantes 3. Metaboloma 4. Biotecnologia I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD–
631.417

PERFIL METABÓLICO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADA COM
BIOINOCULANTE À BASE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

NATÁLIA DE OLIVEIRA AGUIAR

“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas
Co-orientador: Etelvino Henrique Novotny

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Outubro-2015

PERFIL METABÓLICO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADA COM
BIOINOCULANTE À BASE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

NATÁLIA DE OLIVEIRA AGUIAR

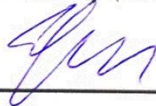
“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal”.

Aprovada em 15 de outubro de 2015

Comissão Examinadora



Pesq. Etelvino Henrique Novotny (D.Sc.Química) - Embrapa Solos



Prof. Eduardo de Sá Mendonça (Ph.D., Ciência do Solo) - UFES



Prof. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



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

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Em especial à minha família;

A CAPES pela bolsa de doutorado;

Ao Programa Ciências Sem Fronteiras do Governo do Federal pela concessão da bolsa e oportunidade de estágio no exterior;

Ao Genome Center (UC-Davis California) e especialmente ao West Coast Metabolomics chefiado pelo prof. Oliver Fiehn;

Ao Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (Nudiba) pelo suporte técnico;

Ao Luciano pela orientação e incentivo. Ao Etelvino Novotny pela coorientação e ao prof. Fábio Olivares pela parceria nos trabalhos;

Aos recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), International Foundation of Science (IFS), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT FBN);

A UENF por me acolher durante a graduação, mestrado e doutorado. Finalmente, meu agradecimento aos colegas de trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
SUMÁRIO	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Metabolismo primário.....	6
2.2 Metabolismo secundário	9
2.3 Análise Metabolômica	19
2.4 Bioinoculantes à base de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas	26
CAPÍTULO 1	43
PERFIL METABÓLICO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADA COM ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS.....	43
RESUMO	43
ABSTRACT	45
1.INTRODUÇÃO.....	46
2.MATERIAL E MÉTODOS	50

2.1 Extração de AH	50
2.2 Obtenção dos micro-organismos.....	50
2.3 Condições de crescimento da cana-de-açúcar.....	51
2.4 Obtenção dos extratos.....	52
2.5 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas com analisador por tempo de voo (do inglês <i>gas chromatography time-of-flight mass spectrometry GC-TOF-MS</i>).....	52
2.6 Análise dos Componentes Principais (ACP).....	53
3.RESULTADOS.....	54
3.1. Compostos identificados por CG-EM.....	54
3.2. Análise multivariada dos dados	57
3.3 Carboidratos (Tabela 1).....	59
3.6. Lipídios (Tabela 4).....	65
3.8. Compostos aromáticos (Tabela 6).....	68
4. DISCUSSÃO.....	70
4.7 Visão integrada.....	77
6.CONCLUSÃO	79
7.AGRADECIMENTOS.....	80
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
CAPÍTULO 2	88
PERFIL METABÓLICO E RESPOSTAS DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DURANTE A RECUPERAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO EM CANA-DE-AÇÚCAR TRATADA COM ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS	88
RESUMO	88
ABSTRACT	90
1.INTRODUÇÃO.....	91
2. MATERIAL E MÉTODOS	94
2.1 Microrganismos e ácidos húmicos.....	94
2.2 Experimento em casa de vegetação	95

2.3 Conteúdo de N e atividade de enzimas antioxidantes	96
2.4 Conteúdo relativo de água (RWC) e potencial de água na folha (Ψ_w)	97
2.5 Preparação das amostras e análise de RMN 1H.....	97
2.6 Estatística	98
3. RESULTADOS.....	99
3.1 Biomassa e conteúdo de N.....	99
3.2 Conteúdo relativo de água (RWC) e potencial hídrico das folhas (Ψ_w) ..	101
3.3 Atividade fotossintética	101
3.4 Atividade das enzimas antioxidantes.....	104
3.5 Perfil metabólico	104
4. DISCUSSÃO.....	108
5. CONCLUSÃO	111
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
RESUMO E CONCLUSÕES	119
APENDICE 1.....	120
APENDICE 2.....	121

RESUMO

AGUIAR, NATÁLIA DE O. Dsc.- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Outubro de 2015. PERFIL METABÓLICO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADA COM BIOINOCULANTE À BASE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS. Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas. Coorientador: Etelvino Henrique Novotny.

Um novo conceito de bio-inoculante vem sendo desenvolvido baseado no uso em conjunto de substâncias húmicas e micro-organismos promotores de crescimento vegetal. O uso de biofertilizantes representa uma das alternativas de intensificação ecológica que tem como objetivo o manejo eficiente dos nutrientes, a conservação do solo e da água mantendo níveis elevados de produção. Mudanças na bioenergética celular, no metabolismo primário e secundário, assim como aumentos na produtividade, já foram observadas em plantas tratadas com ácidos húmicos (AH) ou com a combinação de substâncias húmicas e bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). A consistência das respostas a campo desse tipo de biotecnologia passa pelo entendimento da interação planta – biofertilizante. Na era pós-genômica, a análise metabolômica surgiu como uma ferramenta poderosa que tem como objetivo a identificação e a quantificação de metabólitos intra e extracelulares de baixa massa molar (< 1000 Da) com o uso de diferentes técnicas analíticas. As alterações observadas nos níveis de metabólitos permitem identificar rapidamente modificações em vias metabólicas específicas, facilitando a integração efetiva dos dados obtidos nas diferentes áreas da

“genômica funcional”. Nesse trabalho a plataforma metabolômica foi utilizada com objetivo de estudar: (Cap. 1) o perfil metabólico de cana-de-açúcar tratada com AH e bactérias diazotróficas endofíticas através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas com analisador por tempo de voo (CG-TOF-MS) e (Cap. 2) o perfil metabólico e respostas de enzimas antioxidantes durante a recuperação do estresse hídrico em cana-de-açúcar tratada com AH e bactérias diazotróficas endofíticas. No Capítulo 1 os tratamentos foram aplicados 45 dias após a germinação e as folhas foram coletadas após cinco dias para a análise do perfil metabólico utilizando a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas com analisador por tempo voo. Foram identificados 280 compostos em cada tratamento, classificados como: Os compostos identificados pertenceram, principalmente, a categoria dos carboidratos (29%), lipídios (17%), ácidos orgânicos (16%), compostos nitrogenados que não aminoácidos (13%), aromáticos (11%), aminoácidos (9%) e outros (5%). A aplicação isolada de AH diminui a concentração de um grande número de compostos em comparação com o controle. Foi possível identificar diversos compostos com concentração elevada e que atuam na regulação do *status* redox da célula, na proteção antioxidante, osmoregulação e na resposta geral a diferentes estresses bióticos e abióticos. A análise multivariada permitiu agrupar os tratamentos de acordo com as vias metabólicas e, portanto, indicar compostos chave induzidos pelos tratamentos. As plantas inoculadas com AH+BPCV tiveram o metabolismo da via glicolítica, do ciclo do ácido tricarboxílico, das pentoses, dos aminoácidos, do ácido chiquímico, e do mevalonato estimulados com aumentos significativos na concentração dos compostos. No Capítulo 2 foi avaliado o perfil metabólico e a atividade de enzimas antioxidantes em cana-de-açúcar tratada com bactérias promotoras do crescimento vegetal e AH durante o período de reidratação das plantas após 21 dias de estresse hídrico. Cinco dias após a retomada da irrigação foi medida a atividade de enzimas antioxidantes nas folhas e raízes e avaliada as possíveis mudanças no perfil metabólico por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) nos extratos de folha. A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase permaneceu elevada após a reidratação apenas no tratamento com ácidos húmicos. O ajustamento

osmótico foi o mecanismo de resistência encontrado nos demais tratamentos, indicado por um novo padrão de resposta metabólica após a reidratação que envolveu o aumento geral de carboidratos e proteínas. A recuperação do estresse hídrico em plantas tratadas com AH envolveu a atividade de enzimas antioxidantes e ajustamento osmótico enquanto que o tratamento com BPCV além do ajustamento osmótico induziram a maior preservação do potencial de água na folha pelo fechamento mais eficiente dos estômatos resultando na preservação da água. A plataforma metabolômica associada à análise multivariada permitiu identificar as principais rotas metabólicas alteradas em função da aplicação do biofertilizante. O biofertilizante a base de AH e BPCV além de estimular o crescimento das plantas, é capaz de ativar rotas bioquímicas responsáveis pela maior tolerância às situações de estresses abióticos, como por exemplo, a seca. A identificação dos compostos chave abre perspectivas de estudo para o desenvolvimento de plantas mais responsivas a esse tipo de insumo e conseqüentemente mais adaptadas às condições adversas do ambiente.

ABSTRACT

AGUIAR, NATÁLIA DE O. Dsc.- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. October de 2015. METABOLIC PROFILE OF SUGARCANE TREATED WITH BIOINOCULANT BASED USE HUMIC SUBSTANCES AND ENDOPHYTIC BACTERIA DIAZOTROPHIC. Advisor: Luciano Pasqualoto Canellas. Co-advisor: Etelvino Henrique Novotny.

A new concept of bioinoculant is being developed based on the combined use of humic substances and plant growth-promoting microorganisms. The use of this biofertilizers representing an alternative to ecological intensification of agriculture that have as objective the efficient management of nutrients, soil and water conservation maintaining high production level. Changes in cellular bioenergetics, metabolism of nitrogen and sugars together with an increase in maize yield have already been observed. The extension of these results and enhance field responses consistency needs the understanding of plant - biofertilizer interaction. In the post-genomic analysis metabolomics has emerged as a powerful tool with the objective to identify and quantify low molecular weight (<1000 Da) intracellular and extracellular metabolites using different analytical techniques. The observed changes in metabolite levels allows quickly to identify the changes in specific metabolic pathways, facilitating the effective integration of data obtained in different areas of "functional genomics". However, studies related to possible changes in the profile of secondary metabolites in plants treated with humic substances and plant growth-promoting microorganisms are non-existent. In this work metabolomics platform was used in order to study: (Paper 1) the metabolic profile of sugarcane treated with humic acids and endophytic bacteria and (Paper 2) metabolic profile and responses antioxidant enzymes during recovery of water

stress in sugarcane treated with humic acids and endophytic bacteria. In the paper 1, the treatments were applied 45 days after germination and leaves were collected after five days to analyse the metabolic profile by gas chromatography coupled with mass spectrometry with time of flight analyse. Were identified 280 compounds in each treatment classified as: carbohydrates (30%), organic acids (16%), amino acids (9%), lipids (17%), nitrogen (12%), and aromatics (11%). The isolated application of HA reduces the concentration of a large number of compounds compared to control. It was possible to identify several compounds with high concentration and acting in the regulation of cell redox status, antioxidant protection, osmoregulation and overall response to different biotic and abiotic stresses. The multivariate analysis grouped the treatments in accordance with the metabolic pathways and thus indicated compounds key induced by treatments. The glycolic pathway, tricarboxylic acids and pentose metabolism, amino acids, shikimic acid, and mevalonate pathways were induced by inoculation of BGPB + HA and produce significant increases in compounds concentration. In the Paper 2 was evaluated the metabolic profile and activity of antioxidant enzymes in sugarcane treated with plant growth promoting bacteria and humic acid during the rehydration period after 21 days of water stress. Five days after the resumption of irrigation was measured the activity of antioxidant enzymes in leaves and roots and evaluated the possible changes in the metabolic profile leaf extracts by NMR. The activity antioxidant that enzymes superoxide dismutase, catalase and peroxidase ascorbate remained high after rehydration only in treatment with humic acids. The osmotic adjustment was the resistance mechanism found in other treatments, indicated by new pattern of metabolic response after rehydration involving the general increase of carbohydrates and protein. The recovery of water stress in plants treated with humic acids involved the activity of antioxidant enzymes and osmotic adjustment while BGPB beyond the osmotic adjustment led to greater preservation of water potential in the most efficient leaf stomatal closure resulting in the preservation of water. The metabolomics platform together with multivariate analysis identified the main metabolic pathways changed due to application of biofertilizers. The biofertilizer based use HA and BGPB stimulate plant growth and is able to activate biochemical pathways responsible for increased tolerance to situations of abiotic stresses such as drought. The identification of target compounds opens study perspectives for the development of more responsive plants to biofertilizer and consequently more adapted to adverse environmental conditions.

1. INTRODUÇÃO

O século XX foi marcado pelo aumento da produção de alimentos, tanto pela expansão territorial da agricultura quanto pelo aumento da produtividade, pressionado pelo crescimento exponencial da população mundial. A intensificação da produção iniciada no Brasil nas décadas de 1960 e 1970 fundamentou-se em um conjunto de técnicas conhecidas como pacote tecnológico da Revolução Verde baseado (até hoje) na mecanização do solo, no uso indiscriminado de agrotóxicos, fertilizantes químicos, água e outros recursos naturais, e mais recentemente, transgenia e outras técnicas biotecnológicas.

Esse modelo de produção baseado no uso insustentável dos recursos naturais gera impactos negativos ao meio ambiente, tais como: intensificação dos efeitos do aquecimento global, esgotamento das principais reservas minerais e hídricas, degradação dos solos, perda da biodiversidade, contaminação da população pelo uso excessivo de agrotóxicos, dentre outros. A falência desse modelo impõe a necessidade do desenvolvimento de alternativas para a produção agrícola baseadas no uso consciente dos recursos naturais e põe em evidência o conceito de sustentabilidade dos sistemas.

A intensificação ecológica pode ser uma alternativa para de reduzir a dependência das lavouras aos insumos externos e manter níveis elevados de produtividade com o uso mais eficiente de terras, recursos hídricos e nutrientes (Titonell, 2014). A biodiversidade, otimização da ciclagem de nutrientes, o uso de

insumos não convencionais, tais como carvão (*biochar*) (Novotny et al., 2015), a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a solubilização de rochas fosfatadas são alguns exemplos de manejos que podem ser amplificados com as tecnologias sustentáveis para garantir o potencial produtivo do solo (Olivares, 2009).

O manejo dos processos biotecnológicos naturais ainda está muito aquém do potencial que pode representar para o sucesso da produção agrícola sustentada. O Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA) desenvolveu um novo conceito de biofertilizante para uso agrícola patenteado pela Universidade Estadual do Norte Fluminense no Instituto Nacional de Pesquisa Industrial sob nº BR200621917-A2. Esse biofertilizante utiliza substâncias húmicas como veículo de introdução de micro-organismos diazotróficos endofíticos em sistemas de produção agrícola. Este processo biotecnológico surge como uma alternativa de baixo custo e ambientalmente correta para aumentar a eficiência do uso de nutrientes (Canellas et al., 2013).

As substâncias húmicas (SH) são o principal constituinte da matéria orgânica do solo e podem afetar positivamente a produção por terem um papel importante tanto no sistema solo-planta como no metabolismo, crescimento e desenvolvimento das plantas (Vaccaro et al., 2015). A aplicação direta de SH sobre as plantas pode induzir mudanças no metabolismo do carbono (C) e nitrogênio (N) uma vez que influenciam a atividade das enzimas associadas à glicólise, ao ciclo de Krebs, à assimilação de N além de modificar o metabolismo secundário (Nardi et al., 2009) podendo resultar em aumento do crescimento da raiz e da parte aérea (Rose et al., 2014; Sleighter et al., 2015).

As bactérias diazotróficas endofíticas são consideradas uma das mais eficientes promotoras do crescimento vegetal (BPCV) usadas como inoculantes em plantas não leguminosas (Dobereiner e Pedrosa, 1987; James e Baldani, 2012). A redução do N feita por estas bactérias pode representar uma parte significativa do N requerido pelas plantas e substituir total ou parcialmente a fertilização nitrogenada (Baldani et al. 2002). A economia do uso de N em larga escala via FBN é uma meta ainda a ser atingida em plantas não leguminosas. Alguns inoculantes a base de *Azospirillum brasilense* estirpe BR 11005 já estão disponíveis no mercado (www.forquimica.com.br). Atualmente a inoculação da

soja com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* supre a necessidade de N para as plantas e estima-se uma economia de mais de três bilhões de dólares anuais em fertilizantes nitrogenados. Entretanto, apesar da literatura reportar os efeitos benéficos dos inoculantes microbianos para não leguminosas, na prática, pouco se sabe sobre o modo de ação nas plantas. Sua comercialização ainda é insignificante frente ao tamanho da cadeia de produção das plantas não leguminosas no Brasil.

A consistência das respostas a campo desse tipo de biotecnologia passa pelo entendimento da interação planta – biofertilizante. Diferente da ação direta dos fertilizantes químicos, os insumos biológicos dependem de uma relação com a planta. Os efeitos podem variar de acordo com a espécie e idade da planta, concentração e forma de aplicação do produto (foliar ou diretamente no solo), tipo de solo e condições ambientais, entre outros aspectos.

Nesse contexto o estudo detalhado das possíveis alterações metabólicas ocorridas nas plantas em função do tratamento com SH e BPCV é necessário, uma vez que o mecanismo de ação da maioria dos insumos biológicos ainda é pouco conhecido (Owen et al., 2015).

Os métodos mais utilizados para esse tipo de estudo são baseados em análises do genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma. Entretanto, após anos de pesquisa percebeu-se que o sequenciamento genético por si só não era suficiente para entender toda maquinaria celular de um organismo e que as alterações nos níveis de RNAm nem sempre resultam em alterações nos níveis de proteínas (Gygi et al., 1999). Além disso, uma vez traduzida, uma proteína pode estar ou não enzimaticamente ativa (Sumner et al., 2003). Logo, as alterações observadas no transcriptoma e no proteoma nem sempre correspondem a alterações fenotípicas. Nesses casos, uma alternativa de estudo é a análise metabolômica que surgiu recentemente como uma poderosa ferramenta com o objetivo de identificar e quantificar metabólitos intra e extracelulares de baixa massa molar (< 1000 Da) fazendo uso de diferentes técnicas analíticas. A produção de metabólitos representa o produto final da expressão gênica e alterações observadas nas concentrações dos metabólitos permitem identificar rapidamente modificações em vias metabólicas específicas,

facilitando a integração efetiva dos dados obtidos nas demais áreas da biotecnologia (genômica, proteômica e transcriptômica).

Atualmente, as principais ferramentas analíticas utilizadas na detecção dos metabólitos são a espectrometria de massas (EM) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A combinação da EM de alta resolução com métodos de separação cromatográfica (cromatografia líquida ou gasosa) constitui um dos avanços que ampliaram enormemente a capacidade de análise de amostras biológicas complexas gerando uma quantidade enorme de dados (espectros) com uma única análise. A análise multivariada de dados é uma ferramenta matemática muito utilizada na plataforma metabolômica em função da capacidade de processamento e visualização da grande quantidade de informações obtidas. Dentre elas destacam-se a análise de variância multivariada (*“Multivariate Analysis of Variance - MANOVA”*), análise de componentes principais (*“Principal Component Analysis - PCA”*), a análise discriminante por mínimos quadrados parcial (Discriminant Analysis-Partial Least Squares PLS-DA).

Avaliar o efeito dos insumos biológicos à base de SH e BPCV sobre o metabolismo da cana-de-açúcar é o objetivo deste trabalho. Segue antes uma apresentação dos principais eventos do metabolismo primário condensado do livro texto de fisiologia vegetal de Taiz e Zeigler (2006) e do metabolismo secundário extraído de Seigler (1998), bem como, uma revisão bibliográfica sobre os princípios e métodos da análise metabolômica e dos biofertilizantes à base de SH e BPCV.

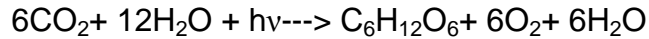
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O metabolismo de um organismo vivo pode ser definido como o conjunto de reações bioquímicas (anabolismo e catabolismo) que ocorrem nas células. Essas reações podem ser lineares (glicose → piruvato) ou cíclicas (ciclo de Krebs), convergentes (produção do acetil CoA) ou divergentes. Os principais mecanismos de regulação metabólica se baseiam nos níveis (concentrações) e na atividade das enzimas envolvidas em cada reação. Nos organismos vivos essas reações são responsáveis por todos os processos vitais como produção de energia, poder redutor e esqueletos de carbono (Fell, 1997).

Todos esses processos em conjunto permitem que a planta se adeque aos diferentes ambientes e consiga crescer, se desenvolver e reproduzir. Atualmente a atividade metabólica das células vegetais é dividida em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário pode ser definido como o conjunto de processos metabólicos que desempenha funções essenciais nas plantas, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos.

2.1 Metabolismo primário

A reação abaixo resume de forma simplificada a fotossíntese:



(Equação 1)

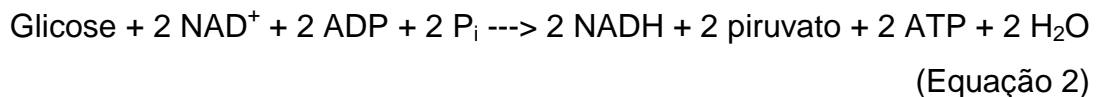
A energia ($h\nu$) é usada para a fotólise da água (quebra da molécula em hidrogênio e oxigênio). A energia dos elétrons excitados é armazenada nas ligações químicas das moléculas dos açúcares formados.

A fotossíntese é um processo redox endergônico no qual a água é oxidada e o dióxido de carbono (CO_2) reduzido. O processo compreende duas fases inter-relacionadas, a fase clara, ou seja, as reações dependentes de luz visível e a fase escura conhecida como reações do Ciclo de Calvin no qual ocorre a glicólise. As reações da fase clara produzem ATP por fotofosforilação e oxigênio (O_2). Há também a geração de NADPH através da transferência de elétrons da água para o NADP^+ . Esse processo ocorre nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos. O ATP e o NADPH gerados na fase clara da fotossíntese são consumidos nos cloroplastos na fixação do CO_2 em açúcares (sacarose e amido) por uma série de reações elucidadas por Melvin Calvin e seus colaboradores no final da década de 1940 e início dos anos 1950. Essa série de reações ocorre no estroma dos cloroplastos. Em termos teóricos o processo pode ser dividido nos seguintes passos: (i) fixação de CO_2 ou carboxilação, (ii) redução do fosfoglicerato ou formação de carboidratos a partir de ATP e NADPH e (iii) regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (McManus e Plaxton, 2006).

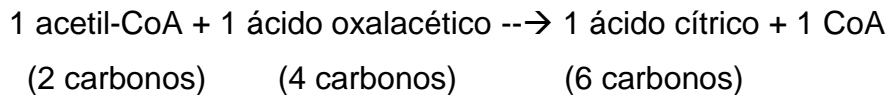
O átomo de carbono do CO_2 é incorporado ao receptor ribulose 1,5 bisfosfato, um composto de cinco carbonos em reação catalisada pela enzima RubisCO formando um composto de seis carbonos muito instável que imediatamente é quebrado em duas unidades de gliceraldeído 3-fosfato (GAF). As unidades de GAF não usadas para recompor a ribulose 1,5 bisfosfato no ciclo de Calvin constituirão os esqueletos de carbono dos compostos do metabolismo primário (carboidratos, proteínas, nucleotídeos, ácidos graxos) e secundário.

Embora a biossíntese de amido e sacarose represente o maior dreno de CO₂ assimilado, uma porção significativa de C reduzido é requerida como precursor de um grande número de compostos das vias metabólicas primárias e secundárias. O C reduzido pode ser diretamente retirado do ciclo de Calvin na forma de eritrose-4-fosfato como precursor da via dos fenilpropanóides (via do ácido chiquímico), localizada no plastídio, ou ser exportada para o citoplasma como triose fosfato para ser convertido no ciclo glicolítico a, por exemplo, fosfoenol piruvato ou piruvato, que são os precursores da respiração mitocondrial, bem como para a biossíntese de ácidos orgânicos e aminoácidos (McManus e Plaxton, 2006).

A glicólise é o processo pelo qual uma molécula de sacarose (um açúcar de 12 carbonos) é quebrada e produz quatro moléculas de açúcar de três carbonos (trioses). Essas trioses são, então, oxidadas e rearranjadas para produzir quatro moléculas de piruvato. A via glicolítica se resume em um conjunto de dez reações catalisadas por enzimas. É uma das principais rotas para geração de ATP e poder redutor nas células (Nelson e Michel, 2011). A equação abaixo resume o processo de glicólise:



O produto final da glicólise, o piruvato, pode sofrer uma reação intermediária nas mitocôndrias e ser transformado em acetil-CoA, o precursor das reações do ciclo de Krebs. Nesta etapa, ocorre a entrada de NAD e CoA-SH no processo. O piruvato gerado na glicólise sofre desidrogenação (oxidação) e descarboxilação catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase. Durante essas reações é adicionada a co-enzima A (CoA). Dessa forma, a partir de cada piruvato, produz-se um acetil-CoA, de acordo com a equação simplificada:



(Equação 3)

Cada ácido cítrico passará, em seguida, por uma via metabólica cíclica, denominada ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs, durante o qual se transformará sucessivamente em outros compostos. Os oito H⁺ liberados no ciclo de Krebs reagem com duas substâncias aceptoras, o NAD e o FAD, que os conduzirão até as cadeias transportadoras, onde fornecerão energia para a síntese de ATP. No próprio ciclo ocorre, para cada acetil que reage, a formação de uma molécula de ATP (Heldt, 2005; Nelson e Michel, 2011).

Os açúcares transformados na via glicolítica (ciclo de Clavin) e pela via do ácido tricarbóxico (TCA ou ciclo de Krebs) são utilizados como esqueletos de carbono para biossíntese de aminoácidos e ácidos orgânicos e também dos compostos produzidos no metabolismo secundário. Existe também uma via alternativa para o metabolismo da glicose conhecida como a via das pentoses-fosfato. Esta via não gera ATP, mas produz NADPH para as sínteses redutivas, como as biossínteses dos ácidos graxos e esteróides; ribose para a biossíntese dos nucleotídeos e dos ácidos nucleicos e eritrose-4-fosfato, que ao combinar-se com o fosfoenolpiruvato produz os compostos fenólicos precursores da via do ácido chiquímico (Heldt, 2005).

O metabolismo do N e do C é altamente interconectado. Toda a energia, poder redutor e esqueletos de carbono usados no processo de redução e assimilação do N advêm do processo de fotossíntese (Nunes-Nesi et al., 2010). A assimilação de N inorgânico em compostos orgânicos é essencial para o crescimento e o desenvolvimento da célula e faz parte do seu metabolismo primário. A maioria das espécies vegetais é capaz de absorver N na forma de nitrato, amônio, peptídeos e aminoácidos (Crawford e Glass, 1998). No entanto, o nitrato (NO₃⁻) e o amônio (NH₄⁺) são as formas preferenciais absorvidas pelas plantas durante seu crescimento (Forde, 2000). O N absorvido pelas raízes é metabolizado ainda nas raízes ou é transportado para a parte aérea através do xilema. A forma como o N é transportado depende da forma absorvida (NO³⁻ ou

NH_4^+) e do metabolismo das raízes. A maior parte do NH_4^+ absorvido é assimilado nas raízes enquanto o NO_3^- pode ser metabolizado nas raízes ou transportado para a parte aérea como tal (Mengel e Kirkby, 1987). O NH_4^+ pode ser absorvido diretamente do solo, fixado por micro-organismos ou produzido pela redução do NO_3^- . O processo de absorção do NO_3^- induz a atividade da enzima nitrato redutase que o reduz a nitrito. Em seguida o nitrito é reduzido a NH_4^+ pela ação da enzima nitrito redutase (Tischiner, 2000). O NH_4^+ absorvido ou proveniente da redução do NO_3^- é imediatamente incorporado a esqueletos de carbono preferencialmente por meio das enzimas glutamina-glutamato sintase (GS-GOGAT). Uma vez assimilado, o N pode ser convertido em outros compostos orgânicos através de diversas reações, incluindo as de transaminação.

Os cloroplastos são os principais sítios intracelulares de síntese de aminoácidos em plantas. A glutamina (GLU) e os aminoácidos menores valina (VAL), arginina (ARG), histidina (HIS), leucina (LEU), triptofano (TRP), tirosina (TYR), metionina (Me), fenilalanina (PHE), cistina (CYS) e lisina (LYS) são predominantemente, ou exclusivamente sintetizados nos plastídios do estroma. Aspartato (ASP), serina (SER) e glicerina (GLY) podem ser sintetizados em diferentes compartimentos, enquanto que a asparagina sintase é encontrada no citoplasma (Steward e Street, 1947). A inter-relação entre o metabolismo do C e do N fornece a base para a biossíntese dos metabólitos considerados como secundários nas plantas.

2.2 Metabolismo secundário

Os metabólitos secundários são produzidos a partir de produtos do metabolismo primário e normalmente considerados não essenciais para os processos metabólicos básicos da planta (Seigler, 1998). Entretanto para algumas plantas eles têm um papel importante na defesa contra herbívoros, insetos e patógenos. Alguns compostos também são considerados sinalizadores (atrativos para polinizadores e dispersores de sementes) e por isso são importantes para sobrevivência e reprodução de algumas espécies. Aproximadamente cem mil metabólitos secundários já foram identificados no reino vegetal, sendo

caracterizados por uma enorme diversidade química e especificidade de cada planta (Verpoorte, 1998).

O estresse metabólico pode ser considerado como a expressão do metabolismo secundário das plantas quando estão submetidas a diferentes tipos de estresse biótico ou abiótico decorrentes de mudanças no equilíbrio de um ecossistema (Ramakrishna & Ravishankar, 2011). As plantas, como organismos sésseis, alteram seu metabolismo para se adaptarem. Em resposta, observa-se que a diversidade química das plantas tende a refletir a evolução (Gottlieb, 1996). A conquista do meio terrestre pelas angiospermas foi acompanhada por alterações em algumas vias do metabolismo secundário, especialmente da via dos fenilpropanóides em função do estabelecimento definitivo da camada de ozônio e da capacidade de atenuação de radiação UV dos derivados fenólicos e da necessidade de suporte físico (rigidez dos tecidos) levado a cabo com a polimerização da lignina (Gottlieb, 1991). A domesticação das plantas usadas para alimentação do homem realizada em conjunto com a seleção agrônômica mais moderna eliminou a maior parte dos compostos tóxicos produzidos para sua proteção e adaptação. As vias metabólicas de defesa contra pragas e doenças e a adaptação a limitações nutricionais normalmente encontradas na solução do solo foram substituídas pela aplicação de agrotóxicos e adubos químicos. O estudo das respostas adaptativas marcadas no metabolismo secundário pode ser uma estratégia interessante para o aumento das respostas das plantas aos biofertilizantes uma vez que, diferente do que ocorre no metabolismo primário no qual os genes envolvidos estão em múltiplas cópias no genoma da planta como estratégia de proteção contra mutações, os genes implicados na síntese de metabólitos secundários estão em uma única cópia (Hadacek, 2008). Isso favorece tanto a adaptação (mutações associadas à diversidade química) como a busca de marcadores de melhoramento contra estresse (e das respostas aos novos insumos biológicos).

A biossíntese de metabólitos secundários é realizada por rotas metabólicas específicas com estreita relação com as rotas de síntese dos metabólitos primários. Essas rotas são interconectadas, ou seja, as rotas que sintetizam metabólitos primários fornecem moléculas que são utilizadas como precursoras

nas principais rotas de síntese de metabólitos secundários. De um modo geral é possível indicar que os metabólitos secundários derivam de três rotas biossintéticas principais: a via do fenilpropanoide, a do isoprenoide e a biossíntese de alcalóides que não obedece nenhuma via específica e é dependente do tipo de aminoácido precursor (Verpoorte, 2000).

Os fenilpropanóides são uma classe de compostos derivados da fenilalanina e têm como esqueleto básico o fenilpropano (C6-C3). O aminoácido essencial fenilalanina é produzido na via do ácido chiquímico, bem como outros aminoácidos aromáticos como tirosina e o triptofano. Os precursores são o fosfoenolpiruvato oriundo da glicólise e a E4P proveniente da pentose fosfato levando a dois intermediários importantes, os ácidos chiquímico e corísmico. As classes mais abundantes de compostos fenólicos em plantas são derivadas da fenilalanina (Vogt, 2010).

A fenilalanina amônia-liase (PAL) destaca-se como uma enzima chave e regulatória da rota de biossíntese dos fenilpropanóides e seus derivados, catalisando a transformação, por desaminação, do aminoácido L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, sendo esse o primeiro passo para a biossíntese dos compostos fenólicos vegetais (Hermann e Weaver, 1999). Janas et al. (2000) ressaltam que a atividade da PAL e o acúmulo de fenóis respondem aos estresses bióticos, como infecção por micro-organismos, ataque de insetos e herbívoros (Rivero et al., 2001) e estresses abióticos como temperatura (Solecka et al., 1999; Janas et al., 2000), luz (Lavola et al., 2000), disponibilidade de água (Chakraborty et al., 2001), ferimentos (Saltveit, 2000) e alterações nos níveis de CO₂ atmosférico (Hartley et al., 2000; Assis et al., 2001). Solecka e Kacperska (1995) relataram que esses estresses podem modificar tanto a síntese da PAL, como a sua atividade, em uma variedade ampla de plantas.

Os metabólitos genericamente chamados de fenólicos simples se diferenciam para formar os compostos polifenólicos que possuem um anel benzênico adicional oriundo da ciclização de três resíduos do ácido mevalônico pela estilbeno sintase ou pela chalcona sintase para formar estilbenos (C6-C2-C6) ou chalconas (C6-C3-C6), respectivamente. Finalmente, as protoantocianinas e os taninos condensados podem ser formados a partir de flavonóides. Os taninos

podem ser convenientemente divididos em taninos condensados, que como mencionado têm origem nos flavonóides e em taninos hidrolisáveis a partir de uma unidade de poliol na qual a função hidroxila é esterificada com derivado do ácido gálico (Vogt, 2010). Os compostos fenólicos compreendem, portanto, uma classe ampla e diferenciada de compostos cujas estruturas básicas são apresentadas na Figura 1.

















Número de C	Nome	Estrutura Básica
C ₆	fenol simples	
	benzoquinonas	
C ₆ -C ₁	Acido benzoico	
C ₆ -C ₂	acetofenonas	
C ₆ -C ₃	Acido fenil acético	
	Acido cinâmico	
	fenilpropeno	
C ₆ -C ₄	cumarinas	
	cromonas	
	naftoquinonas	
C ₆ -C ₁ -C ₆	xantonas	
C ₆ -C ₂ -C ₆	estilbenos	
	antraquinonas	
C ₆ -C ₃ -C ₆	flavonoides	
(C ₆ -C ₃) ₂	lignanas, neolignanas	
(C ₆ -C ₁) _n	taninos hidrolisaveis	 Polimero heterogêneo
(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas	

Figura 1. Principais compostos da via dos fenilpropanóides. Adaptado de Garcia Salas et al. (2010).

Via dos isoprenóides (rota do mevalonato, via dos terpenóides)

Os isoprenóides ou terpenóides representam uma classe química e funcionalmente muito diversa de lipídios de baixa massa molecular. Inclui carreadores de elétrons (quinonas), constituintes de membranas (esteróides), vitaminas (A, D, E, K), hormônios (citoquininas, ácido abscísico, giberelinas, brassinoesteróides), pigmentos (clorofila, fitol, carotenóides) e óleos essenciais.

Conforme Irriti e Faoro (2009), a acetil coenzima A (acetil-CoA) é o precursor da síntese dos isoprenóides. Inicialmente, duas moléculas de acetil-CoA reagem para formar acetoacetil-CoA que ao reagir com outro grupo acetil-CoA produz β -hidroxil, β -metilglutaril-CoA (HMG). Nas plantas a mesma enzima HMG-CoA sintase catalisa ambas as reações. A taxa de conversão da HMG-CoA em mevalonato pela HMG-CoA redutase é a limitação dessa via. A mevalonato quinase e a mevalonato fosfoquinase fosforilam, respectivamente, o mevalonato e depois o mevalonato-5-P produzindo mevalonato difosfato. Em seguida ocorre a descaboxilação do mevalonato difosfato pela difosfato carboxilase, produzindo o composto isopentenil difosfato (IPP), que é o bloco construtor de 5 C das cadeias dos isoprenóides. A enzima IPP dimetilalil-PP isomerase converte IPP até dimetilalil bifosfato (DMAPP), que é o acceptor para as transferências sucessivas dos resíduos de isopentenil. Hemiterpenos como o isopreno (C5) são originados de dimetilalil-PP depois da liberação do bifosfato (PP). O dimetilalil-PP pode condensar com IPP para formar geranyl-PP pela geranyl sintase. O alongamento da cadeia pode ser obtido pela condensação da extremidade da geranyl-PP até IPP para produzir farnesil-PP pela farnesil sintase (Croteau et al., 2000). Analogamente, a geranyl, geranyl-PP sintase catalisa a condensação da extremidade do farnesil-PP até IPP, produzindo então geranylgeranyl-PP. O geranyl-PP é o precursor para a formação de monoterpenos (C10) ou óleos essenciais incluindo os altamente voláteis de cadeia aberta e os cíclicos tais como mentol, geraniol, linalol, pireno. O farnesil-PP é o precursor para a síntese de sesquiterpenos (C15), o maior grupo dos isoprenóides incluindo também óleos essenciais e compostos antibióticos como as fitoalexinas. Os diterpenos (C20), derivados do geranyl-PP, constituem fitoalexinas, hormônios, a cadeia lateral de

fitol das clorofilas, tocoferol e filoquinonas. Os triterpenos (C30) são sintetizados a partir de suas moléculas de farnesil-PP (C15) pela reação de condensação redutora. O esqualeno é o triterpeno precursor do esterol constituinte importante das membranas e sintetizado pela esqualeno sintase. Da mesma forma, a condensação cabeça-cabeça de duas moléculas de geranyl, geranyl-PP (C20) leva a formação de tetraterpenos (C40) tais como carotenóides (caroteno, licopeno) e xantofilas (luteína, xantinas). Os isoprenóides estão envolvidos na prenilação de proteínas (adição de moléculas hidrofóbicas às proteínas) levando a formação de diversos isoprenóides de cadeia longa que ancoram as proteínas nas membranas tais como proteína-G, ubiquinona, plastoquinona, citocromo-a (Vranová et al., 2012).

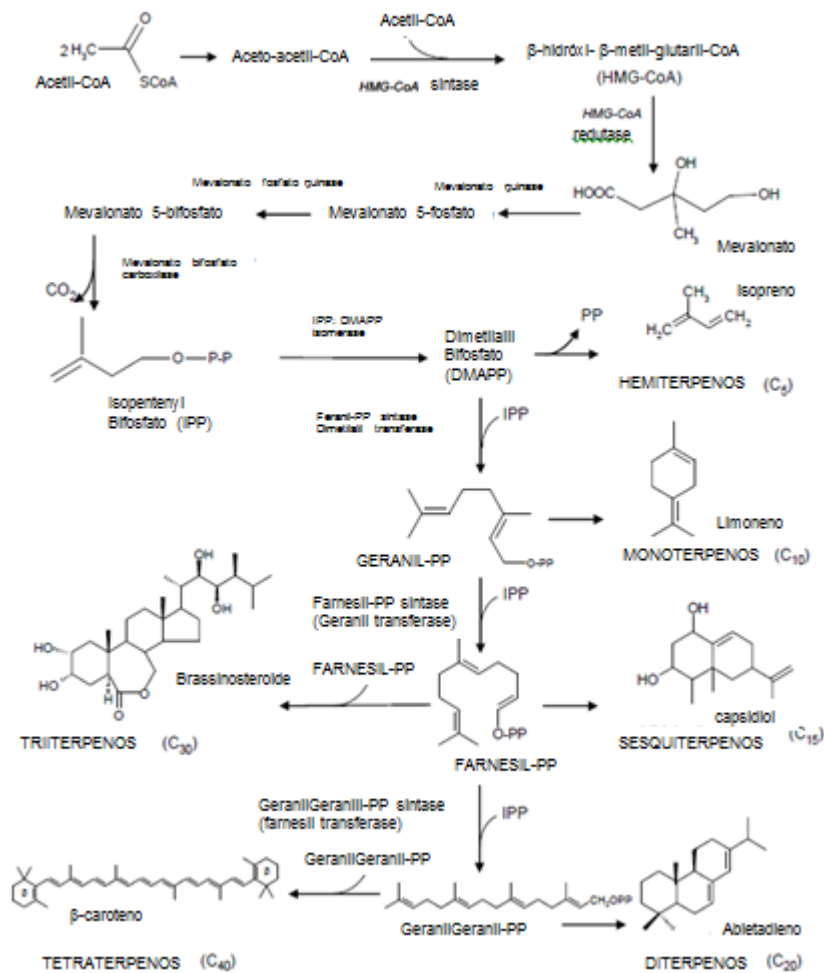


Figura 2. Representação simplificada da via dos isoprenóides (Adaptado de Iriti e Faoro, 2009).

Biossíntese dos alcalóides

Não existe uma via de síntese comum para os alcalóides. A maioria dos alcalóides é derivada dos aminoácidos e, portanto, são agrupados de acordo com a natureza química do aminoácido precursor. Assim, os principais alcalóides são derivados da ornitina, leucina, lisina, tirosina, triptofano, histidina e fenilalanina junto com os alcalóides originados dos ácidos nicotínico e antranílico, do acetado, isoprenóides e purina. Essas classes podem ainda incluir subdivisões como os alcalóides pirrólicos originados da leucina: pirrodilina, tropano e pirrolidizina; da ornitina: piperidina, quinolizidina, indolizidina; alcalóides derivados da lisina: catecolaminas, isoquinolinas, tetrahydroisoquinolina; alcalóides

originados da tirosina: indolaminas, indóis, carbolina, quinolina, pirrolindol e alcalóides ergotamínicos (*ergot alkaloids*) do triptofano e alcalóides imidazólicos da histidina. O ácido antranílico é o precursor da quinazolina, quinolina e acridina enquanto os alcalóides isoprenoicos incluem o mono geraniol e di (geranil, geranil-PP) e derivados de triterpenos (colesterol) (Robinson, 1974).

Biossíntese dos ácidos graxos

O acetato é o precursor da síntese de ácidos graxos (Rawsthorne, 2002). Estruturalmente a maioria dos lipídios contém três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e são conhecidos como triacilgliceróis. Os ácidos graxos apresentam diferentes tamanhos de cadeia de 4 a 36 átomos de carbono cadeias, estas podem ser saturadas ou insaturadas. Os ácidos graxos insaturados, por possuírem duplas ligações, são considerados quimicamente mais instáveis. Quando possuem apenas uma dupla ligação são denominados monoinsaturados; com duas ou mais duplas ligações, são chamados de poli-insaturados. Os átomos de carbono de número 2 e 3 adjacentes ao grupo carboxila são denominados de carbonos α e β , respectivamente, enquanto que o último carbono é o ω - ou n-carbono. A posição da dupla ligação é indicada pelo símbolo Δ , seguido por um número, por exemplo: $\Delta 9$ se refere à dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 numerados a partir do grupo carboxila (Moreira et al., 2002). De acordo com Rawsthorne (2002), a biossíntese de ácidos graxos tem início com a reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase que converte o acetil-CoA e CO_2 em malonil-CoA em uma reação dependente de ATP. O malonil-CoA é transferido para a proteína carreadora de grupos acil (ACP). A partir dessa etapa todas as reações subsequentes envolvem a via ACP até a produção de ácidos graxos de 16 ou 18 C que podem ser esterificados ou exportados. Após a transferência ao ACP o malonil-ACP participa de reação de condensação com o acetil-CoA resultando na formação de ligação C-C (incorporação de 2 em 2 átomos de C na cadeia) e liberação de CO_2 . Os ácidos graxos de cadeia longa (>16C) são sintetizados a partir do palmitato e a elongação da cadeia ocorre pela adição dos grupos acetila. A dessaturação pode ocorrer após a fase de elongação da cadeia.

A dupla ligação pode ser introduzida na cadeia pela reação oxidativa catalisada pela acil-ácido graxo dessaturase. Para a conversão dos ácidos graxos em triglicerídeos são necessários dois precursores: acil-ácidos graxos CoA e glicerol 3-fosfato. O primeiro passo é a acilação dos grupos hidroxila do glicerol 3-P por duas moléculas de acil ácido graxo CoA para formar diacilglicerol 3-P (fosfatidato), que é convertido a triacilglicerol pela hidrólise catalisada pela fosfatidato-fosfatase para formar 1,2-diacil glicerol que, por sua vez, é convertido a triacilglicerol via transesterificação com um terceiro grupo acil ácido graxo CoA (Schultz e Ohlrogge, 2001; Voelker e Kinney, 2001).

Tabela 1 – Nome comum de alguns dos ácidos graxos sintetizados pelas plantas e número de carbonos na cadeia.

Nome comum	Nº C
Láurico	12:0
Mirístico	14:0
Palmítico	16:0
Esteárico	18:0
Araquídico	20:0
Behênico	22:0
Lignocérico	24:0
Palmitoleico	16:1 Δ 9
Oleico	18:1 Δ 9
Linoleico	18:2 Δ 9,12
Linolérico	16:3 Δ 9,12,15
Erúcico	22:1 Δ 9

Na Figura 3 é mostrada a interligação em termos gerais do metabolismo primário com as principais vias do metabolismo secundário.

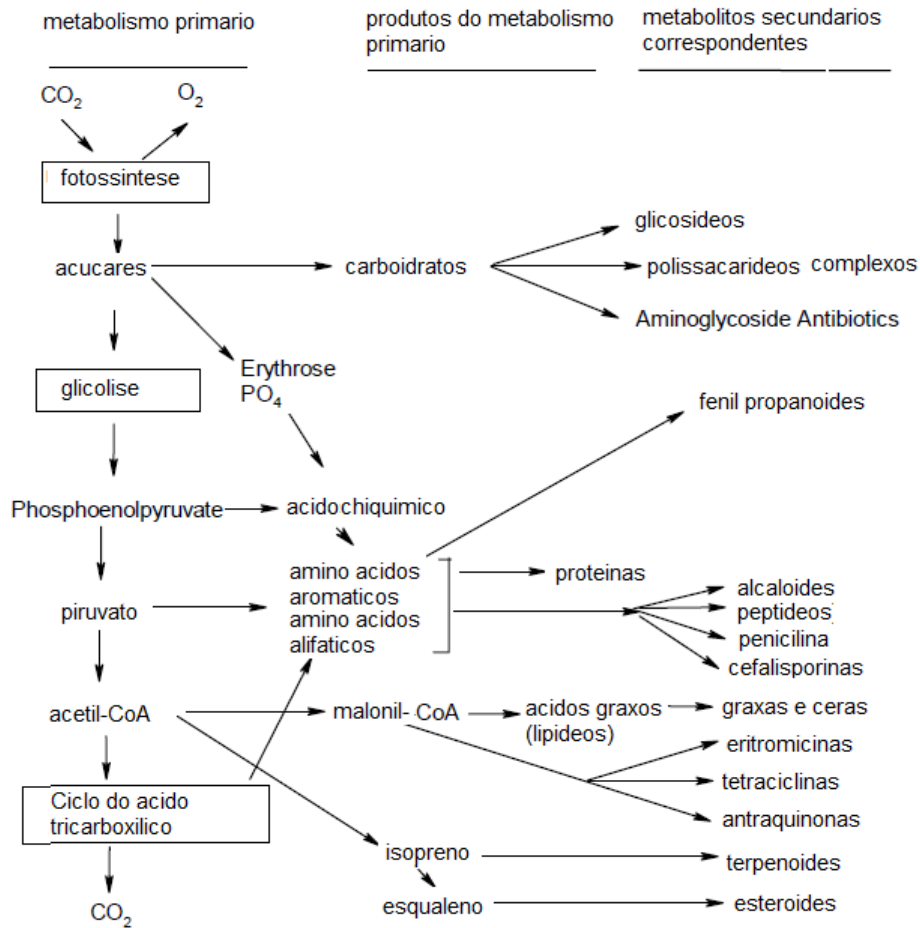


Figura 3. Integração entre o metabolismo primário e secundário das plantas.

2.3 Análise Metabolômica

Nas últimas décadas estudos e investimentos foram direcionados para o sequenciamento genético de diversos organismos a fim de se elucidar completamente o mecanismo de funcionamento celular em nível molecular. Entretanto, após anos de pesquisa percebeu-se que o sequenciamento genético por si só não era suficiente para entender toda maquinaria celular de um organismo. Por isso, na era pós-genômica, surgiu uma nova abordagem para o estudo do funcionamento celular chamada de “genômica funcional”, que tem como objetivo primordial determinar função para os diversos genes sequenciados. Essa nova abordagem se baseia no tripé genômica, proteômica e metabolômica (Villas-Bôas, 2006). O transcriptoma é reflexo da expressão dos genes e avalia o conjunto de transcritos de um organismo em uma determinada situação celular (como por exemplo, submetida ao tratamento com substâncias húmicas). A proteômica em combinação com dados genômicos possibilita identificar o total de proteínas expressas, bem como a expressão diferencial durante o crescimento e desenvolvimento de uma planta em resposta a estímulos bióticos e abióticos (Yang et al., 2005).

A metabolômica surgiu muito recentemente, devido ao fato de que as alterações nos níveis de RNAm nem sempre resultavam em alterações nos níveis de proteínas (Gygi et al., 1999), e uma vez traduzida, uma proteína podia estar ou não enzimaticamente ativa (Sumner et al., 2003). Assim, as alterações observadas no transcriptoma e no proteoma nem sempre correspondiam a modificações pós-traducional. Tal fato fez com que a metabolômica se destacasse como uma estratégia de estudo mais robusta para definir a atividade gênica quando comparada às abordagens transcriptômica e proteômica (Gygi et al., 1999).

O termo “metaboloma” foi citado pela primeira vez em 1998, no trabalho de Oliver et al. (1998) com base na analogia com termos genoma, proteoma e transcriptoma, que já eram conhecidos. Já Oliver Fiehn (2002) foi o primeiro a propor uma classificação das diversas abordagens analíticas disponíveis para a análise de metabólitos, dividindo-as em quatro grupos principais: (i) análise

direcionada; (ii) perfil metabólico; (iii) metabolômica e (iv) “fingerprinting” metabólico (Figura 4).

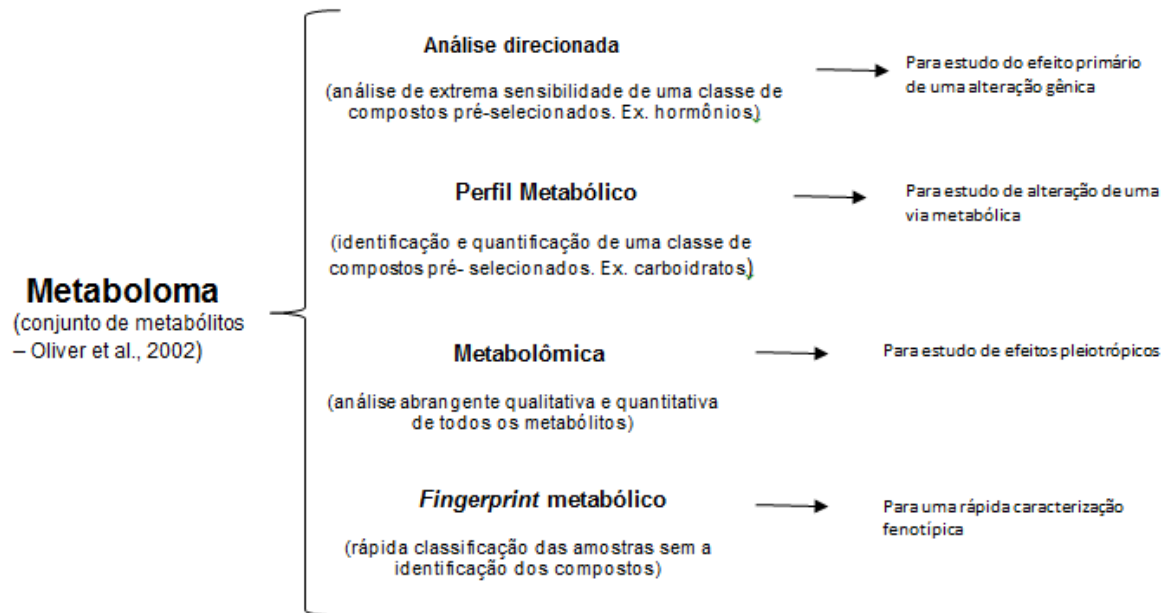


Figura 4: Classificação das abordagens analíticas para a área metabolômica de acordo com o proposto por Fiehn (2002). Adaptado de Villas-Boas (2006).

O perfil metabólico (qualitativo e quantitativo) reflete o processo celular que controla o fenótipo bioquímico da célula, do tecido ou do organismo como um todo. Esse *status* bioquímico pode ser utilizado para monitorar e acessar a função gênica (Fiehn et al., 2000). A complexidade biológica aliada à heterogeneidade metabólica das plantas representam os principais desafios no desenvolvimento de uma plataforma de análise metabolômica eficaz (Goodacre et al., 2004).

A possibilidade de monitorar alguns ou um grupo de metabólitos envolvidos nas respostas ao estresse pode aumentar significativamente o entendimento dos mecanismos de adaptação das plantas. A plataforma de análise metabolômica tem como objetivo a identificação e a quantificação de metabólitos intra e extracelulares de baixa massa molar (< 1000 Da) fazendo uso de diferentes

técnicas analíticas. As alterações observadas nas concentrações dos metabólitos permitem identificar rapidamente modificações em vias metabólicas específicas, facilitando a integração efetiva dos dados obtidos nas diferentes áreas da “genômica funcional”. A produção de metabólitos representa o produto final da expressão gênica e o reconhecimento de genes envolvidos nessas respostas representa um passo importante para os programas de melhoramento.

O sucesso dessa ferramenta de estudo se baseia em alguns princípios básicos como planejamento do design, controle local, extração dos metabólitos, escolha das técnicas analíticas, validação dos métodos de análise (precisão, acurácia e reprodutibilidade), processamento dos dados, análise estatística e interpretação dos resultados.

Preparação das amostras e extração

Para a análise metabolômica, a seleção e a preparação das amostras são de extrema importância (Maher et al., 2007). É necessário um rigoroso controle local, minimizando as demais fontes de variação. A interrupção instantânea do metabolismo é necessária, pois os níveis metabólicos variam rapidamente em função de quaisquer alterações no ambiente da célula (ex.: decréscimo ou aumento do nível de oxigênio dissolvido; variação na luminosidade, no caso de organismos fotossintetizantes; entre outros). O “quenching” metabólico é obtido através de uma alteração drástica de temperatura ou de pH. Existe uma grande variedade de metodologias descritas na literatura, sendo a amostragem em N₂ líquido (-196 °C) ou em solução de metanol frio (- 40 °C) as técnicas mais empregadas (Villas-Bôas et al. 2005). Outra opção é a liofilização do material, uma vez que na ausência de água, enzimas ou transportadores são incapazes de trabalhar.

A melhor condição de extração não é obtida pela simples triagem de solventes (Verpoorte *et al.*, 2007). Alguns parâmetros experimentais como massa de amostra, o volume de solvente e o tempo de extração também influenciam na eficiência da mesma. Geralmente a escolha dos parâmetros adequados é dispendiosa e não garante uma condição ótima (Song et al., 2007). Além disso, é

importante que haja reprodutibilidade dos experimentos (Defernez e Colquhoun, 2003).

Métodos de análise metabolômica

A complexidade química e a ampla heterogeneidade metabólica aliada às diferenças na eficiência de extração representam os principais desafios no desenvolvimento de uma plataforma de tecnologia metabolômica eficaz (Goodacre et al., 2004). Todas as técnicas atuais de extração e detecção, independente do seu nível de sofisticação, têm tendência intrínseca inevitável para determinados grupos de metabólitos (Hall et al., 2005). Logo, não existe uma plataforma analítica ideal para a análise metabolômica e é improvável que isso se defina em um futuro próximo. Diferentes metodologias têm vantagens distintas que podem ser exploradas para a investigação de diferentes classes de metabólitos. As informações resultantes são então colocadas em conjunto para obter uma melhor compreensão do metaboloma.

Atualmente as principais ferramentas analíticas utilizadas na detecção de metabólitos são a espectrometria de massas (EM) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A combinação da EM com métodos de separação cromatográfica (cromatografia líquida e gasosa) foi um dos avanços que ampliaram enormemente a capacidade analítica de amostras biológicas complexas. Além disso, o avanço nas tecnologias de detectores e fontes de ionização também foi essencial no sucesso das análises metabolômicas (Schauer e Fernie, 2006; Hall, 2006; Schripsema, 2010). O uso em conjunto de várias técnicas (chamadas genericamente de técnicas hifenadas) constitui o avanço dessa abordagem que permitirá o isolamento e a identificação de milhares de compostos presentes em uma amostra (Fiehn et al., 2001).

A Tabela 2 apresenta as principais técnicas analíticas utilizadas na análise metabolômica, suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2: Principais técnicas analíticas usadas na análise metabolômica.

Método Analítico	Vantagens	Desvantagens
RMN (Ressonância magnética nuclear)	<ul style="list-style-type: none">• Método rápido• Alta resolução• Não requer derivatização da amostra• Não destrutivo	<ul style="list-style-type: none">• Baixa sensibilidade• Complexidade dos espectros• Uso limitado de bibliotecas• Alto custo
CG/MS (Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas)	<ul style="list-style-type: none">• Sensível• Robusta• Grande faixa linear• Livrarias públicas	<ul style="list-style-type: none">• Análise demorada• Requer derivatização das amostras• Muitos compostos são instáveis termicamente
CL/MS (Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas)	<ul style="list-style-type: none">• Não requer derivatização da amostra (geralmente)• Muitos métodos de separação disponíveis• Grande capacidade de amostragem	<ul style="list-style-type: none">• Análise demorada• Limitadas livrarias comerciais
EC/EM (Eletroforese capilar com espectrômetro de massas)	<ul style="list-style-type: none">• Grande poder de separação• Requer pouca quantidade de amostra• Análise rápida• Não requer derivatização da amostra (geralmente)• Capacidade de analisar nêutrons, anions e cátions em uma mesma corrida	<ul style="list-style-type: none">• Limitadas bibliotecas comerciais• Baixa reprodutibilidade
IV-TF (Infravermelho com transformada de Fourier)	<ul style="list-style-type: none">• Análise rápida• Completo fingerprinting da composição química da amostra• Não requer derivatização da amostra	<ul style="list-style-type: none">• Espectros extremamente complicados• Requer amostra seca• Impossível identificação aproximada dos compostos

Adaptado de Shulaev (2006).

As técnicas de detecção baseadas na EM têm sua principal limitação centrada nos protocolos de separação e derivatização das amostras, bem como na capacidade de detecção. Propriedades físico-químicas das amostras como volatilidade e habilidade de ionização são limitantes para a detecção de metabólitos por EM. A RMN é de uso exclusivo para a obtenção de perfis metabólicos e não requer derivatização, extração prévia (permite estado sólido ou semissólido) permitindo a identificação de metabólitos ou grupos de metabólitos em curto espaço de tempo. A principal limitação é o nível de detecção, embora campos magnéticos cada vez mais potentes estejam sendo desenvolvidos permitindo detecção de ng L^{-1} , aumentando significativamente a sensibilidade de análise, porém com elevado custo.

Um aspecto importante na análise metabolômica e que constitui um problema a ser superado em função da diversidade de compostos obtidos em um único experimento tem origem no fato de que a identificação dos compostos é dependente da (i) qualidade da biblioteca eletrônica de espectros utilizados para comparação e identificação, (ii) das características espectrais dos compostos que por sua vez são dependentes da qualidade do extrato. Desta forma, a obtenção/padronização de extratos para análise metabolômica constitui um problema sério para comparação de resultados e básico para identificação correta dos metabólitos presentes (Gullberg et al., 2004; Fiehn et al., 2006).

O custo do instrumental e o elevado nível técnico da mão de obra também constituem um problema para a expansão da técnica. Outra dificuldade importante da metabolômica reside na análise dos dados. A aquisição automatizada de grandes quantidades de dados resulta em desafios exploratórios e interpretativos. A abundância de dados por si só não é uma garantia de obtenção de informações úteis sobre as principais alterações ocorridas no sistema. Com o advento de tecnologias computacionais, técnicas de análises multivariadas estão sendo amplamente utilizadas nas diversas áreas do conhecimento. A análise de componentes principais (Principal Component Analysis – PCA) é a mais utilizada dentre as diferentes técnicas multivariadas e permite a identificação das medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem perdas significativas de informações (Vicini, 2005). Além da

PCA, outras análises também têm sido muito utilizadas, tais como análise multivariada, regressão por componentes principais (Principal Component Regression - PCR), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (Discriminant Analysis-Partial Least Squares PLS-DA), SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy) e análise de agrupamento hierárquico (Cluster analysis). Dentre as análises citadas acima, a PCA é a mais utilizada.

A PCA é um tipo de análise exploratória que tem como objetivo encontrar similaridades entre amostras, reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados e detectar outliers (Souza e Poppi, 2012). A análise se dá através da combinação linear das variáveis originais que resulta em uma série de componentes principais ortogonais. As componentes principais são obtidas em ordem decrescente de variância, entretanto vale ressaltar que nem sempre a informação de maior variância representa a mais relevante para o problema em questão. Às vezes a informação de maior interesse pode estar contida nos demais componentes que representam pouco da variância total, como é típico para compostos minoritários (metabólitos secundários). Os loadings representam o peso ou importância das variáveis originais em cada CP.

Um passo importante na análise dos dados é o seu pré-tratamento a fim de remover possíveis variações indesejadas. As variações podem ser aleatórias, como por exemplo, ruídos experimentais, ou sistemáticos, como desvios da linha de base. Os métodos de pré-processamento mais comuns são: centrar os dados na média, autoescalonamento, alinhamento e correção de fase dos espectros, normalização dos dados, dentre outros (Eriksson et al., 2004; Berg et al., 2006).

2.4 Bioinoculantes à base de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas

A agricultura moderna mantém níveis elevados de produção à custa do uso intensivo de fertilizantes, água (irrigação), degradação dos solos e emissão de gases de efeito estufa. As consequências desse modelo de produção têm chamado a atenção para outras práticas de cultivo que preservem os solos e os recursos naturais e mantenham níveis elevados de produção. A busca por uma “agricultura de baixo carbono”, ou seja, de baixo uso de energia trouxe à tona alternativas de produção que até então eram pouco difundidas ou vistas apenas em pesquisas científicas. Alguns exemplos de insumos para estas alternativas ambientalmente corretas são os produtos à base de SH (Canellas e Olivares, 2014), vermicompostagem (Aguiar et al., 2013), carvão bioativo (*biochar*) (Monterumici et al., 2015), inoculantes para espécies leguminosas (*Bradirizobhium* da soja) e não leguminosas (*Herbaspirillum* e *Azospirillum*) e biofertilizantes à base de SH combinadas com BPCV (Canellas et al., 2013). Dentre os benefícios associados a essas práticas destacam-se os efeitos diretos sobre o crescimento vegetal tais como atividade do tipo-hormonal, disponibilização de nutrientes e proteção contra efeitos deletérios causados por estresses bióticos e abióticos. Efeitos secundários também são observados como melhoria da qualidade física, química e biológica do solo, economia no uso de fertilizantes químicos e água para irrigação e conservação de fontes de energia não renovável.

Entretanto, a transição do modelo convencional para o modelo de intensificação ecológica enfrenta alguns entraves como: (i) envolve esforços políticos no sentido de romper estruturas já consolidadas como, por exemplo, a influência da indústria do agronegócio, (ii) os cursos de agronomia não estão ainda preparados para qualificar profissionais para atuar nessa área, (iii) as respostas aos insumos biológicos dependem muito da interação planta-ambiente, ao contrário dos insumos químicos industrializados que têm ação direta e têm respostas mais fáceis de serem interpretadas e, portanto, são mais fáceis de recomendar.

O uso direto de SH solúveis diretamente sobre as plantas, ou no solo, como promotores de crescimento não é propriamente uma novidade, mas tem atraído a atenção de agricultores e empresários com a abertura de um mercado crescente para a comercialização de produtos à base de SH. No Brasil encontram-se disponíveis para comercialização aproximadamente vinte produtos à base de SH. Entretanto, a maioria desses produtos extrai SH de fontes não renováveis tais como as turfas ou importam de fontes fósseis como rochas ricas em carbono humificado (leonardita e lignita). Uma alternativa é a obtenção de matéria húmica a partir do produto da transformação de resíduos orgânicos pelos micro-organismos e minhocas, conhecido como vermicompostagem. O produto final é o húmus de minhoca naturalmente enriquecido com ácidos húmicos (AH) e com grande capacidade de promoção do crescimento vegetal, especialmente do sistema radicular (Canellas et al., 2002; Aguiar et al., 2013).

O uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal como insumo biológico também não é novidade. Trabalhos iniciados na Embrapa Agrobiologia pela doutora Johanna Döbereiner na década de 60 já evidenciavam o potencial de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* como promotoras do crescimento vegetal. Tais bactérias modificam a taxa de crescimento das raízes pela fixação biológica de N, produção de fitormônios, solubilização de fósforo e zinco e associação com micorrizas. Mas, o uso de bioinoculantes para não leguminosas ainda é incipiente frente ao tamanho do mercado brasileiro de milho, arroz, café, laranja, cana-de-açúcar, entre outras culturas não leguminosas. A Embrapa Agrobiologia desenvolveu um inoculante para milho utilizando a espécie *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR11417. A inoculação de sementes de milho, por ocasião do plantio, permitiu atingir a produtividade máxima com a metade da dose de N-fertilizante (40 kg N / ha) recomendada para a cultura. Estima-se que a aplicação de N-fertilizante represente 15% do custo de produção, logo uma redução de 50% na aplicação de N-fertilizante representa uma economia de 7,5% (Reis et al., 2009). Para a cultura da cana-de-açúcar a Embrapa Agrobiologia vem trabalhando com cinco bactérias (isoladas da própria cana), são elas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281), *Herbaspirillum*

seropedicae (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366).

O NUDIBA trabalha com a perspectiva do uso combinado de SH e BPCV. O primeiro trabalho publicado com o uso combinado de SH e BPCV foi realizado em microtoletes de cana-de-açúcar tratados termicamente (Marques-Júnior et al., 2008). O raquitismo é uma doença endêmica na região Norte Fluminense causado pela *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*. A desinfestação de toletes por meio térmico é uma prática comum e, em função da diminuição geral da carga microbiana causada pela alta temperatura, abre a oportunidade de reinserção de uma comunidade microbiana selecionada. A co-inoculação dos microtoletes com AH isolados de vermicomposto (50 mg C L^{-1}) em conjunto com uma suspensão de 10^8 células mL^{-1} de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 resultou em incrementos na área superficial da raiz da ordem de 250% em relação às plantas controle e de cerca de 100% no comprimento radicular. Esses resultados foram acompanhados no aumento da população de *H. seropedicae* no tecido das raízes entorno de cinco unidades log maiores que o controle e 1,5 unidade log a mais que a inoculação na ausência de SH. Os resultados foram interpretados como consequência do estímulo bem conhecido das SH sobre o crescimento radicular. As BPCV endofíticas utilizam as aberturas que naturalmente surgem com a emergência das raízes laterais para infecção e colonização da cana-de-açúcar (Olivares et al., 1996). A suspensão de SH adere a raiz rapidamente (Marques-Júnior, 2010) aumentando a rugosidade e a heterogeneidade da superfície favorecendo a ancoragem da bactéria (Frade et al., 2011), primeiro passo para o estabelecimento e crescimento do biofilme microbiano. Marques-Júnior (2010) utilizou a co-inoculação de SH e BPCV em plântulas de cana-de-açúcar oriundas da biofábrica (cultura de tecidos) e acompanhou o período de aclimação das mudas na casa de vegetação e a transferência das mesmas para campo experimental. Foi novamente observado o aumento na biomassa da parte aérea e da raiz além da área radicular nas plântulas co-inoculadas. Os resultados a campo indicaram aumento ao redor de 30% na massa de colmos colhidos sem prejuízo aos parâmetros industriais (pool e °Brix) resultando, portanto, no aumento

de 30% na produção de açúcar com uma única aplicação conjunta de SH e BPCV ainda na biofábrica.

O primeiro trabalho publicado com resultados da inoculação conjunta de SH e BPCV em milho foi realizado com o recobrimento das sementes resultando no aumento de massa fresca das raízes das plântulas e no número de BPCV (Conceição et al., 2008). Usado em suspensão líquida em meio hidropônico foi observado aumento da colonização de tecidos da raiz e parte aérea, porém sem efeitos sobre a atividade da enzima nitrogenase (Marques Júnior, 2010). O estudo do uso combinado de SH e BPCV aplicado em suspensão no substrato de crescimento na casa de vegetação e a pulverização a campo em milho no estágio fisiológico V6 foram realizados por Canellas et al. (2013). Em casa de vegetação com plântulas de milho de 45 dias após a germinação foi observado aumento significativo no crescimento radicular (massa e área) também acompanhado do aumento da colonização das raízes por *H. seropedicae*. Os autores observaram ainda estímulo na atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática de raízes e nas enzimas relacionadas à absorção de NO_3^- (nitrito redutase) e assimilação de NH_4^+ (glutamina sintetase). O aumento na atividade dessas enzimas foi acompanhado pela diminuição do teor de açúcares redutores solúveis nas folhas, indicando a mudança metabólica necessária para aceleração do crescimento celular, verificada pelo significativo aumento na taxa de fotossíntese líquida. A campo o uso isolado de SH e BCPC promoveu aumento na produção de grãos de 17 e 20%, respectivamente, enquanto que o uso combinado resultou em aumento na ordem de 65%. O experimento foi conduzido em um Latossolo Amarelo coeso típico distrófico, ou seja, de baixa fertilidade natural e com uso de 50 kg de ureia ha^{-1} na adubação de cobertura.

Os resultados de seis experimentos a campo com milho e uso combinado de SH e BPCV foram compilados por Canellas et al. (2015). Dois experimentos realizados consecutivamente nos anos agrícolas 2009/2010 e 2010/2011 avaliaram o uso combinado de SH e BPCV aplicado via foliar e diferentes níveis de adubação nitrogenada. O primeiro ano foi marcado pela seca e pelo elevado déficit hídrico durante quase todo período de crescimento da cultura. Em todos os níveis de N-ureia utilizados (0, 45, 90 e 180 kg N ureia ha^{-1}) a produção de grãos

foi significativamente maior com uso combinado de SH e BPCV em relação ao controle. No ano seguinte, com regime normal de chuvas, o aumento da produção com o uso combinado de SH e BPCV foi observado somente nas doses mais baixas de N-ureia (0, 19 e 37,5 kg N-ureia ha⁻¹). Foi possível observar que com o uso em conjunto de SH e BPCV e 50 kg de N-ureia foi obtida produção equivalente à maior concentração de ureia utilizada no experimento representado, portanto, economia significativa no uso de fertilizante nitrogenado assim como observado por Reis et al. (2009). As respostas das plantas as SH estão sempre condicionadas ao tipo de planta e à sua idade. Foi conduzido um experimento a campo com milho visando identificar o estágio fisiológico mais adequado para aplicação do uso combinado de SH e BPCV. Verificou-se que quanto mais tardia a aplicação, maior a produção de grãos. O estágio V8 foi o estágio fisiológico mais avançado utilizado no estudo. Também em milho o uso combinado de SH e BPCV foi utilizado a campo para avaliação de respostas de produção de biomassa foliar para produção de silagem em um Latossolo Amarelo da região de Apicá, sul do Espírito Santo. Foram utilizadas duas cultivares diferentes e a aplicação foi realizada uma única vez com ácidos húmicos na concentração de 50 mg C L⁻¹ e uma suspensão de *H. seropedicae* de 10⁸ células mL em volume equivalente a 450 L ha⁻¹. Em ambas as cultivares foi observado aumento na massa fresca da parte aérea entre 28 e 30% em relação ao controle não inoculado. Além disso, foi observado um aumento significativo na biomassa radicular de 160% e 245% em relação ao controle revelando uma importante fonte de entrada de carbono no solo. Finalmente, o uso combinado de SH e BPCV foi utilizado em milho plantado em um campo experimental com utilização prévia de doses elevadas de fertilizante químico e apresentando mais de 600 mg kg⁻¹ de fósforo disponível. Foi realizada também adubação química completa (NPK 4:14:8) na base conforme recomendação da cultura e adubação nitrogenada de cobertura em diferentes concentrações (0, 50, 100 e 150 kg N-ureia ha⁻¹). Nessas condições de alta fertilidade a co-inoculação, como esperado, não resultou em aumento de produção do milho em relação ao controle. No entanto, não foi observada a diminuição da produção na maior concentração de N-ureia utilizada tal como ocorrido no tratamento controle. Tomados em conjunto, os dados da

experimentação agrícola com milho permitiram indicar a co-inoculação de SH e BPCV como uma alternativa viável para aumento da produção especialmente em solos de baixa fertilidade natural e com baixo nível de utilização de fertilização nitrogenada.

A tecnologia de co-inoculação de SH com BPCV também foi avaliada na cultura do tomate utilizando-se duas estratégias. A primeira de fortificação do substrato de crescimento das mudas e a segunda com a aplicação via pulverização da suspensão nas folhas após o transplante para o campo experimental. Em ambas as fases (produção de mudas e campo experimental) foi observado aumento da produção de biomassa resultando em aumento significativo na produção de tomate (Olivares et al., 2015).

Atualmente, encontra-se em campo experimental instalado dentro de uma plantação comercial de cana-de-açúcar localizado na Fazenda Abadia, Campos dos Goytacazes-RJ, um experimento de longa duração visando avaliar a melhor forma (foliar ou no sulco de plantio) e época de aplicação além da necessidade ou não de re-inoculação na cana soca com SH e BPCV. Os resultados preliminares indicaram claramente a vantagem da aplicação foliar sobre a aplicação no sulco e aos 60 dias após a emergência como a melhor época de aplicação.

A cana-de-açúcar no Norte Fluminense tem uma característica muito peculiar que a distingue das principais zonas canavieiras do Brasil, especialmente São Paulo e Nordeste brasileiro. A região Norte Fluminense é caracterizada pela existência de uma rede de pequenos fornecedores de cana para as usinas com área média de plantio de 17 ha e rendimento médio de 48 Mg ha⁻¹, muito abaixo da média nacional, que é de 70 Mg ha⁻¹ (IBGE Censo Agropecuário, 2010; Conab safra 2014/2015). Para se tornar economicamente viável a atividade sucroalcooleira necessita de escala para modernização das práticas culturais. Entretanto, os pequenos fornecedores de cana-de-açúcar mantêm sua atividade como uma renda extra (arrendamento da área para a usina que se compromete com o plantio e colheita) e não como atividade econômica principal. Outro fato socialmente importante diz respeito às áreas de reforma agrária no Norte Fluminense que ocupam, na sua maior parte, antigas fazendas de cana-de-açúcar. A utilização dos lotes para o plantio de cana é quase um alinhamento

forçado à cadeia sucroalcooleira em virtude da facilidade de se submeter à usina e a falta de apoio para outro tipo de produção. Nesse contexto, a cultura da cana-de-açúcar assume um papel importante na região. As principais limitações da produção de cana-de-açúcar dos pequenos fornecedores são a falta de adubação em níveis adequados e o déficit hídrico (seca) comum na região que apresenta precipitação média anual ao redor de 1000 mm.

Finalmente, alguns trabalhos sobre metabolismo secundário em cana-de-açúcar revelaram, como em toda poácea, a importância da rota do ácido chiquímico e a acumulação de compostos fenólicos (França et al., 2001; Wahid e Ghazanfar, 2006). França e colaboradores (2001) verificaram uma alteração significativa na expressão de genes associados à atividade da enzima chalcona sintase em cana-de-açúcar infectada por *Herbaspirillum rubri* or *Gluconacetobacter diazotrophicans*, indicando que possíveis modificações na biossíntese de flavonóides podem estar associadas a respostas metabólicas da planta aos inoculantes. Já Wahid e Ghazanfar (2006) observaram acúmulo de antocianinas (outro derivado de compostos fenólicos) induzido pelo estresse osmótico na cana-de-açúcar.

O estudo das principais alterações metabólicas decorrentes da interação planta-biofertilizante pode ser a chave para um melhor entendimento da ação desse produto sobre a cana-de-açúcar, além de direcionar o melhoramento das plantas em resposta aos biofertilizantes. O objetivo do trabalho foi (i) identificar os compostos do metabolismo primário e secundário envolvidos nas respostas de cana-de-açúcar em função da aplicação de SH e BPCV e (ii) avaliar o perfil metabólico e a atividade de enzimas antioxidantes durante a recuperação do estresse hídrico em cana-de-açúcar tratada com AH e BPCV. O trabalho é sustentado pela hipótese de que as SH e BPCV alteram o metabolismo vegetal e que a análise metabolômica é uma ferramenta capaz de identificar as principais vias metabólicas alteradas em função da aplicação do biofertilizante.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar NO, Olivares FL, Novotny EH, Dobbss LB, Martizez-Balmori D, Santos-Júnior LG, Chagas JG, Façanha, AR, Canellas LP. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant and Soil* 362: 161-174, 2013.
- Assis JS, Maldonado R, Muñoz T, Escribano MI, Merodio C. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 23: 33-39, 2001.
- Baldani JI, Reis VM, Teixeira KRS, Baldani VLD, Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. *Biociencia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: EDUCS, 195-232, 2002.
- Berg R, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, Werf M.J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7: 142, 2006.
- Canellas LP, Martínez Balmori D, Médici LO, Aguiar NO, Campostrini E, Rosa RC, Façanha A, Olivares FL. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil* 366: 119-132, 2013.
- Canellas LP, Martínez-Balmori D, Médici LO, Aguiar NO, Campostrini E, Rosa RC, Façanha A, Olivares FL. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil* 366: 119-132, 2013.
- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL, Façanha AR. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root

- emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130: 1951-1957, 2002.
- Canellas LP, Olivares FL. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1: 1–11, 2014.
- Canellas LP, Silva SF, Olk D, Olivares FL. Foliar application of *Herbaspirillum seropedicae* and humic acid increase maize yields. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 13: 146-153, 2015.
- Chakraborty U, Dutta S, Chakraborty B. Drought induced biochemical changes in young tea leaves. *Indian Journal of Plant Physiology*, 6: 103-106, 2001.
- Conceição PM, Vieira HD, Canellas LP, Marques Júnior RB, Olivares FL, Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 545-548, 2008.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2014) Acompanhamento da Safra Brasileira. Cana-de-açúcar, Quarto levantamento, safra 2013/2014. Brasília, abr. 2014. 19 p.
- Crawford NM, Glass AD. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3: 389-395, 1998.
- Defernez M, Colquhoun I.J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ¹H NMR spectra. *Phytochemistry* 62: 1009–1017. 2003.
- Döbereiner, J., Pedrosa, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. *Science Tech*, Madison, USA, 155p,1987.
- Eriksson L, Antti H, Gottfries J, Holmes E, Johansson E, Fredrik L, Long I, Torbjon L, Trygg J, Wold S. Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabonomics (gpm). *Analytical Bioanalytical Chemistry* 380: 419–429, 2004.

- Fell D. (1997) Understanding the Control of Metabolism. Portland, London.
- Fiehn O, Kloska S, Altmann T. Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 82-86, 2001.
- Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 18: 1157–1161, 2000.
- Fiehn, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48: 155–171, 2002.
- Fiehn, O., Kristal, B., Ommen, B. V., Sumner, L. W., Sansone, S. A., Taylor, C., & Kaddurah-Daouk, R.. Establishing reporting standards for metabolomic and metabonomic studies: a call for participation. *Omics: a journal of integrative biology*, 10(2), 158-163, 2006.
- Forde BG. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465: 219-235, 2000.
- Forquímica agrociência Ltda. (2015) Disponível em <www.forquimica.com.br> Acesso em 15 de julho de 2015.
- Frade DA R; Canellas LP, Olivares FL. Anatomia e ultraestrutura de plantas inoculadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal na presença de ácidos húmicos. In: IX Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2011, Aracajú-SE. (resumo expandido)
- França SC, Roberto PG, Marins MA, Puga RD, Rodrigues A., Pereira JO. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology*, 24: 243-250, 2001.
- Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15: 8813-8826, 2010;

- Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnology*, 22: 245–252, 2004.
- Gottlieb OR, Kaplan MAC, Borin MR de MB. Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico, Editora UFRJ: Rio de Janeiro. 267p. 1996.
- Gottlieb OR. Plant phenolics as expression of biological diversity. In *Plant Polyphenols: Synthesis, Chemical Properties, Significance*. Hemingway RW, Laks PE, Branham SJ (Eds) Plenum Press, New York, pp. 523-538, 1992.
- Gullberg J, Jonsson A, Sjöström M, Moritz T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 331: 283-295, 2004.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular Cellular Biology*, 19: 1720-1730, 1999.
- Hadacek F. Constitutive secondary plant metabolites and soil fungi: defense against or facilitation of diversity. In: P. Karlovsky (ed.), *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. *Soil Biology* 14. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 207-239, 2008.
- Hall RD. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist* 169: 453–468, 2006.
- Hartley S, Jones CG, Couper GC, Jones TH. et al. Biosynthesis of plant phenolics compounds in elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology*, 6: pA97 497 -506, 2000.
- Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 50: 473-503, 1999.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2010) Censo Agropecuário 2010: Agricultura familiar. Rio de Janeiro.

- Iriti M, Faoro F. Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *International Journal Molecular Science* 10: 3371-3399, 2009.
- Janas KM, Cvikrová M, Pałagiewicz A, Eder J. Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 587-593, 2000.
- Lavola A, Titto RJ, Rosa TM, Lehto T, Aphalo PJ.de la et al. Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. *Physiologia Plantarum*, 109: 260-7, 2000.
- McManus MT. e Plaxton WC. (Eds.) *Control of primary metabolism in plants*. Blackwell Pub., 2006.
- Maher AD, Zirah SFM, Holmes E, Nicholson JK. Experimental and analytical variation in human urine in ¹H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies. *Analytical Chemistry*, 79: 5204–5211, 2007.
- Marques Júnior RB, Canellas LP, Silva LG, Olivares FL. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32: 1121-1128, 2008.
- Marques-Júnior (2010) *Uso de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas na produção de milho e cana-de-açúcar Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2010. 94p.*
- Monterumici CM, Rosso D, Montoneri E, Ginepro M, Baglieri A, Novotny EH, Negre M. Processed vs. non-processed biowastes for agriculture: effects of post-harvest tomato plants and biochar on radish growth, chlorophyll content and protein production. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 8826-8843, 2015.

- Moreira NX, Curi R, Mancini Filho J. Fatty acids: a review. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Nutrição (Journal of Brazilian Society Food Nutrition)* 24:105-123, 2002.
- Nardi S, Carletti P, Pizzeghello D, Muscolo A. Biological activities of humic substances. In: Senesi N, Xing B, Huang PM (ed) *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. Vol 2, part 1: fundamentals and impact of mineral-organic biota interactions on the formation, transformation, turnover, and storage of natural nonliving organic matter (NOM)*. Wiley, Hoboken, pp 305-340, 2009.
- Novotny EH, Maia, CMBDF, Carvalho MTDM, Madari BE. Biochar: pyrogenic carbon for agricultural use - a critical review. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 39: 321-344, 2015.
- Nunes-Nesi A, Fernie AR, Stitt M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant*, 3: 973-996, 2010.
- Olivares FL . Bactérias promotoras de crescimento vegetal. *Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG*, p. 33 - 34, 20 jul. 2009.
- Olivares FL, Aguiar NO, Rosa RCC, Canellas LP. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scitia Horticulture*. 183, 100-108, 2015.
- Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Döbereiner J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biology Fertility of Soils*, 21: 197-200, 1996.
- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz R. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16: 373–378, 1998.

- Owen D, Williams AP, Griffith GW, Withers PJA. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86: 41–54, 2015.
- Ramakrishna A, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signalling Behaviour*, 6: 1720-1731, 2011.
- Rawsthorne S. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research*, 41: 182–196, 2002.
- Reis VM, Alves GC, Marriel IE, Reis Júnior FB, Zilli JE. Recomendação de inoculante para a cultura de milho utilizando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR 11417. Embrapa Agrobiologia Comunicado Técnico nº 119, 1-3, 2009.
- Rivero RM, Ruiz JM, Garcia PC, López-Lefebre LR, Sánchez E, Romero L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160: 315-321, 2001.
- Robinson, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science*, 184(4135), 430-435, 1974.
- Rose MT, Patti AF, Little, KR, Brown AL. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in Agronomy*, 124: 37-89, 2014.
- Saltveit ME. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biology and Technology*, 21: 61-69, 2000.
- Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Peres-Melis A, Bruedigam C, Kopka J, Willmitzer L, Zamir D, Fernie AR. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology*, 24: 447–454, 2006.

- Schripsema J. Application of NMR in plant metabolomics: Techniques, problems and prospects. *Phytochemistry Analytical*, 21: 14-21, 2010.
- Seigler DS. *Plant Secondary Metabolism*. Boston MA: Chapman and Hall Kluwer Academic Publishers, 1998, 711p.
- Shulaev V. Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, 7: 128-139. 2006.
- Solecka D, Boudet AM, Kacperska A. Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low temperature treated winter oilseed rape leaves. *Plant Physiology Biochemistry*, 37: 491-496, 1999.
- Solecka D, Kacperska A. Phenylalanine ammonia-lyase in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry*, 33: 585-591, 1995.
- Song J, Liu C, Li D, Jin B. Optimization of cordycepin extraction from cultured *Cordyceps militaris* by HPLC-DAD coupled with uniform design. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 1122-1126, 2007.
- Souza AM, Poppi RJ. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, Parte I. *Química Nova*, 35: 223-229, 2012.
- Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62: 817-836, 2003.
- Schultz DJ., e Ohlrogge, J. B. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis. In: "Lipid Biotechnology," in press, 2001.
- Steward FC, Street HE. The nitrogenous constituents of plants. *Annual review of biochemistry*, 16(1), 471-502, 1947.

- Taiz L, Zaigler E. *Plant Physiology* 4th edition. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, 690p. 2006.
- Tischner R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell & Environment*, 23: 1005-1024, 2000.
- Tittonell P., Ecological intensification of agriculture - sustainable by nature. *Current Opinion Environmental Sustainability* 8: 53-61, 2014.
- Vaccaro S, Ertani A, Nebbioso A, Muscolo A, Quaggiotti S, Piccolo A, Nardi S. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. *Chemical Biological Technologies in Agriculture*, 2: 5, 2015
- Verpoorte, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov. Today* 3, 232–238, 1998.
- Verpoorte, R. Secondary metabolism. In *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism* (Verpoorte, R. and Alfermann, A.W. eds), pp. 1–29, Kluwer Academic Publishers, 2000.
- Verpoorte R, Choi YH, Kim HK. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews*, 6: 3-14, 2007.
- Vicini L. *Análise multivariada da teoria à prática*. Santa Maria: UFSM, CCNE, p.215. 2005.
- Villas-Bôas SG, Hojer-Pedersen J, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast*, 2: 1155–1169, 2005.
- Villas-Bôas, SG, Gombert, AK. *Análise do Metaboloma*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento (Online)*, 36: 58-69, 2006.
- Vogt, Thomas. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3, p. 2-20, 2010.

- Voelker, T. A., and Kinney, A. J. (2001). Variations in the biosynthesis of seed storage lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*52, 335–361.
- Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol Plant*, 5(2), 318-333, 2012.
- Wahid A, Ghazanfar A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *Journal of Plant Physiology*, 163: 723-730, 2006.
- Yang GX, Inoue A, Takasald H, Kaku H, Akao S, Komatsu SA. proteomic approach to analyze auxin- and zinc-responsive protein in rice. *Journal of Proteome Research*, 4: 456–463, 2005.

CAPÍTULO 1

PERFIL METABÓLICO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADA COM ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS.

RESUMO

As respostas da inoculação de plantas no campo são dependentes de vários fatores e entendê-las constitui um desafio importante para aumentar a eficiência do uso dos inoculantes e diminuir os impactos dos fertilizantes no ambiente. Nesse trabalho são apresentadas as principais mudanças metabólicas em folhas de cana-de-açúcar promovidas pela inoculação com a mistura de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* em combinação ou não com AH isolados de vermicomposto. A inoculação foi realizada no solo em plantas com 45 dias após a emergência. Uma semana após a inoculação as folhas foram amostradas e o extrato metanólico analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas com analisador por tempo de voo (CG-TOF-MS). Foi possível identificar mudanças significativas na glicólise e na via da pentose fosfato com acumulação significativa de heptoses e riboses nas plantas inoculadas providenciando substrato para o aumento da síntese de nucleotídeos e da via do ácido chiquímico. A via do mevalonato também foi estimulada pelos tratamentos aumentando a síntese de diversos fitoesteróis. O aumento do metabolismo celular também foi evidenciado pelo aumento na concentração de vitaminas (hidro e lipossolúveis) que atuam como co-fatores enzimáticos. A rota do glucuronato e de amino açúcares foi estimulada bem como

as reações e produtos do ciclo do ácido tricarboxílico. Consequentemente, a síntese de lipídios e aminoácidos foi estimulada. O metabolismo dos aminoácidos sofreu mudanças significativas com a inoculação. O uso de ácidos húmicos sem as bactérias promotoras de crescimento diminuiu a quantidade de compostos em nível elevado de concentração em comparação com o controle. Foi possível identificar um número grande de compostos com concentração elevada e que atuam na regulação do *status* redox da célula, na proteção antioxidante, osmoregulação e na resposta geral a diferentes estresses bióticos e abióticos. A análise multivariada permitiu agrupar os tratamentos de acordo com as vias metabólicas alteradas e, portanto, indicar compostos chave induzidos pelos tratamentos.

ABSTRACT

The field response to plant inoculation is often dependent of several factors and it is an important issue to increase their use and reduce fertilizers environmental constrains. Here we report the results of metabolic changes in sugarcane leaves induced by the mixture of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* together or not with humic acids isolated from vermicompost. The inoculum was applied in soil in 45-day olds plants and one week after the methanolic extracts from leaves were obtained and analyzed by GC-TOF MS. It was possible to identify significative changes on glycolysis and pentose pathways with accumulation of heptuloses and riboses in inoculate plants providing substrate to boost nucleosides synthesis and enhance the shikimic acid pathways. The mevalonate a pathway was also activated increasing phytosterols synthesis. The cell metabolism improvement due treatments were compatible with high levels of water and lipids soluble vitamins that act as coenzimatic factors. The rote of glucoronate and amino sugars were stimulated as well as the products and intermediary compounds of tricarboxylic acid metabolism. Thereby, the lipids and amino acids synthesis were induced by co-inoculation. The amino acid metabolism was mightily changed by inoculation and HA applied alone reduce the amount of metabolic products founded in higher concentration in respect to control. It was possible to identify a number of compounds in high levels induced by treatments related to cell redox status, antioxidant and plethoric response against biotic and abiotic stress. The multivariate analysis allows to discriminate the treatments according to the metabolic pathway and hence key-compounds were indicate.

1.INTRODUÇÃO

A agricultura precisa de alternativas para aumentar a sua sustentabilidade sem diminuir a produção (Rosenzweig et al., 2013). Embora seja um consenso emergente, não é uma questão simples devido ao modelo tecnológico adotado e a dependência dos insumos industrializados. O uso de etanol contribui significativamente para diminuição da emissão de chumbo e gases de efeito estufa em relação à gasolina. No entanto, a monocultura associada às práticas intensivas de cultivo leva à degradação, à contaminação do solo e recursos hídricos, além de gerar problemas sociais como concentração de terras e trabalho precário (Goldemberg et al., 2008).

Introduzida no período colonial, a cana-de-açúcar é, ainda hoje, uma das culturas agrícolas mais importantes, uma vez que o Brasil é o maior produtor mundial de álcool e açúcar. A área de cana-de-açúcar plantada no Brasil é de cerca de nove milhões de hectares com produtividade média de 74 Mg ha⁻¹ (Conab, 2014). A expansão da cultura está sendo limitada, entre outros fatores, pelo aumento nos custos de produção. Os fertilizantes, depois da mão de obra, constituem em um dos principais componentes dos custos de produção. Como são cotados em dólar e a cana-de-açúcar é vendida em reais verifica-se uma forte tendência de diminuição no uso dos fertilizantes, abandono dos canaviais e fechamento das usinas (Toledo, 2015).

O aumento da biodiversidade, o manejo eficiente dos nutrientes, a conservação do solo e da água constituem algumas práticas do modelo de intensificação ecológica (Titonell, 2014). Tal modelo visa à gestão otimizada das funções ecológicas da natureza e da biodiversidade para melhorar o desempenho e a eficiência do sistema agrícola e, portanto, o meio de subsistência dos agricultores. Sistemas agroecológicos equilibrados constituem o ápice da intensificação ecológica da produção. Os processos biotecnológicos podem ser úteis na transição do modo de produção e na economia do uso dos fertilizantes.

Foi proposto anteriormente o conceito de um novo biofertilizante baseado no uso em conjunto de substâncias húmicas e bactérias promotoras do crescimento

vegetal. Esse insumo pode ser uma alternativa de baixo custo e ambientalmente amigável para aumentar a eficiência do uso de nutrientes (Canellas et al., 2013).

As substâncias húmicas (SH) são o principal constituinte da matéria orgânica do solo, águas e sedimentos e podem influenciar diretamente a fisiologia e o metabolismo das plantas. Quando em solução, podem ser consideradas como uma mistura complexa contendo milhares de moléculas individuais em arranjo supramolecular variando na estrutura, funcionalidade e reatividade (Nebbioso e Piccolo, 2014). As SH podem alterar a expressão de genes envolvidos no metabolismo primário e, portanto, o crescimento e desenvolvimento das plantas (Trevisan et al., 2011). Também foram observadas alterações na atividade de enzimas associadas à glicólise, ao ciclo de Krebs e à assimilação de nitrogênio (Nardi et al., 2009). Mudanças na expressão de proteínas relacionadas com a via glicolítica e o metabolismo de sacarose foram observadas em plantas de milho tratadas com SH (Carletti et al., 2008). Além da ação sobre o metabolismo primário também foi verificada a influência das SH sobre o metabolismo secundário de plantas. Schiavon et al. (2010) demonstraram que as SH aumentaram a expressão da enzima fenilalanina amônia liase, enzima chave do metabolismo dos fenilpropanoides. Conseqüentemente, também foi observado aumento na concentração de compostos fenólicos nos tecidos das plantas tratadas com AH.

As bactérias diazotróficas endofíticas são consideradas uma das mais eficientes bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) usadas como inoculantes em plantas não leguminosas (Olivares, 2009). Os mecanismos pelos quais as BPCV estimulam o crescimento incluem, além da fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de nutrientes, a produção de substâncias análogas aos hormônios vegetais e a atuação em processos de controle biológico (Owen et al., 2009). A *Gluconacetobacter diazotrophicus* e a *Herbaspirillum seropedicae* foram selecionadas em laboratório e apresentam potencial para serem utilizadas na inoculação de plantas não leguminosas, pois são inespecíficas e capazes de colonizar uma diversidade ampla de plantas (cana-de-açúcar, café, batata doce, arroz, sorgo, trigo, abacaxi, milho, banana (James et al., 2012; Reis et al., 2015).

O processo de infecção nas raízes de cana-de-açúcar pelas BPCV começa com a atração da bactéria seguida da ancoragem na superfície da raiz e a subsequente entrada para o interior realizada pelas aberturas naturais causadas pela emergência da raiz lateral ou lesões decorrentes do atrito raiz-solo (James e Olivares, 1998). Como o principal efeito das SH nas plantas é o estímulo no crescimento das raízes, é possível que a combinação de SH com BPCV possa favorecer a colonização e aumentar os efeitos benéficos da FBN. De fato, já foram observados efeitos significativos da combinação de SH com BPCV sobre a colonização das raízes de milho (Canellas et al., 2013), na atividade de algumas enzimas do metabolismo primário e secundário (Canellas e Olivares, 2014) e sobre a produção de tomate e milho (Canellas et al., 2015; Olivares et al., 2015). No entanto, o estudo detalhado das mudanças metabólicas em plantas tratadas com SH e BPCV ainda não foi realizado.

A metabolômica é uma plataforma de estudo multidisciplinar utilizada para a análise de metabólitos com aplicação em diversas áreas do conhecimento (plantas, patologias humanas, composição de alimentos, microbiologia, entre outras). Os metabólitos são os produtos finais do processo regulatório da célula e seus níveis podem ser considerados como a última resposta do sistema biológico a fatores genéticos ou mudanças ambientais (Fiehn, 2002). A identificação das alterações ocorridas no perfil metabólico pode indicar o caminho para melhorar as respostas aos insumos biológicos.

O primeiro trabalho relacionando compostos do metabolismo de cana-de-açúcar com mudanças na partição do carbono durante a fase de maturação foi realizado por Whittaker e Botha (1997). Os autores observaram decréscimo de intermediários do ciclo glicolítico e aumento da partição do carbono no *pool* de sacarose com a maturação. O perfil metabólico obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) revelou a presença de 55 metabólitos definidos quimicamente por similaridade com o padrão da biblioteca *Nist* (Glassop et al., 2007). A maior parte dos metabólitos encontrados era intermediária do ciclo de Krebs e aminoácidos. Foi observado o aumento da concentração significativa de tetralose e rafinose. Além disso, trabalhos relacionando o metabolismo secundário de cana-de-açúcar são ainda mais raros.

França et al. (2001) verificaram aumento significativo da expressão da chalcona sintase em cana-de-açúcar inoculada com *Herbaspirillum rubri* ou *Gluconacetobacter diazotrophicans*. Esta enzima está associada à síntese de flavonóides em resposta a estresses bióticos e abióticos (van Etten et al., 1989).

A análise do perfil de metabolitos em cana-de-açúcar tem como ponto central a acumulação de sacarose. No entanto, o perfil geral dos compostos pode ser usado para explorar o efeito de estresses bióticos e abióticos sobre as plantas, inclusive os efeitos dos biofertilizantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar as possíveis alterações no perfil metabólico de cana-de-açúcar tratadas com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. Para tanto, os extratos foliares foram submetidos à análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os resultados foram analisados por métodos multivariados e as diferenças encontradas foram discutidas em relação ao tratamento controle.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração de AH

Os AH foram extraídos de vermicomposto produzido a partir da torta de filtro (rendimento de 18%), um resíduo da usina de cana-de-açúcar. A extração foi realizada com NaOH 0,1 mol L⁻¹, na razão 1:10 (v:v) de vermicomposto:solvente em atmosfera inerte de N₂. O procedimento de extração foi repetido até a obtenção de um sobrenadante incolor. O extrato alcalino solúvel foi centrifugado a 5000 g por 15 minutos. Após a reunião dos sobrenadantes foi realizada a acidificação até pH 2,0 com HCl 6 mol L⁻¹. O extrato foi mantido em geladeira a 8°C por cerca de 12 horas (*overnight*). Os AH precipitados foram separados por centrifugação. A purificação foi realizada pelo tratamento com a mistura (1:10, v/v) de HF (0,3 mol L⁻¹) e HCl (0,1 mol L⁻¹). Em seguida os AH foram centrifugados a 4000 g por 15 minutos e lavados repetidamente com água até teste negativo DE cloreto contra AgNO₃. O material húmico foi acondicionado em membrana de diálise (1000 Da) e imerso em água destilada. A água da diálise foi trocada três vezes por dia até a estabilização da condutividade elétrica. Em seguida, os AH foram liofilizados, homogeneizados e conservados em frascos de vidro dentro do dissecador.

2.2 Obtenção dos micro-organismos

As bactérias *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5 foram isoladas de cana-de-açúcar (Olivares et al., 1996). Elas foram crescidas separadamente em 5 mL de meio líquido Dygs a 30°C durante 36 horas. Composição do meio Dygs: 2,0 g glicose L⁻¹; 2,0 g ácido málico L⁻¹; 1,5 g peptona L⁻¹; 2,0 g extrato de levedura L⁻¹; 0,5 g MgSO₄·7H₂O L⁻¹; 1,5 g ácido glutâmico-L L⁻¹; pH 6,0. Uma alíquota de 20 µL de cada espécie de bactéria foi inoculada em 200 mL de meio Dygs nas mesmas condições de crescimento e

colocadas para crescimento em *shaker* durante 48 horas com 140 rpm. Em seguida, a biomassa bacteriana foi centrifugada a 2000 g por 10 minutos, ressuspensa em 10 mL de água ultrapura e a concentração ajustada a 10^9 células mL⁻¹ com leitura da absorbância em 496 nm. O inoculante foi preparado com a mistura de volumes iguais da suspensão de *H. seropedicae* e *G. diazotrophicus*.

2.3 Condições de crescimento da cana-de-açúcar

O tratamento térmico (água a 50°C por 2h) dos colmos da cultivar RB 96 7515 foi aplicado como método preventivo à doença raquitismo-da-soqueira (Fernandes Júnior et al., 2010). Dois colmos foram plantados em cada vaso (9 kg) e cultivados em casa de vegetação no campus experimental da UENF.

A camada superficial (0-20 cm) de um Cambissolo foi coletada em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. O solo foi seco ao ar e peneirado (2 mm) antes da análise de rotina realizada em laboratório independente (UFRRJ, Campus Leonel Miranda) de acordo com a metodologia recomendada pela Embrapa (1997). Após análise de solo foi feita a aplicação do equivalente a 80 kg ha⁻¹ de P₂O₅ (fosfato de potássio dibásico), 30 kg ha⁻¹ de K₂O (cloreto de potássio PA) e 2000 kg ha⁻¹ de carbonato de cálcio (PA). Os reagentes foram fornecidos pela Vetec. O delineamento utilizado foi de blocos casualizados, com quatro tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram de: suspensão de células bacterianas (10^8 células mL⁻¹), AH na concentração de 50 mg C L⁻¹ (previamente determinada), a combinação de AH e bactérias e o controle (água). Os tratamentos foram aplicados nos vasos (400 mL por vaso) 45 dias após a germinação das gemas. A umidade do solo foi mantida na capacidade de campo e sete dias após a aplicação dos tratamentos as plantas foram coletadas para análise do perfil metabólico.

2.4 Obtenção dos extratos

A interrupção rápida do metabolismo celular (*quenching*) foi feita com N₂ líquido a -196°C. As folhas foram maceradas com N₂ líquido em almofariz de ágata e pistilo. Para extração dos metabólitos foi utilizado 50 mg de folha moída e homogeneizada e 50 mL da mistura dos solventes metanol:água na proporção 80:20 v/v. A extração foi realizada no extrator acelerado (ASE-350 DIONEX) que operou com baixa temperatura e pressão elevada. Os extratos foram secos em um concentrador a vácuo e armazenado em eppendorfs no freezer a -80°C.

Os extratos foram analisados na Universidade de Davis – Califórnia no laboratório do prof. Oliver Fiehn localizado no Genome Center durante o estágio de doutorado sanduiche.

2.5 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas com analisador por tempo de voo (do inglês *gas chromatography time-of-flight mass spectrometry GC-TOF-MS*)

Em um *eppendorf* contendo 1 mg de extrato foi adicionado 10 µL do reagente MeOX, preparado a partir de 40 mg de hidrocloreto de metoxiamina e 1 mL de piridina. As amostras ficaram sob agitação por uma hora e meia a 30° C. Em seguida foi adicionado 91 µL do agente silanizante MSTFA (N- trimetilsilil-trifluoroacetamida) misturado com ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) como padrões internos (Apêndice 2). As amostras ficaram no agitador a 37° C por 30 minutos. Ao final, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante transferido para os vials e submetidos à análise por CG-EM.

A análise foi realizada no cromatógrafo Agilent 6890 equipado com o amostrador automático Gerstel CIS (Gerstel, Muehlheim, Germany) e com a coluna Rtx-5Sil MS (30 m de comprimento e 0,25 mm diâmetro interno). A temperatura do forno foi mantida constante a 50°C durante 1 minuto e, em seguida, a rampa de temperatura foi de 20° C min⁻¹ até 330° C, a qual foi mantida constante durante 5 min. O fluxo de gás hélio foi de 1ml min⁻¹ e o volume injetado

foi de 10 uL (modo *splitless*) na concentração de 0,5 mg mL⁻¹. O detector Leco Pegasus IV GC-TOF-MS (Leco Corp., St. Joseph, MI, USA) estava acoplado ao CG por uma linha de transferência com temperatura de 280° C e controlado pelo software Leco ChromaTOF vs. 2.32 (St. Joseph, MI). A energia de ionização foi de 70 eV e a temperatura da câmara de íons estava a 250° C. A faixa de escaneamento de massas foi 85 – 500 Da. Os compostos foram identificados de acordo com os espectros de massa da biblioteca *Fiehn*.

2.6 Análise dos Componentes Principais (ACP)

A planilha com os compostos identificados pela análise de CG-MS foi submetida à análise de componentes principais. O programa utilizado para as análises foi o “Unscrambler v. 10.3” (CAMO Software AS, Oslo, Norway). A representação gráfica dos “loadings” indica quais são as variáveis ou sinais do espectro responsáveis pela variação nos dados, enquanto que os “scores” representam o peso de cada variável identificada no modelo. Os dados (unidades de íons) foram dispostos em uma matriz de dados com 12 linhas x 280 colunas. Ao final da análise o número de variáveis foi reduzido a duas componentes principais. Usando o programa “Unscrambler v. 10.3” os dados foram centrados na média (média zero e desvio padrão um) e o algoritmo usado para calcular os “loadings” e “scores” foi o NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Squares). A validação do modelo foi realizada pelo método “full cross-validation”.

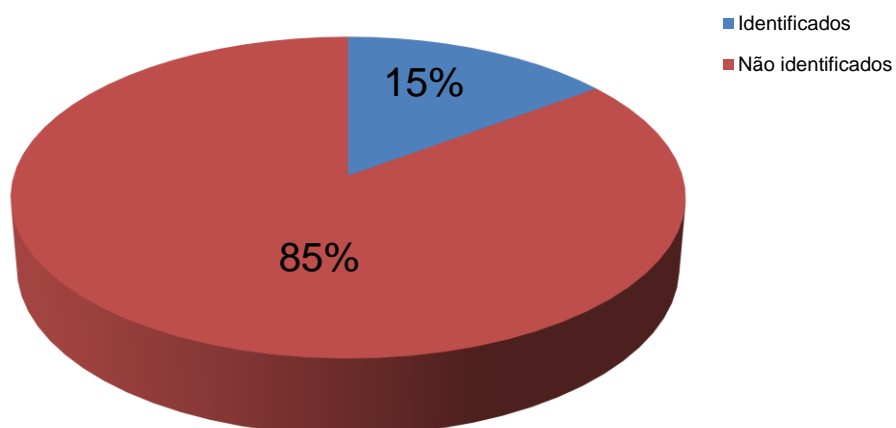
3.RESULTADOS

3.1. Compostos identificados por CG-EM

Foram detectados 1885 compostos diferentes nos extratos foliares e 280 foram identificados em todas as amostras por similaridade com a biblioteca *Fiehn* (Fiehn et al., 2008; Lee e Fiehn, 2008) (Figura 1A). Os compostos identificados pertenceram, principalmente, a categoria dos carboidratos (29%), lipídios (17%), ácidos orgânicos (16%), compostos nitrogenados que não aminoácidos (13%), aromáticos (11%), aminoácidos (9%) e outros (5%) (Figura 1B). A Figura 2 apresenta o número de compostos significativamente diferentes em relação ao controle de acordo com o teste bilateral de Dunnett (5% de significância). As Tabelas a seguir apresentam a abundância relativa de cada composto (classe) expressa em porcentagem em relação ao controle, a significância de acordo com o teste bilateral de Dunnett e sua função no metabolismo. Os cromatogramas encontram-se no Apendice 1.

A CG-EM é uma das ferramentas mais poderosas para a análise metabolômica e permitiu a identificação de cinco vezes mais compostos que o trabalho realizado anteriormente por Glassop et al. (2007). De um modo geral, foi observado que os AH, quando usados isoladamente diminuíram a concentração de um número maior de compostos comparado com as plantas inoculadas. Quando usado em combinação com BPCV amplificaram o efeito da inoculação no metabolismo da cana-de-açúcar (Figura 2).

Compostos Totais Detectados



Classe de Compostos Identificados

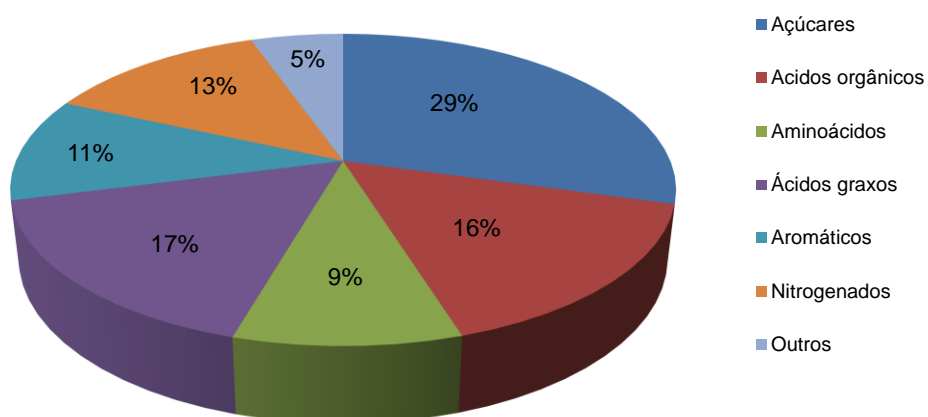


Figura 1. Relação entre o número de compostos detectados e identificados (A) e distribuição geral dos compostos por categoria bioquímica (B) em extratos metanólicos de folha de cana-de-açúcar analisados por CG-EM.

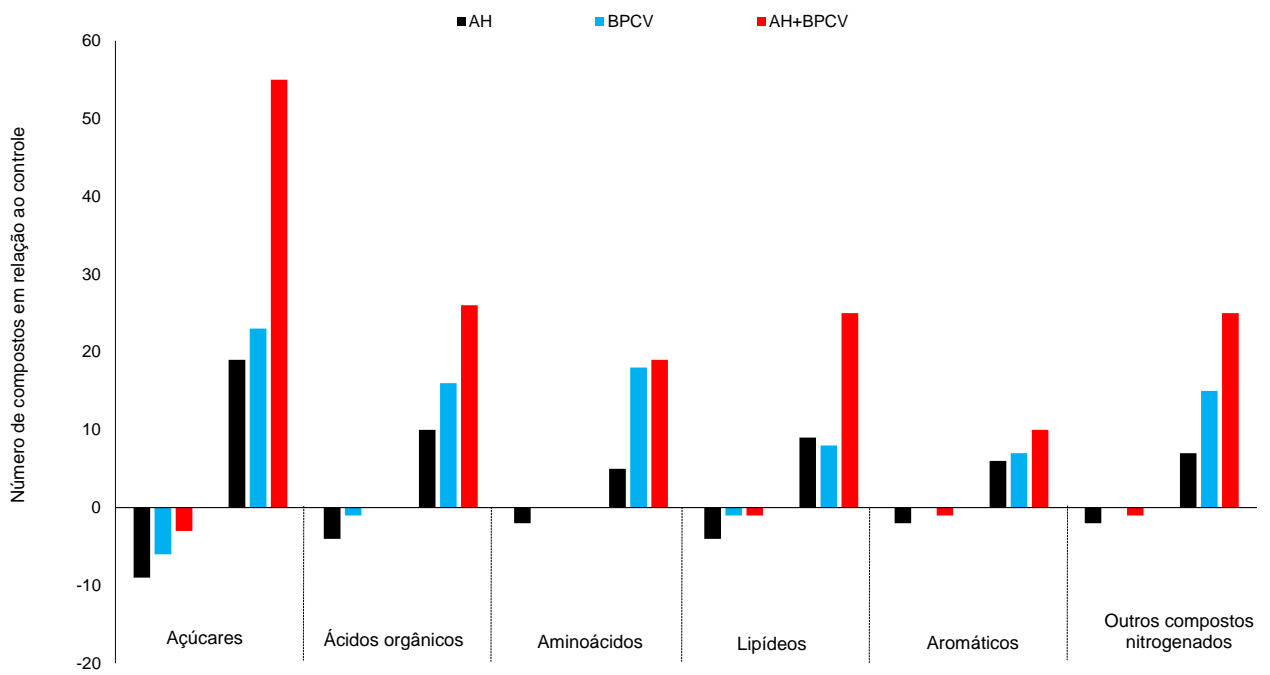


Figura 2. Número de compostos significativamente diferentes do controle de acordo com o teste bilateral de Dunnett (5% de significância). Os tratamentos foram: inoculação com *G. acetobacter* e *H. seropedicae* (BPCV) com (HA + BPCV) ou sem ácidos húmicos (AH).

3.2. Análise multivariada dos dados

As duas primeiras componentes principais capturaram 95 % da variância total dos dados (Figura 3). A interpretação em conjunto dos *scores* e dos *loadings* permitiu identificar e estimar a influência de cada tratamento na produção dos diferentes compostos. A primeira componente principal (CP1) capturou 73% da variância e segregou o tratamento AH+BPCV dos demais enquanto que a CP2 capturou 22% da variância e diferenciou os tratamentos AH e AH+BPCV dos demais (Figura 3A). O gráfico dos *scores* mostra a projeção das amostras na direção das componentes principais e os *loadings* representam os pesos ou a influência de cada variável (composto) em função da projeção dos *scores*. De acordo com a Figura 3B os maiores *loadings* diferenciam o tratamento AH+BPCV dos demais e estão ligados às mudanças principalmente no metabolismo dos lipídios, enquanto que as mudanças na via do ácido chiquímico foram responsáveis por diferenciar os tratamentos AH e AH+BPCV dos demais na segunda CP2 (Figura 3B).

A seguir é feita a descrição dos principais compostos analisados por CG-EM-TOF e expressos em porcentagem em relação ao tratamento controle.

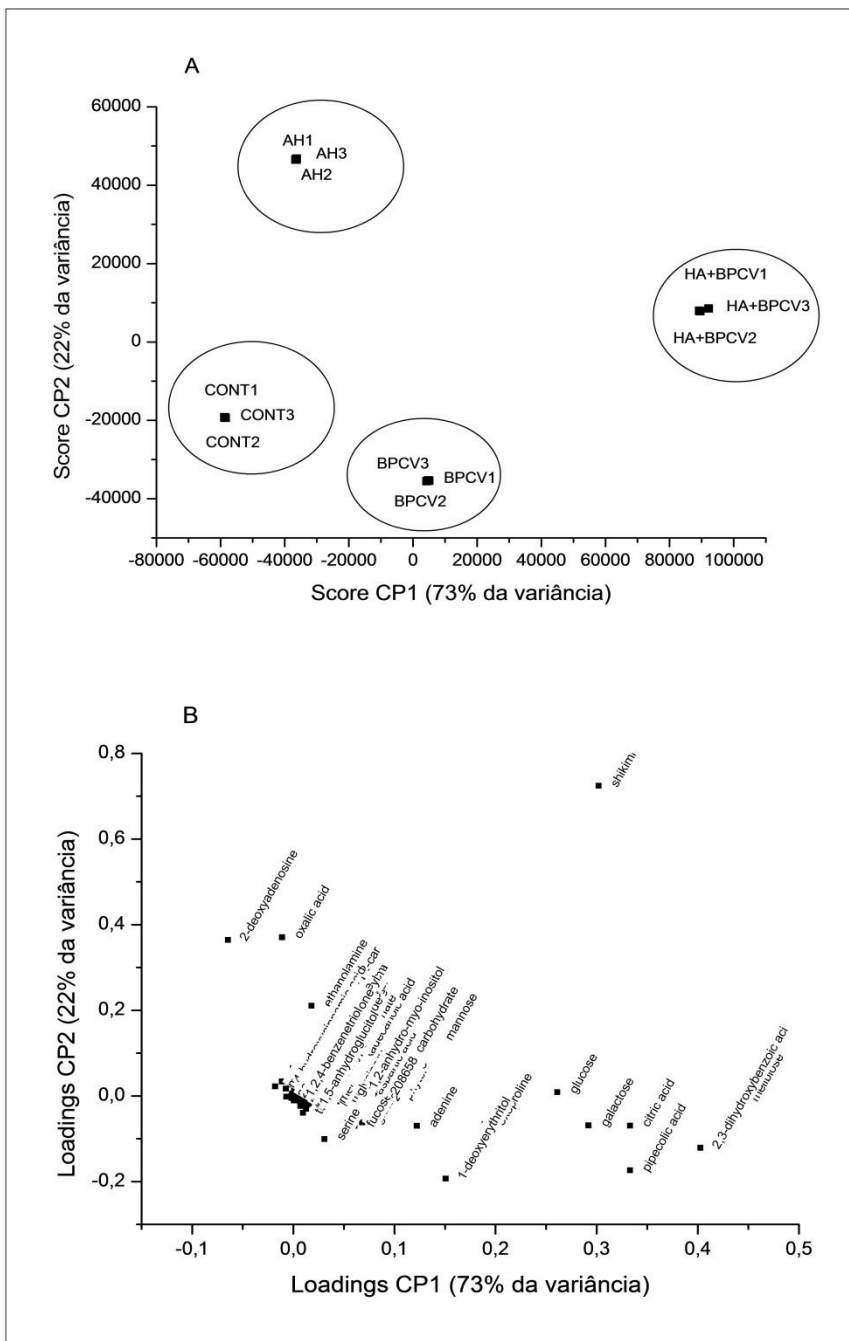


Figura 3. Análise de componentes principais (ACP) com os dados obtidos por CG-EM. Gráfico do scores (A) e loadings (B). Os tratamentos foram: inoculação com *G. acetobacter* e *H. seropedicae* (BPCV) com (HA + BPCV) ou sem ácidos húmicos (AH). Os dados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao tratamento controle.

3.3 Carboidratos (Tabela 1)

Nove carboidratos aumentaram significativamente em todos os tratamentos em relação ao controle. São eles: glicose, glicose-1-fosfato, galactose, levanbiose, ácido lactobiônico, 1-deoxieritritol, salicina, mannose e beta-hexopiranosose 1,6-anidro. Os extratos foliares das plantas inoculadas com BPCV e AH+BPCV apresentaram aumento na concentração de doze carboidratos enquanto que os mesmos diminuíram ou não foram significativos nas plantas tratadas com AH. Dentre eles destacam-se: glucoheptulose, frutose 1-fosfato, melibiose, sacarose 6-fosfato e xilitol. Nas plantas inoculadas com BPCV três carboidratos aumentaram, mas a diferença não foi significativa (lactose, xilulose, ribose, metil-hexose) enquanto que outros cinco carboidratos (sialicina, rafinose, maltose) diminuíram significativamente. Os açúcares rafinose e maltose tiveram suas concentrações aumentadas apenas nas plantas tratadas com AH. Outros vinte e quatro carboidratos aumentaram significativamente somente nas plantas inoculadas com BPCV e AH+BPCV, em especial o beta-glicerolfosfato, enolpiruvato, eritritol, fucose, galactose-6-fosfato, glucose-6-fosfato, glicero-guloheptose, hexose amino-2-deoxi, isomaltose, melezitose, ribitol, sofrorose, tagatose, treitol e trealose.

Tabela 1. Carboidratos identificados em extratos metanólicos de folha de cana-de-açúcar analisados por CG-EM e submetidos ao teste bilateral de Dunnett. Os tratamentos foram: inoculação com *G. acetobacter* e *H. seropedicae* (BPCV) com (AH+BPCV) ou sem ácidos húmicos (AH). Os dados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao tratamento controle.

	AH	BPCV	AH+BPCV
Glicose	85**	173**	299**
Glicose-1-fosfato	38*	57**	116**
Galactose	160**	975**	1876**
Levanbiose	107**	90**	116**
Ácido lactobionico	110**	152**	247**
1-deoxieritritol	104**	1664**	1231**
Salicina	211*	336**	1782**
Mannose	148**	22**	429**
Beta-hexopiranosose 1,6-anidro	122*	113*	157*
	AH	BPCV	AH+BPCV
Glucoheptulose	7 ^{ns}	152*	263**
Lactona do ácido eritronico	-18 ^{ns}	154**	50**
Frutose-1-fosfato	62 ^{ns}	336*	738**
Disacarídeo 267647	-8 ^{ns}	671**	2169**
Dissacarídeo 285065	-25 ^{ns}	74**	59**
Carboidrato 214402	9 ^{ns}	214*	168*
Carboidrato 506414	49 ^{ns}	184*	323**
Dissacarídeo 202832	-13**	21**	49**
1-desoxipentitol	-28 ^{ns}	320**	897**
Melibiose	-62**	943**	4143**
Sacarose-6-fosfato	38 ^{ns}	254*	457*
Xilitol	91 ^{ns}	155*	146*
	AH	BPCV	AH+BPCV
Carboidrato 200509	92**	-4 ^{ns}	54**
Carboidrato 400671	71**	-2 ^{ns}	50**
Lactose	510**	168 ^{ns}	359**
Metil-hexose	45**	2 ^{ns}	252**
Raffinose	162**	-50**	16 ^{ns}
Maltose	132*	-16 ^{ns}	12 ^{ns}
Ribose	548**	71 ^{ns}	385**
Sialicina	208*	-18 ^{ns}	140*
Xilulose	458**	228 ^{ns}	1264**

ns:não significativo; *significativo a $p>0,05$ e **significativo a $p<0,01$ pelo teste bilateral de Dunnett.

Continuação da Tabela 1

	AH	BPCV	AH+BPCV
1,5-anidroglucitol	-80**	-13*	42**
Carboidrato 200658	-19 ^{ns}	28 ^{ns}	346**
Carboidrato 201952	46 ^{ns}	24 ^{ns}	271**
Carboidrato 202573	18 ^{ns}	-1 ^{ns}	871**
Carboidrato 208658	19 ^{ns}	115 ^{ns}	343*
Carboidrato 231180	61 ^{ns}	29 ^{ns}	240*
Dissacarídeo 231210	64 ^{ns}	79 ^{ns}	182**
Carboidrato 233289	-19 ^{ns}	188 ^{ns}	911**
Beta-glicerolfosfato	39 ^{ns}	66 ^{ns}	235*
Carboidrato 424905	-46 ^{ns}	-69*	179**
Enolpiruvato	22 ^{ns}	85 ^{ns}	246*
Eritritol	-2 ^{ns}	132 ^{ns}	169*
Fucose	-51**	0 ^{ns}	44**
Galactose-6-fosfato	-5 ^{ns}	27 ^{ns}	107*
Glucose-6-fosfato	-21 ^{ns}	129 ^{ns}	413*
Glicero-guloheptose	-13 ^{ns}	-36 ^{ns}	258*
Hexose amino-2-deoxi	-16 ^{ns}	83 ^{ns}	192**
Isomaltose	-77 ^{ns}	95 ^{ns}	586**
Melezitose	244 ^{ns}	63 ^{ns}	533*
Ribitol	96 ^{ns}	47 ^{ns}	825**
Soforose	49 ^{ns}	127 ^{ns}	297*
Tagatose	-24 ^{ns}	-7 ^{ns}	220*
Treitol	-15 ^{ns}	111 ^{ns}	418**
Trealose	-33 ^{ns}	-17 ^{ns}	133*

ns:não significativo; *significativo a $p>0,05$ e **significativo a $p<0,01$ pelo teste bilateral de Dunnett.

3.4. Aminoácidos (Tabela 2)

A concentração dos aminoácidos isoleucina, lisina, oxoprolina e prolina aumentaram significativamente em todos os tratamentos, em relação ao controle. Nas plantas tratadas com AH foi observado aumento em apenas um amino ácido, o ácido 5-aminovalérico. Entretanto as concentrações de outros quatorze aminoácidos aumentaram somente nas plantas inoculadas com BPCV e AH+BPCV. Dentre eles, os mais produzidos foram o ácido aspártico, asparagina, fenilalanina, glutamina, homoserina, treonina e citrulina. A glicina e o N-hexanoilglicina aumentaram apenas nas plantas inoculadas com AH+BPCV.

3.5. Ácidos orgânicos (Tabela 3)

A produção de ácidos orgânicos foi significativamente alterada pelos tratamentos. Dos ácidos identificados, oito tiveram a concentração aumentada nas plantas tratadas. São eles: ácido cítrico, alfa-cetoglutárico, maleico, oxálico, idônico, láctico, 2-deoxitreônico e ribônico. Foi observado aumento na concentração de sete ácidos orgânicos nas plantas inoculadas com BPCV e AH+BPCV: ácido 2-hidroxiglutárico, lactona do ácido glucônico, isotreônico, itacônico, manônico, múcico e pantotênico. A concentração do ácido aminomalônico aumentou apenas nas plantas inoculadas com BPCV. Outros nove ácidos orgânicos tiveram sua concentração aumentada somente nas plantas inoculadas com AH+BPCV. São eles: ácido 2-oxoglucônico, 3-hidroxiopropiônico, 2-hidroxi-ádipico, dihidroximalônico, fumárico, glutárico, hexurônico e pirúvico. O ácido sacárico e a lactona do ácido isocítrico tiveram a concentração aumentada nas plantas tratadas AH e AH+BPCV.

Tabela 2. Aminoácidos identificados em extratos metanólicos de folha de cana-de-açúcar analisados por CG-EM e submetidos ao teste bilateral de Dunnett. Os tratamentos foram: inoculação com *G. acetobacter* e *H. seropedicae* (BPCV) com (AH+BPCV) ou sem ácidos húmicos (AH). Os dados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao tratamento controle.

	AH	BPCV	AH+BPCV
Isoleucina	45**	88**	135**
Lisina	306*	429*	677*
Oxoprolina	26**	192**	320**
Prolina	278**	1031**	1155**
	AH	BPCV	AH+BPCV
Ácido 5-aminovalérico	212**	24 ^{ns}	64 ^{ns}
	AH	BPCV	AH+BPCV
4-hidroxiprolina	1 ^{ns}	94**	369**
5-hidroxinorvalina	-26 ^{ns}	154**	52 ^{ns}
Asparagina	-85**	177**	937**
Ácido aspártico	16 ^{ns}	122**	629**
Citrulina	-18 ^{ns}	480*	446*
Ácido glutâmico	14 ^{ns}	254**	250**
Glutamina	-72 ^{ns}	1038**	595**
Homoserina	-38 ^{ns}	216*	640**
Metionina	-42 ^{ns}	208*	264*
N-acetilornitina	28 ^{ns}	247*	425*
N-metilalanina	-40 ^{ns}	101**	99**
Fenilalanina	126 ^{ns}	1004**	819**
Serina	-3 ^{ns}	253**	81**
Treonina	34 ^{ns}	414**	101**
	AH	BPCV	AH+BPCV
N-hexanoilglicina	84 ^{ns}	238 ^{ns}	646*
Glicina	-14**	0 ^{ns}	107**

ns:não significativo; *significativo a $p>0,05$ e **significativo a $p<0,01$ pelo teste bilateral de Dunnett.

Tabela 3. Ácidos orgânicos identificados em extratos metanólicos de folha de cana-de-açúcar analisados por CG-EM e submetidos ao teste bilateral de Dunnett. Os tratamentos foram: inoculação com *G. acetobacter* e *H. seropedicae* (BPCV) com (AH+BPCV) ou sem ácidos húmicos (AH). Os dados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao tratamento controle.

	AH	BPCV	AH+BPCV
Ácido cítrico	98**	416**	748**
Ácido alfa cetoglutárico	7*	22*	83**
Ácido maleico	305**	263**	122**
Ácido oxálico	745**	18**	259**
Ácido idônico	150*	150*	268**
Ácido láctico	76**	22**	43**
Ácido 2-deoxitetronico	76*	95*	84*
Ácido ribônico	33*	46**	155**
	AH	BPCV	AH+BPCV
Ácido 2-hidroxi glutárico	-30 ^{ns}	77*	57*
Ácido aminomalônico	10 ^{ns}	104*	83 ^{ns}
Lactona do ácido glucônico	105 ^{ns}	330**	412**
Ácido isotreônico	30 ^{ns}	103**	211**
Ácido itacônico	-50**	31**	28**
Ácido manônico	12 ^{ns}	120*	129*
Ácido múcico	-47**	127**	408**
Ácido pantotênico	11 ^{ns}	81**	307**
	AH	BPCV	AH+BPCV
Ácido 2-oxoglucônico	65 ^{ns}	264 ^{ns}	730**
Ácido 3-hidroxi propionico	27 ^{ns}	31 ^{ns}	87**
Ácido 2-hidroxiá dipico	99 ^{ns}	4 ^{ns}	292*
Ácido ascórbico	114 ^{ns}	155 ^{ns}	368**
Ácido dihidroximalônico	-72 ^{ns}	0 ^{ns}	298*
Ácido fumárico	2 ^{ns}	-47 ^{ns}	126**
Ácido glutárico	33 ^{ns}	118 ^{ns}	184*
Ácido hexurônico	-9 ^{ns}	85 ^{ns}	305*
Ácido pirúvico	-61**	0 ^{ns}	29**
	AH	BPCV	AH+BPCV
Lactona do ácido isocítrico	145**	10 ^{ns}	140**
Ácido sacárico	133**	-13 ^{ns}	235**

ns: não significativo; *significativo a $p > 0,05$ e **significativo a $p < 0,01$ pelo teste bilateral de Dunnett.

3.6. Lipídios (Tabela 4)

Os lipídeos beta-sitosterol, ácido láurico, metil-hexadecanóico e pelargônico tiveram a concentração aumentada em todos os tratamentos, em relação ao controle. Outros quatro lipídeos, a di-hidrosfingosina, 6-hidroxi caproato dímero, 2-monooleína e ácido palmítico tiveram a concentração aumentada apenas nas plantas inoculadas com BPCV e AH+BPCV. Cerca de doze lipídeos foram produzidos em maiores concentrações exclusivamente nas plantas inoculadas com AH+BPCV. Dentre eles destacam-se principalmente ácido linolênico, cerótico, 2-monopalmitina, cis-4-deceno-1,10-dióico, palmitoleico, fitol e mirístico. A monooleína foi produzida em maior concentração somente nas plantas tratadas com AH, enquanto diminuiu nos demais tratamentos. Os ácidos beênico, cáprico, colesterol e eicosenóico foram produzidos em maiores concentrações somente nas plantas tratadas com AH e AH+BPCV.

3.7. Compostos nitrogenados (Tabela 5)

Os nucleosídeos foram os compostos nitrogenados (outros que não aminoácidos) produzidos em maior quantidade como resposta aos tratamentos. Todos os tratamentos induziram a produção de quatro compostos nitrogenados: adenina, etanolamina, putrescina e N-acetil-D-hexosamina. Outros dez compostos foram produzidos em maiores concentrações apenas nas plantas tratadas com BPCV e AH+BPCV. São eles: timina, timidina, uracil, guanina, citosina, adenosina, 2-deoxiguanosina, butirolactan, 5-metil-citosina e 3-hidroxipiridina. Os compostos 4-hidroxiquinolina-2-ácido carboxílico, 1,3-diaminopropano e 2-deoxiadenosina foram produzidos em grande quantidade nas plantas tratadas com AH e AH+BPCV. Cinco compostos foram significativamente aumentados nas plantas inoculadas com AH+BPCV, são eles 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina, carnitina, maleimida, ácido orótico e espermidina.

Tabela 4. Lipídeos identificados em extratos metanólicos de folha de cana-de-açúcar analisados por CG-EM e submetidos ao teste bilateral de Dunnett. Os tratamentos foram: inoculação com *G. acetobacter* e *H. seropedicae* (BPCV) com (AH+BPCV) ou sem ácidos húmicos (AH). Os dados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao tratamento controle.

	AH	BPCV	AH+BPCV
Beta-sitosterol	460**	191**	765**
Ácido laurico	179**	165**	202**
Ácido metil-hexadecanoico	34*	364**	579**
Ácido pelargônico	38**	117**	69**
	AH	BPCV	AH+BPCV
Di-hidrosfingosina	79 ^{ns}	162*	692*
6-hidroxi caproato dimero	-82**	103**	134**
2-monooleina	-59**	25*	43**
Ácido palmítico	-11**	9**	32**
	AH	BPCV	AH+BPCV
Ácido lignocérico	-13 ^{ns}	-61**	61**
Ácido linoleico	2 ^{ns}	76 ^{ns}	286*
Ácido linolênico	-6 ^{ns}	51 ^{ns}	597**
Ácido cerótico	8 ^{ns}	46 ^{ns}	464**
2-monopalmitina	113 ^{ns}	-35 ^{ns}	357**
Ácido cis-4-decene-1,10-dioico	142*	106 ^{ns}	429**
1-monopalmitoleína	9 ^{ns}	-5 ^{ns}	80*
Ácido palmitoleico	41 ^{ns}	71 ^{ns}	297**
Fitol	-84**	17 ^{ns}	454**
Ácido pimélico	-30 ^{ns}	-37 ^{ns}	104**
Esqualeno	-43 ^{ns}	5 ^{ns}	124**
Ácido mirístico	100 ^{ns}	20 ^{ns}	175*
	HA	PGPB	PGPB+HA
Monooleina	43**	-7*	-41**
Ácido beénico	193**	-36 ^{ns}	439**
Ácido cáprico	60**	12 ^{ns}	47*
Colesterol	222*	-7 ^{ns}	342**
Ácido eicosenóico	167**	-37 ^{ns}	417**

ns:não significativo; *significativo a $p>0,05$ e **significativo a $p<0,01$ pelo teste bilateral de Dunnett.

Tabela 5. Nitrogenados identificados em extratos metanólicos de folha de cana-de-açúcar analisados por CG-EM e submetidos ao teste bilateral de Dunnett. Os tratamentos foram: inoculação com *G. acetobacter* e *H. seropedicae* (BPCV) com (AH+BPCV) ou sem ácidos húmicos (AH). Os dados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao tratamento controle.

	AH	BPCV	BPCV+AH
Adenina	377**	3817**	4971**
Etanolamina	192**	86**	94**
Putrescina	75**	123**	405**
N-acetil-D-hexosamina	43**	37**	73**
	AH	BPCV	BPCV+AH
Timina	-15 ^{ns}	216**	367**
Timidina	-56**	125**	247**
Uracil	-30 ^{ns}	213**	81**
Guanina	-50 ^{ns}	777 *	2667*
Citosina	5 ^{ns}	368*	517**
Adenosina	-77**	226**	116**
2'-deoxiguanosina	108 ^{ns}	1179**	997**
Butirolactano	-4 ^{ns}	800**	708**
5-metil-citosina	31 ^{ns}	283 *	503*
3-hidroxipiridina	20 ^{ns}	211 *	356*
	AH	BPCV	BPCV+AH
4-hidroxiquinolina-2-ácido carboxílico	650**	-40 ^{ns}	255**
	AH	BPCV	BPCV+AH
1,3-diaminopropano	131*	47 ^{ns}	196**
2-deoxiadenosina	736*	-14 *	65**
5'-deoxi-5'-metililadenosina	4 ^{ns}	56 ^{ns}	157**
Carnitina	10 ^{ns}	-10 ^{ns}	384**
Maleimida	-16 ^{ns}	60 ^{ns}	527**
Ácido orótico	19 ^{ns}	47 ^{ns}	214**
Espermidina	4 ^{ns}	106 ^{ns}	749*

ns:não significativo; *significativo a $p>0,05$ e **significativo a $p<0,01$ pelo teste bilateral de Dunnett.

3.8. Compostos aromáticos (Tabela 6)

Os compostos aromáticos foram os menos alterados pelos tratamentos. Quatro compostos aumentaram em todos os tratamentos: ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido 2,3-dihidroxibenzóico, ácido cis-cafeico e ácido chiquímico. O ácido 4-hidroxicinnâmico aumentou nas plantas tratadas com AH e diminuiu nas plantas inoculadas. A concentração de arbutina aumentou significativamente nas plantas tratadas com AH e AH+BPCV. Enquanto que o ácido clorogênico aumentou apenas nas plantas inoculadas com BPCV. Dois ácidos tiveram a concentração diminuída nas plantas tratadas com AH, o ácido piperólico e fitálico. As plantas inoculadas com AH+BPCV apresentaram aumento na concentração do ácido parabênico, coniferina, 4-hidroxibenzoato e 4-hidroxibenzaldeído.

Tabela 6. Aromáticos identificados em extratos metanólicos de folha de cana-de-açúcar analisados por CG-EM. Os tratamentos foram: inoculação com *G. acetobacter* e *H. seropedicae* (BPCV) com (AH+BPCV) ou sem ácidos húmicos (AH). Os dados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao tratamento controle.

	AH	BPCV	AH+BPCV
Ácido 3,4-di hidroxibenzóico	46**	58**	29*
Ácido 2,3-di hidroxibenzóico	12**	52**	80**
Ácido cis-cafeico	294**	138*	494**
Ácido chiquímico	311**	22**	385**
	AH	BPCV	AH+BPCV
Arbutina	204**	21 ^{ns}	127**
Ácido 4-hidroxi cinnamico	100**	-6 ^{ns}	-19**
	AH	BPCV	AH+BPCV
Ácido pipecólico	-77**	197**	450**
Ácido fitálico	-29*	72**	117**
Ácido clorogênico	-20 ^{ns}	133*	-30 ^{ns}
	AH	BPCV	AH+BPCV
Ácido parabânico	13 ^{ns}	62 ^{ns}	137**
Coniferina	-77*	-33 ^{ns}	201**
4-hidroxibenzoato	19 ^{ns}	1 ^{ns}	98**
4-hidroxibenzaldeído	63 ^{ns}	-48 ^{ns}	87*

ns:não significativo; *significativo a $p>0,05$ e **significativo a $p<0,01$ pelo teste bilateral de Dunnett.

4. DISCUSSÃO

4.1 Carboidratos

Nesse trabalho foram observadas mudanças nos níveis de açúcares nas folhas de cana-de-açúcar inoculadas com BPCV na presença ou não de AH. O efeito da inoculação foi significativo para a maioria dos compostos. Nas bactérias de coloração Gram negativa os oligopolissacarídeos são formados principalmente por heptoses. O papel dos oligopolissacarídeos na interação bactéria-hospedeiro é bem descrito na literatura (Nwodo et al., 2012) e foi encontrado um aumento significativo de heptoses (glicero-guloheptose) nas plantas tratadas com BPCV+AH (Tabela 1).

Nas plantas a biossíntese de unidades de isopreno, o precursor mais comum da biossíntese de isoprenóides, envolve duas rotas distintas. A mais comum é a via do mevalonato usada para a biossíntese de isoprenóides fora dos plastídeos (fitosteróis, proteínas prenilhadas, sesquiterpenóides), enquanto que os isoprenóides sintetizados nos plastídeos (carotenóides, plastoquinonas, diterpenos, monoterpenos) são sintetizados na via 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (Hemmerlin et al. 2006). Essa via usa a 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS) e tiamina para produzir isoprenóides. Foi identificado aumento significativo na concentração do substrato xilulose (1264%) bem como na tiamina (367%) evidenciando o estímulo da via de isoprenóides pela inoculação combinada.

Os isoprenóides representam uma classe de compostos de categoria química e funcionalidade muito diversificada que incluem carreadores de elétrons (quinonas), constituintes de membranas (esteróis), vitaminas (A, D, E e K), hormônios vegetais (cadeia lateral de citoquininas, ácido abscísico, giberelinas e brassinoesteróides), além de pigmentos fotossintéticos (clorofila, fitol e carotenóides). Foi observado aumento de diferentes esteróis (β -sitosterol, fitol, estigmasterol, colesterol), citosina e esqualeno no tratamento BPCV+AH. Outras mudanças importantes no metabolismo dos açúcares incluíram o aumento significativo de produtos osmoreguladores e de açúcares associados à rigidez da

parede celular. Entre eles, a melibiose, galactose, salicina e trealose (Peña et al., 2004).

4.2 Aminoácidos

O perfil de aminoácidos foi alterado significativamente pelos tratamentos utilizados. Uma visão geral dessa mudança pode ser analisada na Figura 3. Os AH promoveram maior decréscimo na concentração de aminoácidos em relação ao controle e aos tratamentos com a inoculação. O tratamento com BPCV induziu principalmente a glutamina, asparagina e ácido aspártico, os aminoácidos mais abundantes nas folhas. A prolina e a oxoprolina também sofreu aumento de concentração com o tratamento BPCV e o papel destes aminoácidos como osmoprotetores durante estresse hídrico é bem conhecido. A inoculação promoveu uma resposta que incluiu o acúmulo de derivados da ornitina além da prolina e oxoprolina os aminoácidos 5-hidróxi norvalina (Yan et al. 2015) e a citrulina (Yokota et al., 2002), bem como, as poliaminas putrescina e espermidina (Tabela 2). De um modo geral, pode-se afirmar que a inoculação maximizou a produção de aminoácidos que por sua vez também foi aumentada na presença de AH. O aumento da concentração de aminoácidos foi sustentado pelo aumento do metabolismo de açúcares descrito previamente. O ácido 5-amino valérico e 3-amino iso butírico (GABA) são aminoácidos graxos (não proteicos) que tiveram sua concentração induzida por AH. Nas plantas, o estresse de um modo geral inicia uma via de transdução de sinal que é amplificada por ondas de cálcio geradas por diferenças de concentração de cálcio no citoplasma. A diferença de Ca^{2+} ativa a enzima calmodulina dependente de Ca^{2+}/H^+ , a glutamato decarboxylase e, também, a síntese de GABA. Concentrações elevadas de H^+ e de substrato também estimulam a atividade da glutamato decarboxilase que media a produção e acúmulo de GABA durante vários tipos de estresse (Shelp et al., 1999). Além disso, Ramos et al. (2015) descreveram o mecanismo envolvendo o pulso de concentração de Ca^{2+} no citoplasma em plantas de arroz estimuladas por AH e mostraram uma interação dinâmica entre o influxo e o efluxo de Ca^{2+}/H^+ , respectivamente, bem como o aumento da atividade das

enzimas fosfoquinase dependentes de cálcio (CDPK) e da expressão dos canais de Ca^{2+} transmembranares. Tomados em conjunto foi possível observar a ampliação da síntese de aminoácidos na presença de AH (Figura 4).

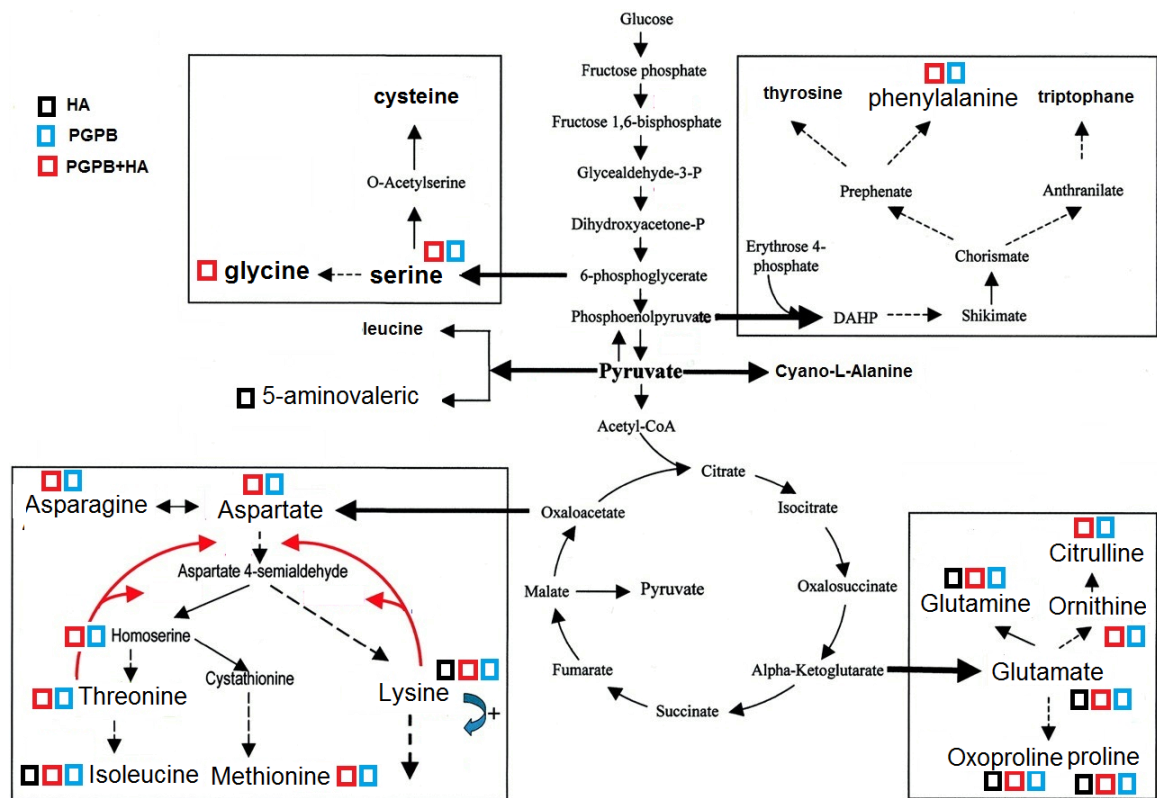


Figura 4. Visão geral do efeito dos tratamentos sobre a síntese de aminoácidos. Os círculos representam a influência dos tratamentos sobre a concentração dos aminoácidos e não estão em escala que pode ser observada na Tabela 2.

4.3 Ácidos orgânicos

Os componentes básicos do ciclo do ácido tricarboxílico tiveram suas concentrações aumentadas pelos tratamentos, incluindo ácido oxálico, cítrico, α -cetoglutárico (Tabela 3). O aumento da concentração do ácido α -cetoglutárico pode resultar na maior concentração de ácido glutárico e, portanto, na síntese de glutamato/glutamina. Esses dados corroboram o aumento da concentração de aminoácidos derivados da ornitina (citrulina, norvalina, prolina e oxiprolina). Esses aminoácidos são sintetizados a partir da glutamina. Outra evidência é sustentada pelo acúmulo observado de poliaminas que são produtos da transformação da ornitina. Outros intermediários do ciclo de Krebs também foram identificados, como por exemplo, o ácido dihidróxi malônico, a lactona do ácido isocítrico e ácido 2-oxoglucônico. O ácido ascórbico foi encontrado em alta concentração em folhas de plantas tratadas com AH+BPCV. O ascorbato é um metabólito importante e atua como antioxidante e em associação com outros sistemas, atua na proteção contra o estresse oxidativo. O aumento de ácido ascórbico foi compatível com o aumento no metabolismo do glucoronato revelado pelo acúmulo de ácido galactônico, glucônico, lactona do ácido glucônico e ácido glutárico (Tabela 3).

4.4 Compostos nitrogenados

Apesar do aumento na concentração da inosina, no tratamento com AH, não ter sido significativamente diferente do controle, esse composto foi associado à ativação do crescimento celular. O aumento no crescimento de raízes, especialmente de pelos radiculares, em diferentes plantas com uso exógeno de inosina já foi reportado (Tokuhisa e Shinano, 2010). Nucleosídeos e seus derivados participam de processos bioenergéticos (ATP) e da síntese de macromoléculas incluindo polissacarídeos, fosfolipídios e glicolipídios além de constituírem a citocinina (Tokuhisa e Shinano, 2010). O papel dos AH e sua relação com a atividade das citocininas já foi postulado (Mora et al. 2012). Outros precursores da citocinina também tiveram sua concentração aumentada (3-ácido

3-hidroximetil glutárico e oxoadenosina). A etanolamina é um derivado do metabolismo da serina (Rontein et al. 2001) e substrato para a síntese da colina e fosfatidildietanolamina e fosfatidilcolina os principais lipídios das membranas das plantas. A citosina e a 2-deoxiguanosina tiveram um aumento significativo com o tratamento BPCV e AH+BPCV. O butirolactano é sintetizado a partir da ciclização do GABA pela GABA-cisteína hidrogenase. Essa via foi ativada pela inoculação com BPCV conduzindo ao aumento de oxoprolina produzida com a ciclização catalisada pela glutamiltransferase (EC 2.3.2.4) produzindo cisteína e oxoprolina. Essa via metabólica foi descrita como sendo ativada em arroz em resposta a infecção por xanthomonas (Sana et al., 2010). No tratamento com AH+BPCV uma imida (maleimida) foi encontrada em concentração elevada, porém é um composto citotóxico. O principal efeito da maleimida é bloquear o tráfico vesicular. Em trabalho anterior Trevisan et al. (2011) observaram o aumento da expressão de vários genes ligados a cinética celular em *Arabidopsis* tratada com AH. Acredita-se que o aumento da concentração da maleimida possa ser uma resposta metabólica contra esse aumento elevado no metabolismo. As poliaminas espermidina e putrescina foram encontradas em altas concentrações nos tratamentos inoculados. As poliaminas estão envolvidas no crescimento radicular e são normalmente encontradas em concentrações elevadas em tecidos ativos de plantas submetidas a estresse (Takahashi e Kakehi, 2010). A ação dos AH na promoção do crescimento radicular já foi comparada anteriormente com a ação das poliaminas (Yong e Chen, 1997; Mora et al., 2012). Foi encontrado aumento na concentração do ácido isonicotínico no tratamento AH+BPCV bem como do ácido orótico precursor da vitamina B13 (solúvel em água). As vitaminas têm um papel importante no controle do *status* redox da célula e são cofatores enzimáticos para uma série de reações metabólicas (Asensi e Munne-Bosch, 2010). O aumento de concentração dos níveis de vitaminas é, portanto, uma indicação de aumento da atividade metabólica.

4.5 Lipídios

O aumento de concentração de uma diversidade de metabólitos celulares incluindo glicose 6-fosfato, derivados do metabolismo do malato e a redução da concentração de piruvato estão de acordo com a grande mudança observada no metabolismo dos lipídios decorrentes dos tratamentos. Ácidos graxos de cadeia longa como o ácido docosanoico (ácido beênico), β -sitosterol, ácido láurico e ácido eicosanoico foram encontrados em concentrações elevadas no tratamento com AH. Os fitoesteróis são sintetizados principalmente na via do mevalonato previamente descrita nesse trabalho como bastante estimulada pela inoculação. O β -sitosterol é o principal esteróide vegetal e aumentos na sua concentração foram observados também no tratamento AH+BPCV. O β -sitosterol é componente chave para a elongação da cadeia de celulose, composição das membranas celulares, transporte intracelular, regulação do crescimento, assim como outras funções biológicas (Robinson, 1991). O β -sitosterol e outros fitoesteroides podem ser freqüentemente encontrados na forma de derivados mais complexos, como ésteres de ácidos graxos, aromáticos ou glicosilados. Os esfingolipídios foram encontrados em concentrações elevadas nas plantas inoculadas. Níveis elevados de esfingolipídios complexos foram associados com a morte celular, diferenciação terminal ou inibição do ciclo celular e, ao contrário, níveis reduzidos geralmente levam a proliferação celular (Bach e Faure, 2010). Junto com o aumento da concentração da maleimida é mais uma evidência que a inoculação induz uma resposta complexa antiestresse na planta hospedeira.

A concentração de colesterol é sempre muito baixa na célula vegetal, mas a análise de GC-TOF MS foi suficientemente sensível para detectar mudanças nos níveis de colesterol em função dos tratamentos. O fitol foi abundante no tratamento AH+BPCV e é o principal precursor da síntese de brassinosteroides. Outro lipídio abundante no tratamento AH+BPCV foi o esqualeno um terpeno de estrutura ($C_{30}H_{50}$) precursor da maior parte dos esteróis encontrados nas plantas (Amarowicz, 2009). O ácido azelaico é um ácido dicarboxílico com nove carbonos. Nas plantas é privilegiada a síntese de ácidos graxos de cadeia com número par de carbono já que a reação de síntese envolvendo a acetilCoA incorpora carbono de duas em duas unidades. Este ácido graxo teve sua concentração aumentada

somente nos tratamentos inoculados, sendo em maior proporção no tratamento AH+BPCV, apesar da diferença não ter sido significativa. Anteriormente foi observada acumulação de ácido azelaico em *Arabidopsis* em resposta a infecção por *Pseudomonas syringe* iniciando um sistema de defesa pela via do ácido salicílico (Jung et al., 2009).

4.6 Compostos aromáticos

A via do ácido chiquímico foi significativamente alterada pela inoculação. Os fenilpropanóides são derivados da fenilalanina com esqueleto básico C6-C3. Esse amino ácido aromático essencial é a base para a síntese dos derivados cinâmicos. Os precursores dessa via são o fosfoenolpiruvato da via da glicólise e a eritrose-4-fosfato da via da pentose fosfato. Ambos os compostos tiveram sua concentração aumentada pela inoculação assim como foi observado aumento elevado na concentração de fenilalanina. A concentração de enolpiruvato aumentou 22%, 85% e 246% com AH, BPCV e AH+BPCV, respectivamente, enquanto que vários derivados da eritrose também foram encontrados (eritritol, lactona do ácido eritrônico, eritrose) em níveis mais elevados nas plantas inoculadas. Logo, esperava-se uma influência sobre a síntese dos fenilpropanóides que foi confirmada pela análise multivariada, que agrupou os tratamentos AH e AH+BPCV na segunda componente principal (CPA2) (Figura 2A). O primeiro passo na via do ácido chiquímico é a acumulação de aminoácidos aromáticos, observado nas plantas inoculadas. O principal composto aromático induzido por BPCV foi o ácido cis-cafeico, um dos mais comuns dos fenilpropanóides nos vegetais. O aumento na concentração de compostos aromáticos é sempre associado ao *status* redox e à ação antioxidante. A enzima fenilalanina (tirosina) amônia-liase (PAL/TAL; EC 4.3.1.5) cataliza o primeiro passo da biossíntese de compostos fenólicos pela conversão da fenilalanina (pela desaminação) até ácido trans-cinâmico e da tirosina até ácido *p*-coumárico. A fenilalanina é o substrato normalmente mais utilizado, mas a enzima em monocotiledôneas usa os dois substratos igualmente (fenilalanina e tirosina). Schiavon et al. (2010) observaram aumento da expressão da PAL/TAL em plântulas de milho tratadas com AH e conseqüentemente também observaram

aumento na concentração de compostos fenólicos totais. É possível observar na Tabela 6 a lista completa dos compostos fenólicos identificados e com concentração induzida pelos tratamentos.

4.7 Visão integrada

Uma visão integrada das alterações promovidas no metabolismo pelos tratamentos pode ser observada na Figura 5 e especificamente na produção de aminoácidos na Figura 4. De um modo geral é possível afirmar que os AH ampliaram as respostas da inoculação. Os açúcares da via da pentose fosfato e seus intermediários estiveram presentes em concentrações muito elevadas, como por exemplo, a glicero-guloheptulose, melibiose e xilose. A via da pentose fornece açúcares para via do ácido chiquímico justificando o aumento observado na concentração de compostos aromáticos (Tabela 6). Concentrações elevadas de ribose e de ribitol providenciam substrato para a biossíntese de nucleosídeos que tem elevada demanda metabólica para sua síntese. Foi observado aumento significativo de intermediários na síntese de ácidos nucleicos (aminas), purinas e pirimidinas nas plantas inoculadas. Finalmente, os resultados analíticos obtidos com a CG-TOF MS demonstraram claramente o aumento na atividade do ciclo do ácido tricarboxílico com acúmulo de ácido α -cetoglutárico o metabólito central para a síntese de glutamina e ácido glutâmico precursor da síntese dos aminoácidos ornitina, citrulina, prolina, oxoprolina, hidroxinorvalina e das poliaminas (espermidina e putrescina).

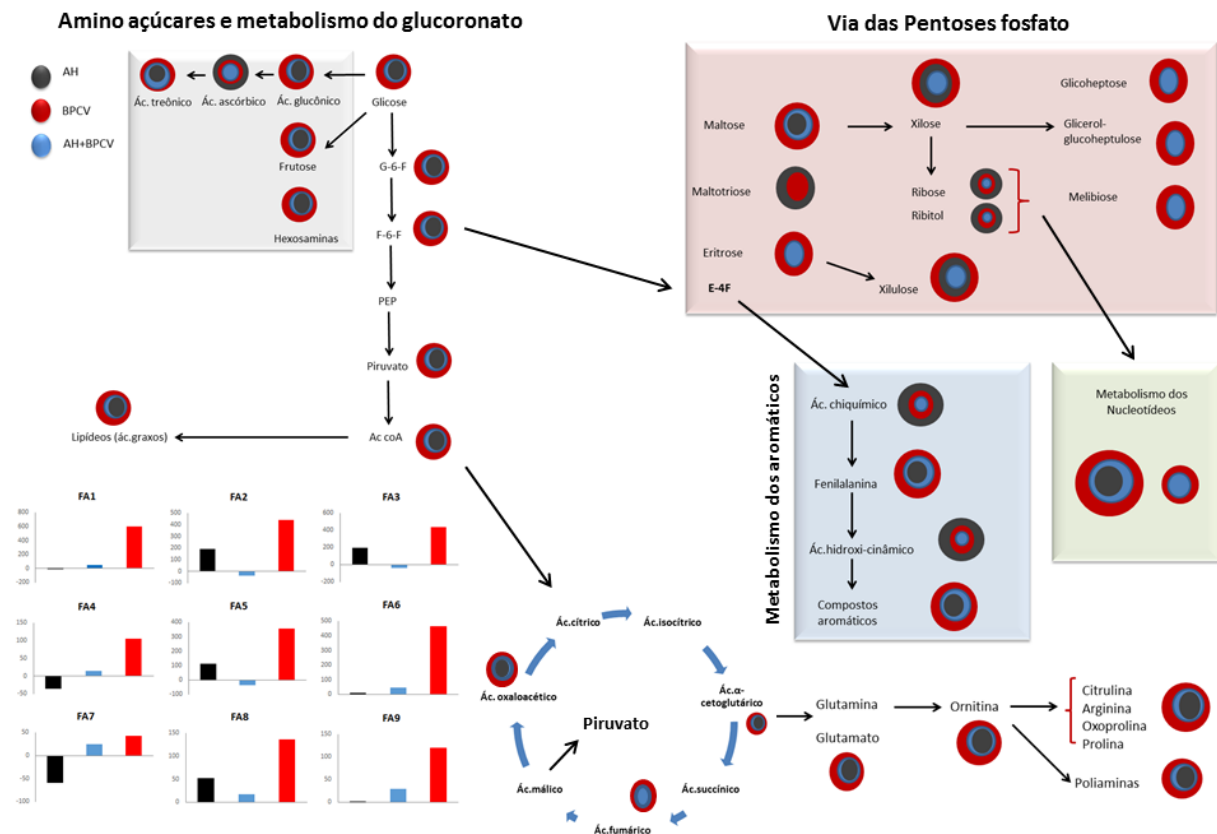


Figura 5. Visão geral do efeito dos tratamentos sobre o metabolismo de cana-de-açúcar. Os círculos representam a importância dos tratamentos sobre a concentração dos metabolitos e não estão em escala. O efeito quantitativo dos tratamentos no acúmulo dos compostos pode ser observado nas Tabelas 1-6. Identificação dos lipídios: FA1: ácido linolênico; FA2: ácido azeláico; FA3: 2-monooleína; FA4: ácido beênico; FA5: 2-monopalmitina; FA6: 1-hexadecanol; FA7: ácido cerótico; FA8: monopalmitina.

6.CONCLUSÃO

Foi possível observar alterações significativas no metabolismo primário (açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos graxos) e secundário (produtos da via do ácido chiquímico e do mevalonato) induzidas pelos bioinoculantes produzidos no Núcleo de Desenvolvimento de Insumos para Agricultura à base de ácidos húmicos e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Em termos gerais, o tratamento com ácidos húmicos resultou em menor número de compostos com concentração aumentada. O tratamento com AH aumentou de uma forma geral a via do ácido chiquímico produzindo grande quantidade de precursores de compostos usados na defesa vegetal contra estresses bióticos e abióticos derivados do ácido 4-hidróxi cinâmico. A ativação da via do mevalonato também foi observada com acúmulo de ácido 3-hidróxi-metil glutárico precursores dos esteróides. Foi observado, pela primeira vez, efeito de AH sobre o aumento da concentração da isotina um nucleosídeo precursor da citocinina implicado na divisão celular e na indução de pelos radiculares. Os aminoácidos amino iso-butírico e o 5-hidroxi amino valerico foram encontrados em maior concentração na presença de AH. O primeiro é derivado da degradação da tiamina e tem ação antifúngica e o segundo é derivado do GABA. Ainda em termos gerais, foi possível concluir que a presença de AH amplifica as alterações metabólicas provenientes da inoculação com BPCV. A principal alteração verificada em termos quantitativos foi o acúmulo de um monossacarídeo de sete carbonos (glicero glucoheptose) e do aminoácido secundário 5-hidróxinorvalina. Esses dois compostos junto com melibiose, salicina, galactose, espermidina, putrescina, maleimida, di-hidrosfingosina, ácido chiquímico, ácido cafeico, hidróxi benzeno, ácido orótico, fitol, monoestearina, ácido palminoleico, ácido azelaico, ácido hexadecanóico, linoleico e ácido eicosanóico são candidados a marcadores metabólicos do efeito dos biofertilizantes produzidos à base de substâncias húmicas e bactérias promotoras do crescimento vegetal.

7.AGRADECIMENTOS

O trabalho foi realizado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), International Foundation of Science (IFS), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT FBN). O estágio no Genoma Center da Universidade da Califórnia-Davis foi uma iniciativa do Programa Ciências Sem Fronteiras do Governo Federal (CNPq-CAPES).

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amarowicz, R. (2009) Squalene: A natural antioxidant? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111: 411-412.
- Asensi-Fabado, M.A., Munne-Bosch, S. (2010) Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends Plant Sci.* 15: 582-592.
- Bach L., Faure J.D. (2010) Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *Comptes Rendus Biologies* 333: 361–370.
- Bhattacharyya, P.N., Jha D.K. (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1327-1350.
- Brooker, J.D., Russel, D.W. (1975) Coenzyme A reductase from *Pisum sativum* seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 167: 723-729.*
- Canellas, L.P., Martínez-Balmori, D., Médici, L.O, Aguiar, N.O, Campostrini, E., Rosa, R.C., Façanha, A., Olivares, F.L. (2013) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil* 366: 119-132.
- Canellas, L.P., Martínez-Balmori, D., Médici, L.O, Aguiar, N.O, Campostrini, E., Rosa, R.C., Façanha, A., Olivares, F.L. 2013. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil* 366, 119-132.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L. (2014) Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 1: 1–11.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral

root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology* 130: 1951–1957.

Canellas, L.P., Silva, S.F., Olk, D., Olivares, F.L. (2015) Foliar application of *Herbaspirillum seropedicae* and humic acid increase maize yields. *J. Food Agric. Environ.* 13: 146-153,

Carletti, P., Mais, A., Spolaore, B., Polverino, De, Laureto, P., De Zorzi, M., Turetta, L., Ferretti, M., Nardi, S. (2008) Protein expression changes in maize roots in response to humic substances. *J. Chem. Ecol.* 34:804-818.

Chang, W.H., Tolbert, N.E. (1970) Excretion of glycolate, mesotartrate and isocitrate lactone by synchronized cultures of *Ankistrodesmus braunii*. *Plant Physiol.*, 46: 377–385.

Diener, A.C., Li, H., Zhou, W.X., Whoriskey, W.J., Nes, W.D., Finka, G.R. (2000) Sterol methyltransferase 1 Controls the Level of Cholesterol in Plants. *Plant Cell* 12: 853-870.

Embrapa (1997) Manual de métodos de análise de solo. Embrapa CNPS, Rio de Janeiro

Fiehn O, Wohlgemuth G, Scholz M, Kind T, Lee DY, Lu Y, Moon S, Nikolau B. 2008. Quality control for plant metabolomics: Reporting MSI-compliant studies. *Plant J* 53(4):691–704.

Fiehn, O. (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48: 155–171.

França, S.C., Roberto, P.G., Marins, M.A., Puga, R.D., Rodrigues, A., Pereira, J.O. (2001) Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. *Gen. Mol. Biol.* 24: 243-250.

Glassop D., Roessner U., Bacic A., Bonnett G.D. (2007) Changes in the sugarcane metabolome with stem development. are they related to sucrose accumulation? *Plant Cell Physiol.* 48: 573–584.

- Goldemberg J., Coelho, S.T., Guardabassi, P. (2008) The sustainability of ethanol production from sugarcane. *En. Pol.* 36: 2086-2097.
- Häfliger, B., Kindhauser, E., Keller, F. (1999) Metabolism of D-Glycero-D-Manno-Heptitol, Volemitol, in *Polyanthus*. Discovery of a Novel Ketose Reductase. *Plant Physiol.* 119: 191-19.
- Hemmerlin, A., Tritsch D. (2006) D-Xylulose kinase catalyzes the phosphorylation of 1-deoxy-d-xylulose into a precursor of the plastidial isoprenoid pathway. *Plant Physiology* 142: 441-457.
- Hernandez, O.L., Calderín, A., Huelva R., Martínez-Balmori, D., Guridi F., Aguiar N.O., Olivares, F.L., Canellas, L.P. (2015) Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agron. Sustain. Dev.* 35: 225–232.
- James, E.K., Olivares, F. (1998) Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic bacteria. *Crit. Rev. Plant Sci* 17:77–119.
- Jannin, L., Arkoun, M., Ourry, A., Laîné, P. Goux, D., Garnica, M., Fuentes, M., Francisco, S.S., Baigorri, R., Cruz, F., Houdusse, F., Garcia-Mina, J.M., Yvin J.C., Etienne, P. (2012) Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: involvement of N, C and S metabolisms. *Plant Soil* 359:297–319
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J., Greenberg, J.T. (2009) Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324: 89-91.
- Kwon, Y., Yu, S., Lee, H., Yim, J.H., Zhu, J.K., Lee, B. (2012) Arabidopsis serine decarboxylase mutants implicate the roles of ethanolamine in plant growth and development. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 3176-3188.
- Lallemand, L.A., Zubieta, C., Lee, S.G., Wang, Y., Acajjaoui, S., Timmins, J., McSweeney, S.M., Jez, J, McCarthy, J.G., McCarthy, A.A. (2012) A structural basis for the biosynthesis of the major chlorogenic acids found in Coffee. *Plant Physiol.* 160: 249–260.

- Lee DY, Fiehn O. 2008. High quality metabolomic data for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Methods* 4:7.
- Lima, L.S., Olivares, F.L., Oliveira, R.R., Vega, M.R.G, Aguiar, N.O., Canellas, L.P., 2014. Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1, 23.
- Martin, K.M., Engqvist, M.K.M., Eßer, C., Maier, A., Lercher, M.J., Maurino, V.J. (2014) Mitochondrial 2-hydroxyglutarate metabolism. *Mitochondrion*, 19: 275–281.
- Mathews, S., Abraaham, T.E. (2004) Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24: 59-83.
- Mora, V., Baigorri, R., Bacaicoa, V., Zamarreño, A., García-Mina, J.M. (2012) The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. *Environ Exp Bot* 76:24–32
- Munné-Bosch, S. (2005) The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 162: 743-8.
- Nardi S, Carletti P, Pizzeghello D, Muscolo A. Biological activities of humic substances. In: Senesi N, Xing B, Huang PM (ed) Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. Vol 2, part 1: fundamentals and impact of mineral-organic biota interactions on the formation, transformation, turnover, and storage of natural nonliving organic matter (NOM). Wiley, Hoboken, pp 305-340, 2009.
- Nebbioso A., Piccolo A., Lamshoft M., Spiteller M. (2014). Molecular characterization of an end-residue of humeomics applied to a soil humic acid. *RSC Adv.* 4: 23658-23665.

- Nwodo U.U, Green E., Okoh, A.I. (2012) Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects Int J Mol Sci. 13: 14002–14015.
- Olivares, F.L. (2009) Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG, p. 33 - 34, 20 jul.
- Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Rosa, R.C.C., Canellas, L.P. (2015) Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scient. Hort.* 183: 100-108.
- Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biol. Fert. Soils.* 21: 197-200.
- Owen, D., Williams, A.P., Griffith, G.W., Withers, P.J.A. (2015) Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology* 86: 41-54.
- Peña M.P., Ryden, P., Madson M., Smith A.C., Carpita N.C. (2004) Galactose Residues of Xyloglucan Are Essential to Maintain Mechanical Strength of the Primary Cell Walls in Arabidopsis during Growth. *Plant Physiol* 134:443-45.
- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P., Delmer, D. (2002) Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science*, 295: 147-50.
- Reis, V. M., & Teixeira, K. R. D. S. (2015). Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. *Journal of basic microbiology*.
- Rima, J.A.H., Aparecida, S.M., Dobbss, L.B., Evaristo, J.A.M., Retamal, C.A., Façanha, A.R., Canellas, L.P. (2011) Adição de ácido cítrico potencializa a ação de ácidos húmicos e altera o perfil protéico da membrana plasmática em raízes de milho. *Ci. Rural* 41: 614-620.

- Robinson, T. The Organic Constituents of Higher Plants. 6a ed. Massachusetts : Cordus Press., p. 151-153, 1991.
- Rontein, D., Nishida, I., Tashiro, G., Yoshioka, K., Wu, W.I., , Voelker, D.R., Basset, G., Hanson, A.D. (2001) Plants Synthesize Ethanolamine by Direct Decarboxylation of Serine Using a Pyridoxal Phosphate Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 35523–35529.
- Rosenzweig, C., Elliott, J., Deryng, D., Ruane, A. C., Müller, C., Arneth, A., ... & Jones, J. W. (2014). Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9), 3268-3273.
- Sana, T.R., Fischer, S., Wohlgemuth, G., Katrekar, A., Jung, K., Ronald, P.C., Fiehn, O. (2010), Metabolomic and transcriptomic analysis of the rice response to the bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Metabolomics* 6: 451-465.
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., Nardi, S. (2010) High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid
- Shelp, B.J., Bown, A.W., McLean, M.D. (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 4: 446-452.
- Smirnoff, N. 1996. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Annals of Botany* 78: 661–669.
- Takahashi, T., Kakehi J.I. (2010) Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann Bot.* 105: 1-6.
- Tittonell, P. (2014) Ecological intensification of agriculture - sustainable by nature. *Curr. Op. Environ. Sust.* 8: 53-61.
- Tokuhis, D., Shinano, T. (2010) Promotion of root growth by the application of inosine. *Soil Sci. Plant Nutr.* 56: 272–280.

- Toledo, M. Crise no setor canavieiro provoca fechamento de usinas e demissões. Folha de São Paulo, São Paulo, 15 de julho de 2015: <http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2015/07/1655141-crise-no-setor-canavieiro-provoca-fechamento-de-usinas-e-demissoes.shtml> acesso em 15 de setembro de 2015
- Trevisan, S., Botton, A., Vaccaro, S., Vezzaroa, A., Quaggiotti, S., Nardi, S. (2011) Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environ. Exp. Bot.* 74: 45-55.
- van Etten, H.D., Mathews, D.E., Mathews, P.S. (1989). Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. *Annu. Rev. Phytopath.* 27: 143-164.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Lopez A., Martos, V., Reyes, A., Maksimovic, I., Eichler-Löbermann, B., Malusà E. 2015. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 4983-4996.
- Whittaker A., Botha F.C. (1997) Carbon partitioning during sucrose accumulation in sugarcane intermodal tissue. *Plant Physiol.* 115: 1651-1659.
- Yan, J., Lipka, A.E., Schmelz, E.A., Buckler, E.S., Jander, G. (2015) Accumulation of 5-hydroxynorvaline in maize (*Zea mays*) leaves is induced by insect feeding and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 66: 593-602.
- Yokota, A., Kawasaki, S., Iwano, M., Nakamura, C., Miyake, C., Akashi, K. 2002. Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. *Ann Bot.* ;89: 825-32.
- Young, C.C., Chen, L.F. (1997) Polyamines in humic acid and their effect on radical growth of lettuce seedlings. *Plant Soil* 195: 143-149.

CAPÍTULO 2

PERFIL METABÓLICO E RESPOSTAS DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DURANTE A RECUPERAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO EM CANA-DE-AÇÚCAR TRATADA COM ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

RESUMO

A falta de água é o principal fator limitante para a produção de cana-de-açúcar que, por sua vez, pode ser aumentada com a inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal e substâncias húmicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações no perfil metabólico e na atividade de enzimas antioxidantes em cana-de-açúcar tratadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e ácidos húmicos (AH) durante o período de reidratação das plantas após 21 dias de estresse hídrico implementado pela suspensão do suprimento de água em casa de vegetação. Cinco dias após a retomada da irrigação foi medida a atividade de enzimas antioxidantes nas folhas e raízes e avaliada as possíveis mudanças no perfil metabólico por RMN em extratos obtidos das folhas. Também foram realizadas medidas da fotossíntese líquida, transpiração e abertura estomática. O crescimento das plantas foi maior nos tratamentos AH e BPCV em relação ao controle. A atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (AXP) permaneceu elevada após a reidratação apenas no tratamento com AH. As plantas tratadas com AH e AH+BPCV tiveram a taxa de fotossíntese líquida, condutância estomática e transpiração aumentadas em relação às plantas inoculadas com BPCV. As plantas tratadas com BPCV

apresentaram resistência à seca devido ao mecanismo chamado “*delayed stress onset*” na qual a preservação da água nos tecidos é favorecida. A maior preservação da água em plantas tratadas com BPCV foi corroborada pelo maior conteúdo relativo de água (RWC) em relação ao controle encontrado no final do período de seca. O ajustamento osmótico foi o mecanismo de resistência encontrado nos outros tratamentos (AH, AH+BPCV) indicado por um novo padrão de resposta metabólica após a reidratação incluindo o aumento geral de carboidratos e proteínas. Foram encontradas mudanças metabólicas específicas induzidas por AH, tais como, aumento de compostos aromáticos enquanto que plantas tratadas com BPCV exibiram maior conteúdo de ácidos graxos e outras espécies alifáticas de H. A recuperação do estresse hídrico em plantas tratadas com AH envolveu a atividade de enzimas antioxidantes e ajustamento osmótico enquanto que BPCV além do ajustamento osmótico induziu a maior preservação do potencial de água na folha pelo fechamento mais eficiente dos estômatos resultando na preservação da água.

ABSTRACT

Water deficit is the major yield-limiting factor for sugarcane Crop production that can be enhanced by inoculating with plant growth promoting bacteria combined with humic substances. The aim of this work was to examine changes to the metabolic profile and antioxidant enzyme activity of sugarcane treated with plant growth promoting bacteria (PGPB) and humic acids (HA) after drought and then rehydration. The drought was imposed by withholding irrigation for 21 days thereby measuring enzyme activity, metabolic profile and photosynthetic rate one week after rehydration. Growth of plants treated with HA, PGPB and with both treatments combined (PGPB+HA) was higher than control plants. The antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activities remained higher after rehydration only in plants treated with HA. Plants treated with HA and PGPB+HA exhibited increased transpiration, stomatal conductance and net photosynthesis than plants treated with PGPB. The PGPB-treated plants exhibited drought resistance that resembled “delayed stress onset”, which is a new term for preserving water in the plants tissues. Water preservation in plants treated with PGPB was corroborated by higher relative water content (RWC) than control plants at the end of the drought period. Plants treated with HA+PGPB exhibited the highest water potential after rehydration and high RWC. Osmotic adjustment in the other treatments (control, HA and PGPB) was indicated by a new pattern of metabolic response after rehydration, including generally enhanced carbohydrates and proteins and specific changes induced by HA-enhancing aromatic compounds, whereas PGPB exhibited enhanced fatty acids and other aliphatic H species. HA assist with drought stress recovery by inducing antioxidant enzyme activity whereas PGPB induced preservation of leaf water potential and RWC by closing stomata efficiently, resulting in plant water preservation.

1.INTRODUÇÃO

A produção de cana-de-açúcar continua crescendo em função da demanda de álcool e açúcar. O aquecimento global e as mudanças no padrão de precipitação têm aumentado o número de eventos relacionados à seca afetando seriamente a produção (Clair & Lynch, 2010) uma vez que o principal fator limitante da produção em cana-de-açúcar é a falta de água (Azevedo & Lea, 2011). A agricultura em áreas sem ou com pouca irrigação deve ser praticada com economia e uso eficiente desse recurso (Medici et al., 2014) requerendo, portanto, plantas mais adaptadas.

O estudo da adaptação das plantas aos estresses abióticos especialmente o hídrico é fundamental para manutenção de níveis atuais de produção. Em resposta ao estresse hídrico alguns processos bioquímicos e fisiológicos são induzidos ou acelerados nas plantas, tais como, a acumulação de solutos compatíveis e ativação de uma série de enzimas antioxidantes (Hoekstra et al., 2001; Ratnayaka e Molin, 2003). A seca induz a manifestação do estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de resposta são concomitantemente induzidos (Breusegem *et al.*, 1998). As EROs atacam lipídios, proteínas e ácidos nucleicos resultando, respectivamente, na peroxidação de lipídios, desnaturação de proteínas e mutação no DNA (Yu e Rengel, 1999). Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) são utilizadas para minimizar a concentração de superóxido e peróxido de hidrogênio (Zakikhani *et al.*, 2012). Essas enzimas são induzidas por diferentes tipos de estresse além do estresse hídrico (Gratão et al. 2005; Dourato et al., 2013; 2014; Nogueirol et al., 2015). A prolina é considerada um composto osmoprotetor e atua como tampão de potencial redox no citoplasma, sendo capaz de prevenir alterações nas membranas celulares (Matysik *et al.*, 2002). A peroxidação de lipídios e a rápida acumulação de prolina são bons indicadores da sensibilidade ao estresse hídrico em cana-de-açúcar (Cia *et al.*, 2012)

A análise do perfil metabólico das plantas estressadas permite a identificação dos metabólitos envolvidos nas vias de resposta e adaptação ao

estresse (Shulaev et al., 2008; Ahuja et al., 2010). A ressonância magnética nuclear é uma das técnicas mais utilizadas na análise do perfil metabólico dado a sua robustez, rapidez na aquisição de dados, alta resolução e escasso preparo prévio das amostras. Um novo padrão de resposta metabólica foi encontrado em milho submetido aos estresses hídrico e salino (Sun et al., 2015). Anteriormente foi verificada a acumulação ativa de solutos em resposta a seca resultando na diminuição do potencial osmótico e na manutenção do turgor celular várias horas após a reidratação (Moore et al. 2009). Aminoácidos e açúcares são os principais compostos produzidos quando ocorre a reidratação após um período de seca.

A cana-de-açúcar hospeda uma comunidade de bactérias endofíticas benéficas ao seu crescimento e alguns desses microrganismos têm a capacidade de reduzir o nitrogênio atmosférico (N₂) e produzir amônia (NH₃) contribuindo para o atendimento da demanda de nitrogênio das plantas (James e Olivares, 1998). Entre as espécies recomendadas como inoculantes para cana-de-açúcar no Brasil estão as bactérias diazotróficas endofíticas *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Oliveira et al., 2006). Estirpes selecionadas dessas espécies são multifuncionais e podem, além da fixação biológica de N₂, aumentar a disponibilidade de nutrientes encontrados em formas insolúveis em água, produzir reguladores de crescimento e compostos análogos para modular o crescimento e o desenvolvimento das plantas e aumentar processos fisiológicos e metabólicos em diferentes condições ambientais (Monteiro et al., 2011; Beneduzi et al., 2013).

É bem conhecido que compostos similares aos hormônios vegetais são produzidos por bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) desempenhando papel chave na aliviação dos efeitos da seca (Döbbelaere et al., 1999; Mayak et al., 2004; Cohen et al., 2008; Marulanda et al., 2009; Arzanesh et al., 2011; Porcel et al., 2014). Esses efeitos têm sido atribuídos à redução na produção endógena de etileno pela enzima *1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase* típica de bactérias e pela manutenção de níveis normais de ácido abscísico nos tecidos vegetais.

Os ácidos húmicos (AH) são constituídos pela reunião de moléculas orgânicas oriundas principalmente da decomposição microbiana de tecidos de

plantas e produtos de ressíntese (Orsi, 2014). Os AH afetam a regulação hormonal das plantas e as suas vias de crescimento (Trevisan *et al.*, 2011; Mora *et al.*, 2012). O seu uso direto como promotores do crescimento vegetal tem crescido na agricultura tropical. Além do efeito de promoção do crescimento tem sido observado que as respostas das plantas a aplicação de AH aumentam em ambientes estressados. Os AH contribuem para a defesa das plantas pela mudança na rota metabólica do ácido chiquímico proporcionando aumento no teor de compostos fenólicos totais (Schiavon *et al.*, 2010). Além disso, sob estresse hídrico os AH mantiveram a atividade da enzima peroxidase baixa não pela mudança nos níveis de ácido abscísico, mas pelo efeito de proteção através de uma via independente (García *et al.*, 2014). A influência dos AH na atividade da catalase e na atenuação dos danos promovidos pelas EROS (Cordeiro *et al.*, 2011) sugere um papel ativo dessas substâncias na proteção contra o estresse hídrico.

A combinação da aplicação de BPCV e AH aumentou a produção de diferentes culturas especialmente em solos de baixa fertilidade natural (Canellas *et al.*, 2013; Canellas e Olivares, 2014; Olivares *et al.*, 2015) ou déficit hídrico (Canellas *et al.*, 2015). O uso de uma suspensão de *H. seropedicae* junto com substâncias húmicas solúveis resultou no aumento da colonização epifítica e endofítica dos tecidos de milho (Canellas *et al.*, 2013). Nesse caso a ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática aumentou a emergência das raízes laterais, a área radicular superficial e o volume de solo explorado, particularmente importante sob condições de estresse hídrico. Entretanto, o efeito das BPCV e AH na recuperação do estresse hídrico ainda foi pouco estudado.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de BPCV e AH na recuperação do estresse hídrico em cana-de-açúcar. Foi monitorada a atividade de enzimas antioxidantes, o conteúdo relativo de água e o potencial hídrico das folhas, além de possíveis mudanças no perfil metabólico em extratos foliares com uso da espectroscopia de RMN de ¹H.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e ácidos húmicos

Herbaspirillum seropedicae estirpe HRC54 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5 foram isoladas de cana-de-açúcar (Olivares *et al.*, 1996). As bactérias foram crescidas separadamente em 5 mL de meio líquido Dygs a 30°C durante 36 horas. Composição do meio Dygs em g L⁻¹: 2,0g L⁻¹glicose; 2,0 g L⁻¹ ácido málico; 1,5 g L⁻¹ peptona; 2,0 g L⁻¹ extrato de levedura; 0,5 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 1,5 g L⁻¹ ácido glutâmico-L; pH 6,0. Uma alíquota de 20 µL de cada espécie de bactéria foi inoculada em 200 mL de meio Dygs nas mesmas condições de crescimento em um *shaker* durante 48 horas com 140 rpm. Em seguida, a biomassa bacteriana foi centrifugada a 2000 g por 10 minutos, ressuspendida em 10 mL de água ultrapura e a concentração ajustada a 10⁹ células mL⁻¹ com leitura da absorbância em 496 nm.

Os AH foram extraídos de 10 g de vermicomposto produzidos com torta de filtro com 100 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ sob atmosfera de N₂. O procedimento de extração foi repetido até a obtenção de um sobrenadante incolor. Os extratos alcalinos solúveis foram centrifugados a 5000 g por 15 minutos. Após a reunião dos sobrenadantes foi realizada a acidificação do extrato alcalino até pH 2,0 com HCl 6 mol L⁻¹. O extrato foi mantido em geladeira a 8°C por cerca de 12 horas (*overnight*). Os AH precipitados foram separados por centrifugação. A purificação foi realizada pelo tratamento com a mistura (1:10, v/v) de HF (0,3 mol L⁻¹) e HCl (0,1 mol L⁻¹). Em seguida os AH foram centrifugados a 4000 g por 15 minutos e lavados repetidamente com água até teste negativo contra Cl⁻ usando-se AgNO₃. Em seguida o material húmico foi acondicionado em membrana de diálise com tamanho de exclusão de 1000 Da e colocados em água destilada. A água de diálise foi trocada três vezes por dia até a estabilização da condutividade elétrica. Após a diálise, os AH foram secos por liofilização, homogeneizados em mortar e pistilo de ágata e conservados em frascos de vidro dentro do dissecador.

O inoculante foi preparado com a mistura de volumes iguais da suspensão de *H. seropedicae* e *G. diazotrophicus* até volume final de 4 L. Esse volume foi adicionado a 16 L de AH previamente preparados na concentração de 50 mg de C L⁻¹ e pH 7,00 ± 0,1. A concentração bacteriana final foi de 2 x 10⁸ células mL⁻¹.

2.2 Experimento em casa de vegetação

A camada superficial (0-20 cm) de um Argissolo Amarelo coeso típico foi coletada na fazenda experimental da UENF localizada no Colégio Agrícola Antonio Sarlo em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (21°45'S e 41°20'W). O solo foi seco ao ar e peneirado (2 mm) antes da análise de rotina realizada em laboratório independente (UFRRJ, Campus Leonel Miranda) de acordo com a metodologia recomendada pela Embrapa.

Foram usadas mudas micropropagadas de cana-de-açúcar variedade SP 70-1143 em função da recomendação de uso em solos de baixa fertilidade natural uma vez que Urquiaga et al. (1992) demonstraram a elevada capacidade de fixação biológica de nitrogênio nessa variedade. Imediatamente antes do transplante em vasos de 9 kg de solo (uma planta por vaso e quatro vasos por tratamento) foram aplicados o equivalente a 80 kg ha⁻¹ de P₂O₅ (fosfato de potássio dibásico), 30 kg ha⁻¹ de K₂O (cloreto de potássio PA) e 2000 kg ha⁻¹ de carbonato de cálcio (PA). Os reagentes foram fornecidos pela Vetec. Não foi aplicada nenhuma forma de adubação nitrogenada. Uma semana após o transplante foram aplicados os seguintes tratamentos: 400 mL de água (controle), 400 mL de AH, 400 mL de suspensão bacteriana e 400 mL da mistura AH+BPCV por vaso.

Durante noventa dias a umidade do solo foi mantida próxima da capacidade de campo (24% de umidade) determinada pela curva de retenção de água realizada previamente pelo método de van Genuchten (1980). O déficit hídrico foi imposto com a suspensão da irrigação durante 21 dias. Quando a umidade do solo ficou próxima do ponto de murcha permanente (13% de

umidade) a irrigação foi retomada e a umidade mantida na capacidade de campo por cinco dias. Após esse período as plantas foram coletadas.

Foram usadas quatro plantas por tratamento para determinar a massa seca, o conteúdo de nitrogênio, a atividade enzimática, o estado hídrico das folhas, a fotossíntese líquida, a taxa de transpiração, a condutância estomática e o perfil metabólico das folhas.

2.3 Conteúdo de N e atividade de enzimas antioxidantes

O conteúdo de nitrogênio foi determinado pelo método da combustão seca em analisador elementar Perkin Elmer modelo 2400 (Norwalk, CT, USA) nas folhas e raízes.

A atividade das enzimas antioxidantes foi determinada em extratos foliares obtidos a 4°C. Foram usados 1-2 g massa fresca homogeneizada em 10 mL de EDTA (100 mM), DDT (3 mM) e PVP a 4% (w/v). O homogenato foi filtrado em três camadas de gaze e centrifugado a 17000 g por 30 min. O sobrenadante foi recolhido e alíquotas foram conservadas a - 80° C até a análise da atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e aspartato peroxidase (AXP). A atividade da CAT foi determinada como descrita por Kraus *et al.* (1995). O ensaio foi realizado a 25°C em meio de reação contendo 1 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,5) e 2,5 µL H₂O₂ (solução a 30%) preparada imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada com a adição de 15 µL do extrato da folha, a atividade avaliada pela degradação do H₂O₂ e estimada pela diminuição da absorbância em 240 nm durante 2 minutos em comparação com a prova em branco sem adição de H₂O₂. A atividade da SOD foi medida espectroscopicamente a 25°C pela redução do citocromo C em 55 nm como descrito por Steel e Nair (1995). O meio de reação foi composto pelo tampão fosfato 100 mM (pH 7,8) contendo xantina (0,5 mM dissolvido em NaOH) e citocromo C 0,1 mM. O ensaio controle foi iniciado pela adição de 0,04 unidades de xantina oxidase (Sigma Aldrich do Brasil Ltda) e a taxa da redução do citocromo C foi monitorada a 550 nm por 1 min. A atividade da SOD foi medida pela inibição da taxa da redução do citocromo pela adição de 10 a 50 µL do extrato das plantas. Uma unidade total da atividade da

SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de redução do citocromo C em 50%.

2.4 Conteúdo relativo de água (RWC) e potencial de água na folha (Ψ_w)

O RWC foi determinado de acordo com o procedimento descrito por Medici et al. (2003). Dois segmentos foliares (2 cm de comprimento por 1 cm de largura) foram coletados por planta e imediatamente colocados em isopor com gelo. Depois de 2 horas a massa fresca dos segmentos foi medida. A massa turgida foi determinada depois da reidratação em água destilada durante 24h a 10° C. A massa seca foi determinada com a secagem em estufa de ar forçado durante 48 h a 80°C. O conteúdo relativo de água foi determinado pela seguinte equação: $RWC = [(massa\ fresca - massa\ seca) / (massa\ turgida - massa\ seca)] \times 100$. O RWC foi determinado antes da reidratação e após cinco dias da retomada da irrigação.

O Ψ_w foi determinado com psicrômetro modelo PSYPRO (Wescor, Logan, USA) com câmara modelo C-52 (Wescor, Logan, USA) antes do amanhecer entre as 4:30 e 6:00 horas em um dia sem nuvem. A fotossíntese líquida ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a condutância estomática ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram determinadas em analisador automático LI-6200 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). A umidade do solo foi continuamente monitorada durante o experimento usando o medidor automático HydroFarm modelo HFM2010 (Falker, Porto Alegre, Brasil).

2.5 Preparação das amostras e análise de RMN ^1H

Folhas frescas (1 g por planta, n=3) foram maceradas em N_2 líquido e extraídas com 20 mL de uma mistura de metanol:água (80:20, v:v) por 30 minutos em banho ultrassônico a 25°C. O extrato foi rapidamente filtrado em filtro de celulose (0,45 μm) e o solvente removido a vácuo e baixa temperatura (Genevac Rocket, NY, EUA). Para a análise de RMN ^1H 50 mg do extrato foi dissolvido em 700 μL DMSO-D6. Os espectros foram obtidos no equipamento Bruker Avance

DRX 500 (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany) operando em 500,13 MHz por ^1H equipado com probe inverso de 5-mm. Para cada amostra foram obtidos 365 *scans* (FIDs) nas seguintes condições: 64k *data points*, pulso de 90° com 8.5 μs , largura espectral de 4401 Hz, 7.4 s de tempo de aquisição e 1.0 s de tempo de relaxação. No processamento dos espectros foram utilizados 64k pontos e multiplicação exponencial. O tetrametil silano (TMS) foi usado como referência a 0.0 ppm. Os espectros foram exportados na extensão ASCII e processados no ACD/NMR Processor Academic Editor onde foram aplicados a Transformada de Fourier, o ajuste de fase e a correção de linha base. Os espectros foram submetidos à análise de componentes principais usando o programa Unscrambler X 10.2 (Camo Inc., Oslo, Norway).

2.6 Estatística

O experimento foi conduzido em blocos casualizados com quatro repetições e quatro tratamentos (controle, AH, BPCV, AH+BPCV). As variáveis foram analisadas pelo teste F e quando necessário foi aplicado o teste da menor diferença significativa (LSD) a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa computacional SAEG da Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS

3.1 Biomassa e conteúdo de N

As plantas tratadas com BPCV, AH e sua combinação apresentaram maior massa seca de folhas e raízes em comparação ao controle (Fig 1AB). A massa seca da parte aérea foi cerca de 50% maior no tratamento com BPCV e AH e de 75% maior no tratamento em conjunto (AH+BPCV) em relação ao controle. Em comparação com o controle a massa seca das raízes foi 173% maior nas plantas tratadas com AH e 70% nas tratadas com BPCV (Fig 1B). No entanto, o aumento da massa seca de raízes foi cerca de 200% maior no tratamento em conjunto em comparação com o controle. A promoção do crescimento da cana-de-açúcar foi acompanhada pelo aumento do conteúdo de N foliar que foi 35% maior nas plantas tratadas com AH, 55% nas tratadas com BPCV e 77% maior no tratamento em conjunto (AH+BPCV) em relação ao controle.

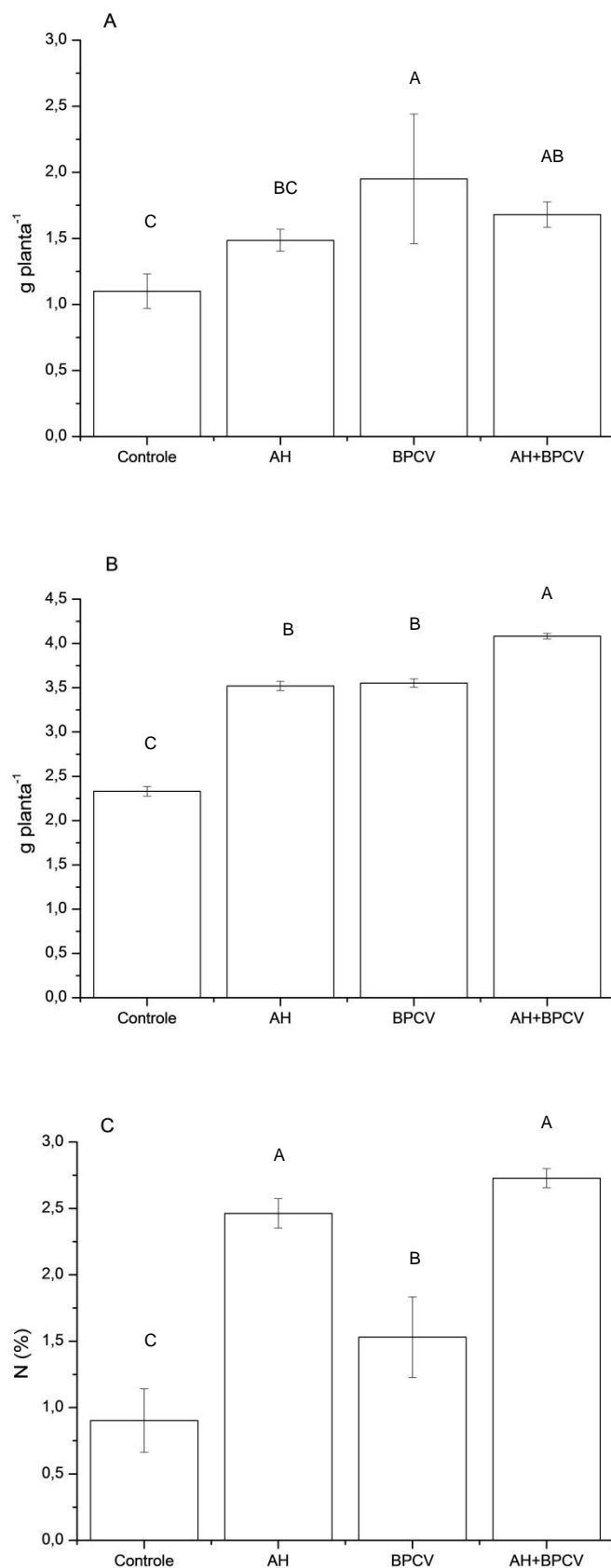


Figura 1. Massa seca da parte aérea (A) e raiz (B), conteúdo total de N nas folhas (C) em cana-de-açúcar tratada com ácidos húmicos (AH), bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), a combinação de AH+BPCV e controle (C).

3.2 Conteúdo relativo de água (RWC) e potencial hídrico das folhas (Ψ_w)

Durante o estresse hídrico o RWC foi cerca de 40% maior nas plantas tratadas com BPCV e AH+BPCV em relação ao controle (Fig 2A). Após cinco dias de hidratação todas as plantas apresentaram RWC semelhante, mas valores diferentes de potencial hídrico (Ψ_w). Comparado ao controle as folhas tratadas com BPCV tiveram cerca de 10% mais água após o período de reidratação enquanto que no tratamento com AH+BPCV o aumento no Ψ_w foi de 85% em comparação com o controle. As plantas tratadas com AH tiveram o Ψ_w mais afetado (Figura 2A).

3.3 Atividade fotossintética

A taxa de transpiração foliar foi maior nos tratamentos AH e AH+BPCV e diminuiu nas plantas inoculadas sem AH (Fig 3B). Comportamento bastante parecido foi observado na condutância estomática (Fig 3C). Conseqüentemente a taxa de fotossíntese líquida foi aumentada significativamente nos tratamentos AH e AH+BPCV em comparação com o controle (Fig 3A).

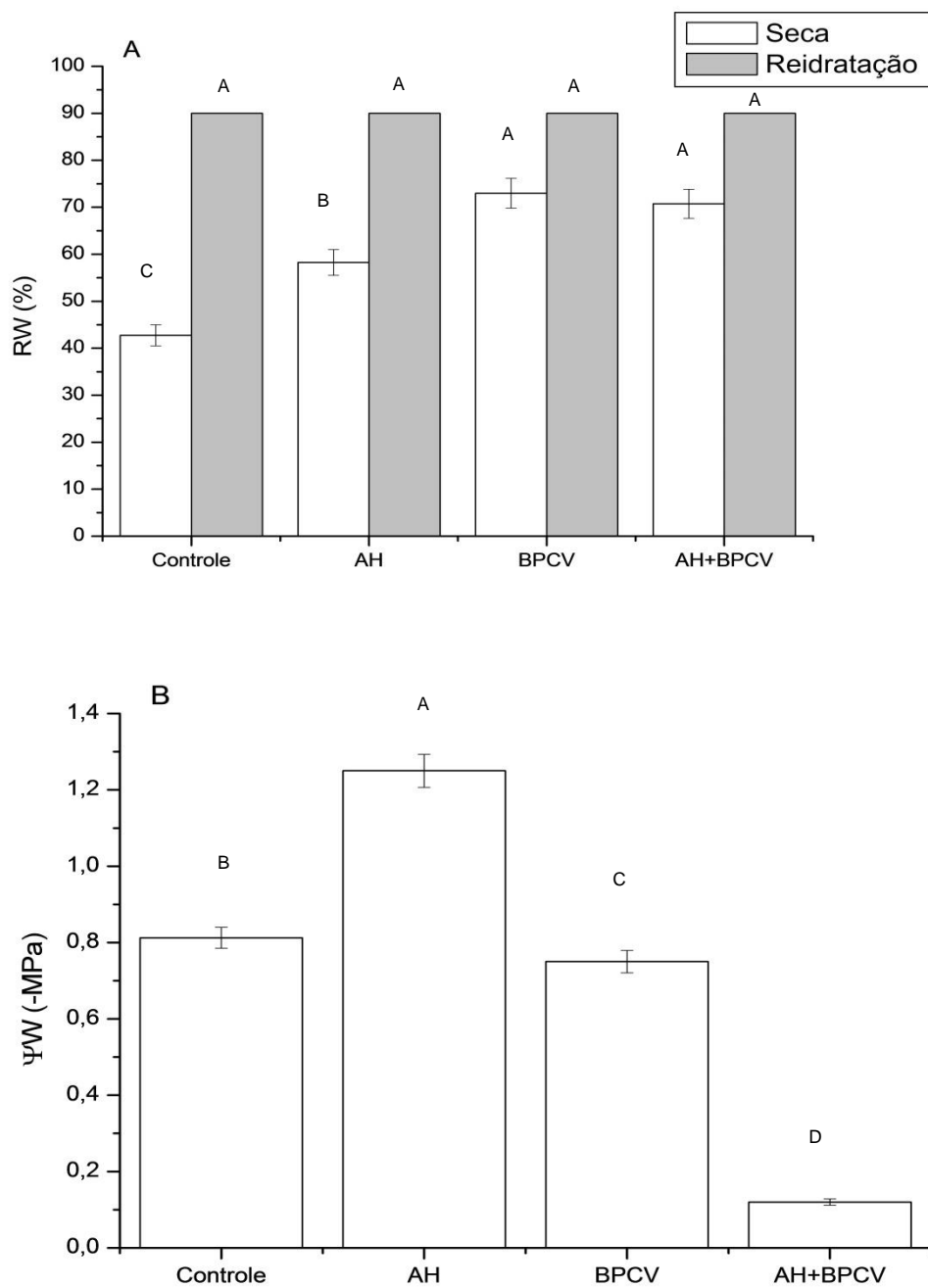


Figura 2. Conteúdo relativo de água - RWC na folha durante a seca e depois de uma semana de reidratação (A), potencial hídrico Ψ_w (B) da folha depois de uma semana de reidratação.

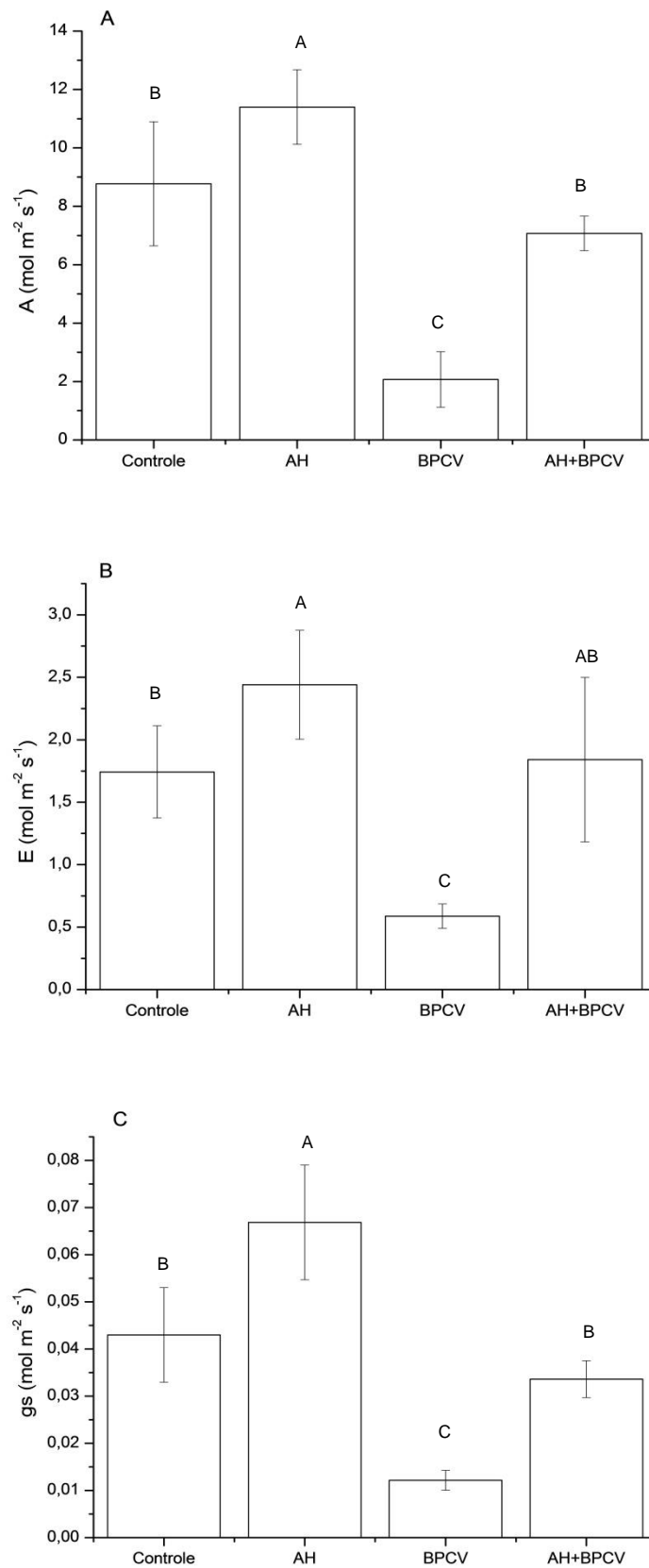


Figura 3. Taxa fotossintética (A), taxa de transpiração (B) e condutância estomática (C) de cana-de-açúcar tratada com ácidos húmicos (AH), bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), a combinação de AH+BPCV e controle (C).

3.4 Atividade das enzimas antioxidantes

Depois da reidratação, a atividade das enzimas CAT, SOD e APX permaneceu mais alta nos tecidos de folhas e raízes das plantas tratadas com AH em comparação com as plantas controle (Fig 4). Em relação ao controle a atividade da SOD foi cerca de 50% maior em ambos os extratos (folhas e raízes) enquanto que a CAT e APX tiveram sua atividade mais aumentada nas raízes do que nas folhas nas plantas tratadas com AH. Nos outros tratamentos a atividade das enzimas antioxidantes foi baixa semelhante ao nível encontrado nos extratos controle.

3.5 Perfil metabólico

Os espectros dos extratos foliares são mostrados na Figura 5. Os tratamentos induziram mudanças no perfil metabólico após a recuperação do estresse hídrico. Foi notável a presença de açúcares com sinal típico em 3.88 ppm, presente em elevada intensidade somente no extrato controle. Além disso, também foi encontrado no extrato controle um dubleto intenso em 5.187 e 5.180 ppm típico do deslocamento químico da prolina observado em experimentos de RMN. Os perfis metabólicos dos extratos AH e BPCV+AH mudaram de forma semelhante com aumento relativo da intensidade de sinais em 6.12, 4.23, 3.83, 3.02, 2.053 e 2.91 ppm e do multipletto com centro em 0.89 ppm. O perfil metabólico do extrato obtido das folhas de cana-de-açúcar tratadas com BPCV foi caracterizado por um sinal intenso em 1.25 ppm e pela região de intensa absorção entre 0.81 e 0.90 ppm. Essas diferenças podem ser visualizadas pela análise de componentes principais (Fig. 6). As duas primeiras componentes (CP1 e CP2) representaram 84% da variação dos espectros. O gráfico dos scores evidenciou a semelhança entre os tratamentos AH e AH+BPCV e a diferença destes dois em relação aos outros tratamentos. O gráfico dos loadings identificou quais foram os sinais do espectro responsáveis por diferenciar os tratamentos.

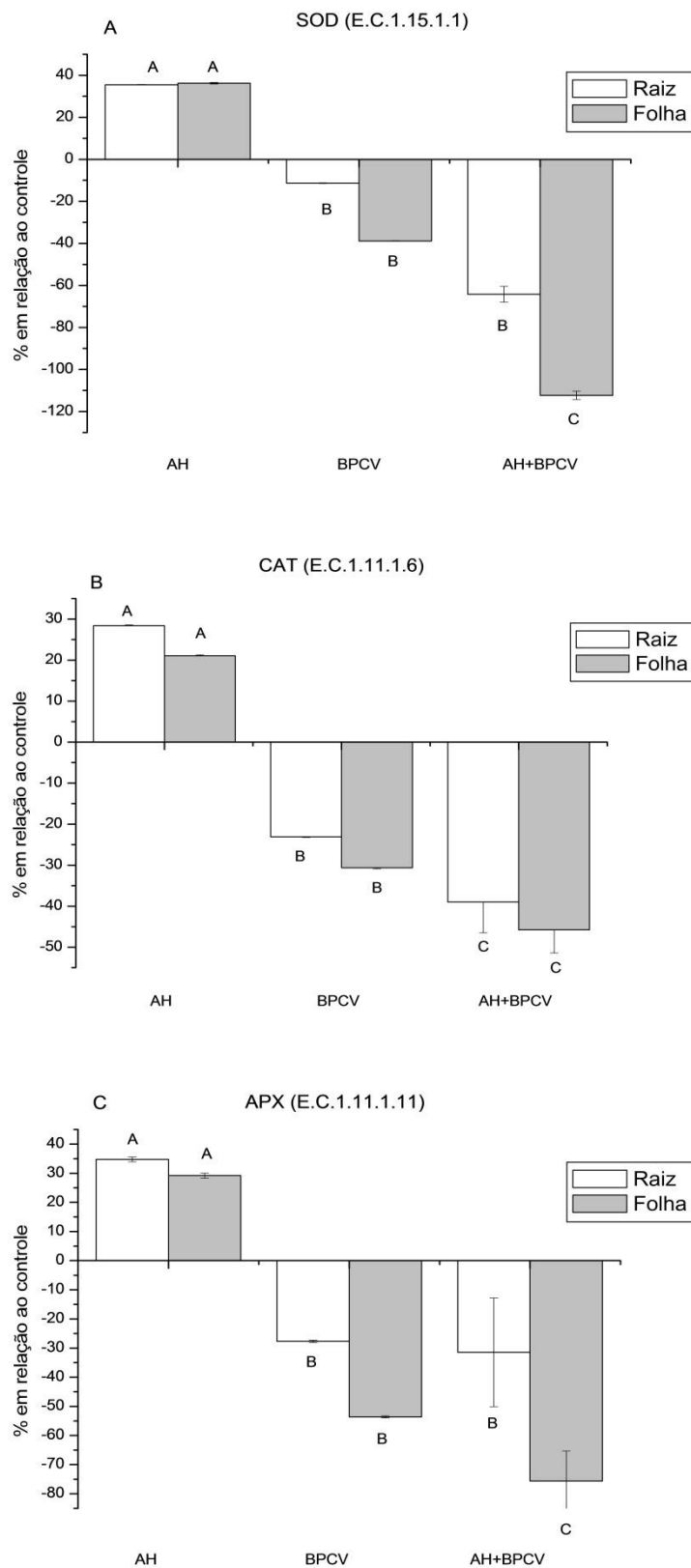


Figura 4. Atividade de enzimas antioxidantes (a) dismutase peroxidase, (B) catalase e (C) ascorbate peroxidase em raiz e folha de cana-de-açúcar tratada com ácidos húmicos (AH), bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), a combinação de AH+BPCV e controle (C).

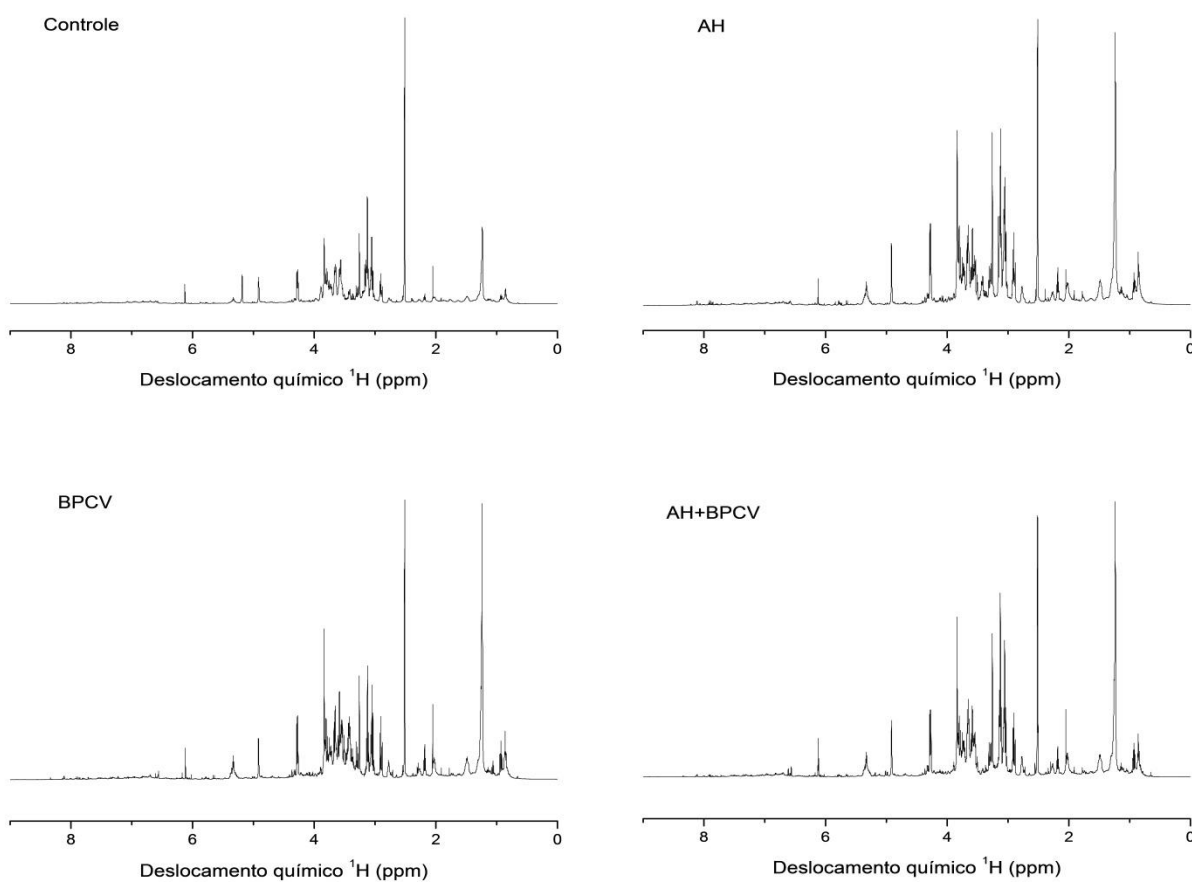


Figura 5. Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) de extratos hidrometanólicos de folha de cana-de-açúcar tratada com ácidos húmicos (AH), bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), a combinação de AH+BPCV e controle (C).

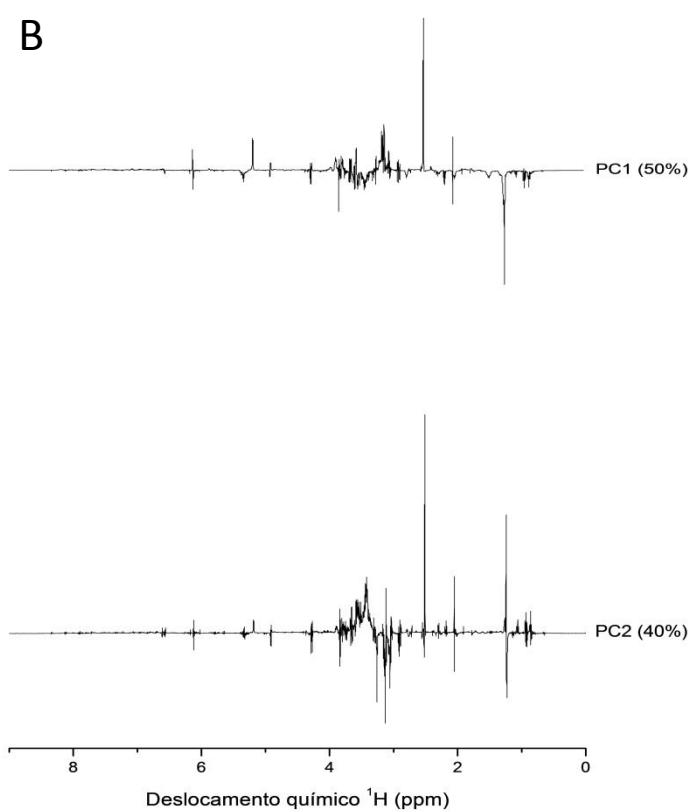
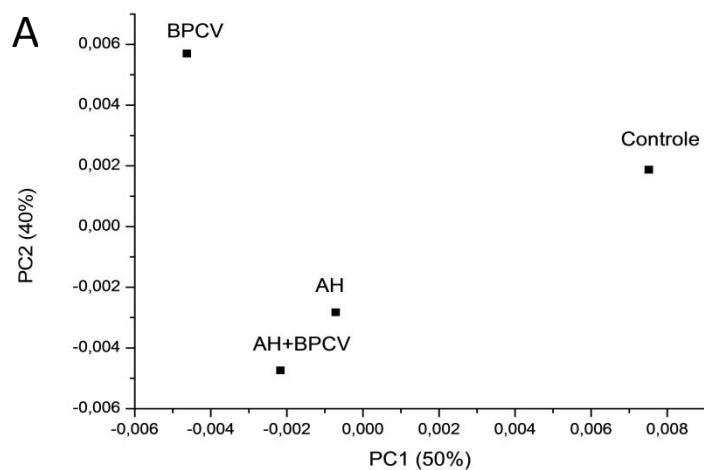


Figura 6. Análise de componentes principais - PCA. Scores (A) e loadings (B) dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) de extratos hidrometanólicos de folha de cana-de-açúcar tratada com ácidos húmicos (AH), bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), a combinação de AH+BPCV e controle (C).

4. DISCUSSÃO

O uso de AH e BPCV pode influenciar significativamente a produção (Canellas *et al.*, 2013; Canellas & Olivares, 2014; Olivares *et al.*, 2015) especialmente em solos de baixa fertilidade natural e em condições de estresse hídrico (Canellas *et al.*, 2015). No entanto, os efeitos dos AH e das BPCV sobre a recuperação do estresse hídrico são pouco estudados. Os efeitos da seca e do estresse oxidativo são interligados e podem mostrar respostas similares incluindo as enzimáticas e as não enzimáticas, tais como, acumulação de solutos compatíveis (Cia *et al.*, 2012). O foco desse estudo foi analisar a recuperação do estresse hídrico em plantas tratadas com AH, BPCV e AH+BPCV. O RCW foi abaixo de 70% indicando que estresse hídrico imposto nas plantas foi severo (Fig 2). Após a reidratação, quando o experimento foi avaliado, o RWC permaneceu acima de 95%. A aplicação de AH e de BPCV promoveu o crescimento vegetal quando comparado ao controle, produzindo plantas com sistema radicular mais desenvolvido e, portanto, mais resistentes ao estresse hídrico. No entanto, as outras variáveis analisadas responderam de forma bastante diferentes de acordo com os tratamentos implementados. Por exemplo, os AH induziram a atividade de todas as enzimas antioxidantes medidas (SOD, CAT e APX) tanto nas folhas como nas raízes, enquanto que no tratamento com as BPCV foi observada a diminuição da atividade destas enzimas tanto nas folhas como nas raízes em relação ao controle.

As alterações na atividade das enzimas antioxidantes nas plantas tratadas com AH representam uma mudança bioquímica importante. No entanto, é possível que nos tratamentos nos quais a atividade enzimática foi mantida em nível mais baixo não possa ocorrer o aumento da atividade de uma isoenzima específica tal como observado anteriormente por Cia *et al.* (2012). Além disso, estudos posteriores usando sistemas de eletroforese nativa devem ser realizados para entender melhor as respostas das enzimas antioxidantes em plantas tratadas tanto com AH (aumento da atividade) como com BPCV (diminuição da atividade) submetidas a estresse hídrico.

As respostas de plantas inoculadas com BPCV em condições de estresse hídrico podem ser controladas por hormônios, principalmente o ácido abscísico, com diminuição da produção de etileno em decorrência da atividade da enzima bacteriana ACC-deaminase e manutenção de níveis normais de etileno nos tecidos. (Porcel *et al.*, 2014). Nesse trabalho não foi realizada a medida da atividade da ACC-deaminase nas plantas tratadas com BPCV, mas é possível inferir sobre o mecanismo envolvido na recuperação do estresse hídrico. A recuperação do estresse nessas plantas foi menos dependente da atividade das enzimas antioxidantes do que observada nas plantas tratadas com AH. A presença dos genes que codificam a ACC-deaminase no genoma do *H. seropedicae* e da *G. diazotrophicus* (Bertalan *et al.*, 2009) e outros estudos podem sustentar essa hipótese (Mayak *et al.*, 2004).

O menor Ψ_w encontrado no tratamento AH em comparação com os demais indica que o ajustamento osmótico foi acompanhado de outro mecanismo na adaptação à seca (Neumann, 1995). Foi observado um aumento significativo na taxa fotossintética de plantas tratadas com AH como consequência da taxa de transpiração mais elevada associada à maior abertura estomática (Fig 3). Esse fenômeno já foi previamente observado em milho sem estresse hídrico (Canellas *et al.*, 2013). Russel *et al.* (2006) atribuíram essa taxa mais elevada ao aumento da abertura estomática promovido pela atividade da H^+ -ATPase induzida pelas SH com atividade do tipo auxínica. Por outro lado, as plantas tratadas com AH+BPCV fecharam mais eficientemente seus estômatos e preservaram um alto Ψ_w que parece ser típico de um novo mecanismo de resistência ao estresse hídrico proposto por Lawlor (2013) e definido como “*delayed stress onset*”.

Mudanças genéricas no perfil metabólico dos extratos foliares foram observadas por RMN 1H . Já é bem conhecido que, sob estresse hídrico, as plantas aumentam a síntese de compostos orgânicos visando proteção osmótica. O composto mais estudado é a prolina, que foi associada à proteção da membrana celular e ao aumento do conteúdo de água nas células (Molinari *et al.*, 2007). No entanto, em algumas variedades de cana-de-açúcar tolerantes ao estresse hídrico não foi observada acumulação de prolina (Cia *et al.*, 2012). Como alternativa ao uso de um único marcador bioquímico foi usado nesse trabalho o

perfil metabólico para avaliar possíveis mudanças no *status metabólico* após a recuperação da seca. Alterações nos espectros evidenciam o efeito do AH e da BPCV na alteração do perfil metabólico incluindo mudanças nos compostos aromáticos e no conteúdo de compostos alifáticos.

Um dos primeiros efeitos da falta de água é o aumento da concentração de compostos que pode ser facilmente observado nos espectros de RMN ^1H (Fig 6) pelo aumento do sinal absoluto obtido a partir de amostras de mesma concentração ($30 \text{ mg } 700 \mu\text{L}^{-1}$) e números de *scans*. Além disso, mudanças qualitativas incluíram aumento da concentração de compostos aromáticos, fenólicos, açúcares e espécies alifáticas especialmente ácidos graxos.

A produção de EROs causa peroxidação e di-esterificação dos lipídeos de membrana. Os AH podem proteger os lipídeos da peroxidação através da ativação do sistema enzimático de proteção antioxidativa (García *et al.* 2014), o qual permaneceu ativo mesmo após a reidratação completa dos tecidos (Fig 4). No entanto, nos tratamentos com BPCV e AH+BPCV a atividade da SOD, CAT e APX foi diminuída no período de reidratação, mas a intensidade dos sinais de H que podem ser atribuídos aos lipídeos foi significativamente maior (observar a região entre 0,8 até 1,23 ppm na Fig. 6). Vários estudos já demonstraram que o metabolismo das plantas sob estresse hídrico pode ser consequência da regulação negativa da expressão de genes envolvendo o metabolismo de carboidratos (Chaves *et al.*, 2003). O estresse hídrico afeta significativamente o conteúdo de muitos metabólitos, especialmente o aumento de aminoácidos (entre eles a prolina, β -alanina, GABA, glutamato e glicina), ácidos graxos e ácidos orgânicos (incluindo os intermediários do ciclo de Krebs), bem como açúcares e seus derivados. Os açúcares são os compostos que mais contribuem para o ajustamento osmótico (Babita *et al.*, 2010) e a região atribuída a esses compostos foi a mais afetada pelos tratamentos (Fig. 6).

5.CONCLUSÃO

As plantas tratadas com AH+BPCV apresentaram maior Ψ_w e RWC depois da reidratação. O ajustamento nos outros tratamentos foi indicado pelo aparecimento de um novo perfil metabólico em comparação com o controle, como por exemplo, aumento geral de carboidratos, proteínas, compostos aromáticos induzidos por AH e aumento em ácidos graxos e outras espécies de C alifático decorrentes do tratamento com BPCV. A recuperação do estresse hídrico em plantas tratadas com AH envolveu além do ajustamento osmótico a ativação do sistema enzimático de proteção antioxidante enquanto que o tratamento com BPCV induziu a preservação do conteúdo de água nos tecidos pelo fechamento mais eficiente dos estômatos resultando na preservação de água nos tecidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja, I., de Vos, R. C., Bones, A. M., & Hall, R. D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in plant science*, 15(12), 664-674.
- Arzanesh M.H., Alikhani H.A., Khavazi K., Rahimian H.A., Miransari M. (2011) Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* spp. under drought stress. *World Journal of Microbiol Biotchechnology*, **27**, 197-205.
- Azevedo R.A., Lea P.J. (2011) Research on abiotic and biotic stress - what next? *Annals of Applied Biology*, **159**, 317–319.
- Babita M., Maheswari M., Rao L.M., Shankerb A.K., Rao G.D. (2010) Osmotic adjustment, drought tolerance and yield in castor (*Ricinus communis* L.) hybrids. *Environmental and Experimental Botany*, **69**, 243–249.
- Beneduzi A., Moreira F., Costa P.B., Vargas L.K., Lisboa B.B., Favreto R., Baldani J.I., Passaglia L.M.P. (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 63, 94-104.
- Bertalan M., Albano R., Pádua V., Rouws L., Rojas C., Hemerly A., Teixeira K., Schwab S., Araujo J., Oliveira A., França L., Magalhães V., Alquéres S., Cardoso A., Almeida W., Loureiro M.M., Nogueira E., Cidade D., Oliveira D., Simão T., Macedo J., Valadão A., Dreschsel D., Freitas F., Vidal M., Guedes H., Rodrigues E., Meneses C., Brioso P., Pozzer L., Figueiredo E., Montano H., Jadier Junior J., Souza Filho G.S., Flores V.M.Q., Ferreira B., Branco A., Gonzalez P., Guillobel H., Lemos M., Seibel L., Macedo J., Alves-Ferreira M.A., Sachetto-Martins G., Coelho A., Santos J.M., Amaral G., Neves A., Pacheco A.B., Carvalho D., Lery L., Bisch P., Rössle S.C., Ürményi T., Pereira A.R., Silva R., Rondinelli E., von Krüger W., Martins O., Baldani J.I., Ferreira P.C.G. (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *BMC Genomics*, **10**, 450.

- Breusegem F., van Montagu M., van Inze D., van Breusegem F., van Montagu M. (1998) Engineering stress tolerance in maize. *Outlook on Agriculture*, **27**, 115-124.
- Canellas L.P., Olivares F.L. (2014) Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, **1**, 3.
- Canellas L.P., Martínez Balmori D., Médici L.O., Aguiar N.O., Campostrini E., Rosa R.C., Façanha A., Olivares F.L. (2013) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*, **366**, 119-132.
- Canellas L.P., Olivares F.L., Okorokova-Façanha A.L., Façanha A.R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, **130**, 1951-1957.
- Canellas L.P., Silva S.F., Olk D.C., Olivares F.L. (2015) Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, **13**, 146-153.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. (2003) Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**, 239–264.
- Cia M.C., Guimarães A.C.R., Medici L.O., Chabregas S.M., Azevedo R.A. (2012) Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties *Annals of Applied Biology*, **161**, 313–324.
- Clair S.B., Lynch J.P. (2010) The opening of Pandora's Box: climate change impacts on soil fertility and crop nutrition in developing countries. *Plant and Soil*, **335**, 101-115.
- Cohen A., Bottini R., Piccoli P. (2008) *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, **54**, 97-103.

- Cordeiro F.C., Santa-Catarina C., Silveira V., Souza S.R. (2011) Humic acids effect on catalase activity and ROS generation in corn. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**, 70-74.
- Döbbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Vande Broek A., Vanderleyden J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, **212**, 153-162.
- Döbereiner J., Baldani V.L.D., Baldani J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, pp. 60.
- Dourado M.N., Lucas A., Souza L.A., Martins P.F., Peters L.P., Piotto F.A., Azevedo A.R. (2014). *Burkholderia* sp. SCMS54 triggers a global stress defense in tomato enhancing cadmium tolerance *Water Air Soil Pollution*, **225**, 2159.
- Dourado M.N., Martins P.F., Quecine M.C., Piotto F.A., Souza L.A., Franco¹ M.R., Tezotto T., Azevedo R.A. (2013) *Burkholderia* sp. SCMS54 reduces cadmium toxicity and promotes growth in tomato. *Annals of Applied Biology*, **163**, 494–507.
- Fiehn, O (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, **48**, 155–171.
- García A.C., Santos L.A., Guridi F.I., Rumjanek V.M., Castro R.N., Santos F.S., Souza L.G.A., Berbara R.L.L. (2014) Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Journal of Geochemical Exploration*, **136**, 48–54.
- Gratão P.L., Polle A., Lea P.J., Azevedo R.A. (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, **32**, 481-494.
- James E.K., Olivares F. (1998) Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic bacteria. *Critical Review Plant Science*, **17**, 77-119.

- James, E. K., & Baldani, J. I. (2012). The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. *Plant and Soil*, **356**(1-2), 1-3.
- Kraus T.E., Mckersie B.D., Fletcher R.A. (1995) Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. *Journal of Plant Physiology*, **145**, 570-576.
- Lawlor D.W. (2013) Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 695–709, 2012
- Marulanda A., Barea J-M., Azcón R. (2009) Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**, 115-124.
- Matysik J., Alia A., Bhalu B., Mohanty P. (2002) Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under water stress in plants. *Current Science*, **82**, 525-532.
- Mayak S., Tirosh T., Glick B.R. (2004) Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, **166**, 525-530.
- Medici L.O., Machado A.T., Azevedo R.A., Pimentel C. (2003) Glutamine synthetase activity, relative water content and water potential in maize submitted to drought. *Biologia Plantarum*, **47**, 301–304.
- Medici L.O., Reinert F., Carvalho D.F., Kozak M., Azevedo R.A. (2014) What about keeping plants well watered? *Environmental and Experimental Botany*, **99**, 38–42.
- Molinari H.B.C., Marur C.J., Bessalho J.C., Kobayashi A.K., Pileggi M., Pereira F.P.P., Vieira L.G.E. (2004) Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock

- Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science*, **167**, 1375–1381
- Molinari H.B.C., Marur C.J., Daros E., Campos M.K.F., Carvalho J.F.R.P., Bespalhok-Filho J.C., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E. (2007) Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.) osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, **130**, 218–229.
- Monteiro C.C., Carvalho R.F., Gratão P.L., Carvalho G., Tezotto T., Medici L.O., Peres L.E.P., Azevedo R.A. (2011) Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. *Environmental and Experimental Botany*, **71**, 306–320.
- Moore J.P., Le N.T., Brandt W.F., Driouich A., Farrant, J.M. (2009) Towards a systems based understanding of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, **14**, 110-117.
- Mora V., Baigorri R., Bacaicoa V., Zamarreño A., García-Mina J.M. (2012) The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. *Environmental Experimental Botany*, **76**, 24- 32.
- Neumann, P.M. (1995). The role of cell wall adjustment in plant resistance to water deficits. *Crop Science* **35**, 1258-1266,
- Nogueirol R.C., Monteiro F.A., Gratão P.L., Borgo L., Azevedo R.A. (2015) Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes *Environmental Monitoring and Assessment*, **187**, 73.
- Olivares F.L., Aguiar N.O., Rosa R.C.C., Canellas L.P. (2015) Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, **183**, 100–108.

- Olivares F.L., Baldani V.L.D., Reis V.M., Baldani J.I., Döbereine, J. (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, **21**, 197–200.
- Oliveira A.L.M., Canuto E.L., Urquiaga S., Reis V.M., Baldani J.I. (2006) Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and Soil*, **284**, 23–32.
- Orsi M. (2014) Molecular dynamics simulation of humic substances. *Chemical and Biological Technologies from Agriculture*, **1**, 10.
- Porcel R., Zamarreño A.M., García-Mina J.M., Aroca R. (2014) Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC Plant Biology*, **14**, 36.
- Ramos P.F.O., de Toledo I.B., Nogueira C.M., Novotny E.H., Vieira A.J.M., Azeredo R.B.V. (2009). Low field ^1H NMR relaxometry and multivariate data analysis in crude oil viscosity prediction. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **99**, 121-126.
- Rosenzweig, C., Elliott, J., Deryng, D., Ruane, A. C., Müller, C., Arneth, A., & Jones, J. W. (2014). Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(9), 3268-3273.
- Russell L., Stokes A.R., Macdonald H., Muscolo A., Nardi S. (2006) Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A2. *Plant and Soil*, **283**, 175–185.
- Schiavon M., Pizzeghello D., Muscolo A., Vaccaro S., Francioso O., Nardi S. (2010) High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology*, **36**, 662–669.

- Smith I.K., Kendall A.C., Keys A.J., Turner J.C., Lea P.J. (1985) The regulation of the biosynthesis of glutathione in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science*, **41**, 11-17.
- Steel C.C., Nair N.G. (1995). Oxidative protective mechanism of resistance to the dicarboximide fungicide iprodione in *Alternaria alternata*. - 1. *Phytopathology*, **143**, 531-535.
- Sun C., Gao X., Fu F., Zhou G., Wu X. (2015) Metabolic response of maize (*Zea mays* L.) plants to combined drought and salt stress. *Plant and Soil*, **388**, 99–117.
- Trevisan S., Botton A., Vaccaro S., Quaggiotti S., Nardi S. (2011) Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environmental and Experimental Botany*, **74**, 45-55.
- Urquiaga S., Cruz K. H. S., Boddey R. M. (1992) Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society America Journal*, **56**, 105–114.
- van Genuchten M.T.H. (1980) A close-form equation for prediction of the hydraulic conductivity of unsaturated soil. *Soil Science Society America Journal*, **44**, 892-898.
- Yu Q., Rengel Z. (1999) Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow- leafed lupins. *Plant Science*, **144**, 1-11.
- Zakikhani H., Ardakani M.R., Rejali F., Gholamhoseini M., Joghian A.K., Dolatabadian A. (2012) Influence of Diazotrophic Bacteria on Antioxidant Enzymes and Some Biochemical Characteristics of Soybean Subjected to Water Stress. *Journal of Integrative Agriculture*, **11**, 1828-1835.

RESUMO E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram inferir que o bioinoculante produzido no Núcleo de Desenvolvimento de Insumos para Agricultura à base de ácidos húmicos e bactérias promotoras do crescimento vegetal induziu, em cana-de-açúcar, alterações significativas no metabolismo primário (açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos graxos) e secundário (produtos da via do ácido chiquímico e do mevalonato). A análise metabolômica baseada no uso das técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas com analisador de tempo de voo e da ressonância magnética nuclear foi eficaz na determinação do perfil metabólico de folhas de cana-de-açúcar. A análise de componentes principais facilitou o estudo e a interpretação dos dados, uma vez que foi capaz de maximizar a variância dos compostos identificados em função dos tratamentos utilizados. Os ácidos húmicos ativam nas plantas a maquinaria responsável pelas respostas de defesa ao estresse hídrico, como por exemplo, aumento da atividade de enzimas antioxidantes e ajustamento osmótico. Enquanto que as bactérias promotoras do crescimento vegetal além do ajustamento osmótico induzem a maior preservação do potencial de água na folha pelo fechamento mais eficiente dos estômatos resultando na preservação da água. A identificação das principais vias e compostos alterados em resposta a inoculação de ácidos húmicos em conjunto com bactérias fundamentará e abrirá novas perspectivas científicas e de aperfeiçoamento tecnológico para uso de insumos biológicos na agricultura. Além de dar suporte para estudos com análise transcriptômica que estão em andamento no âmbito do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) para Fixação Biológica do Nitrogênio.

APENDICE 1

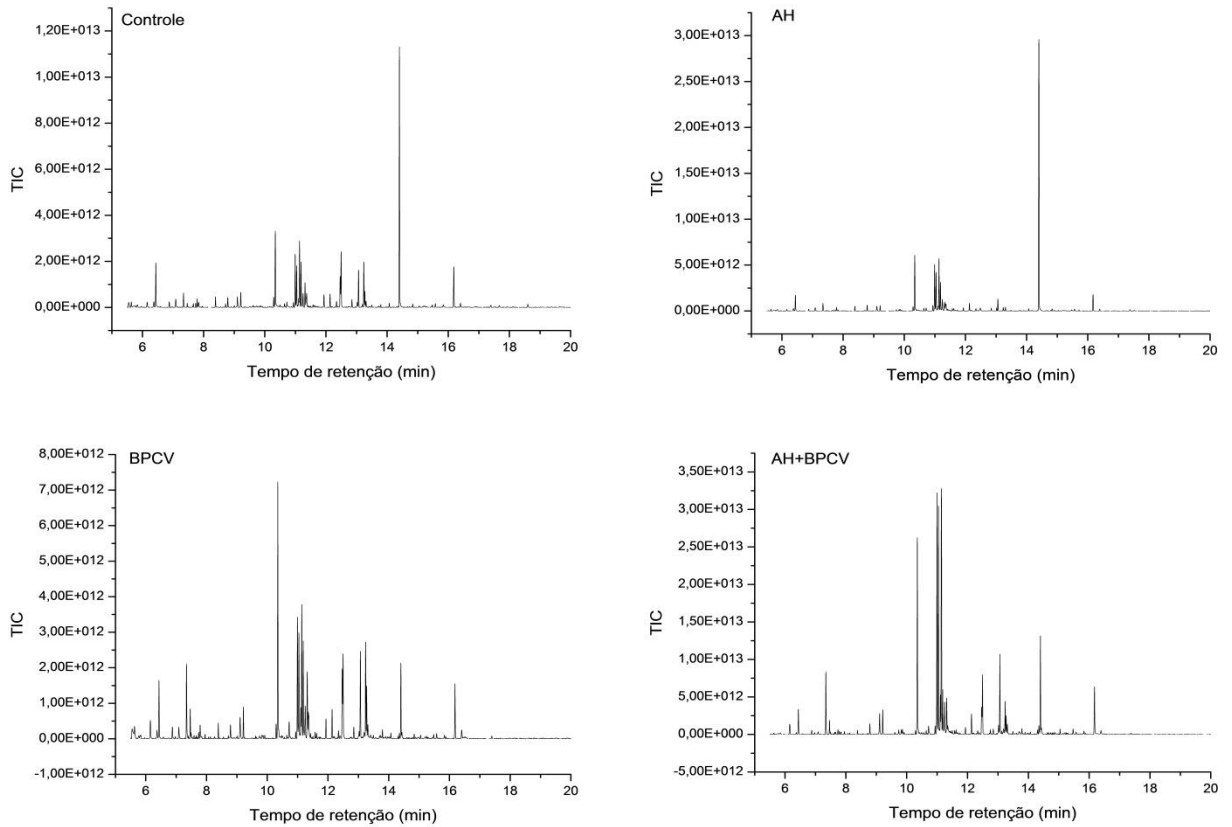


Figura 1. Cromatogramas de extratos de folha de cana-de-açúcar analisados por CG-EM-TOF. Os tratamentos foram: inoculação com *G. acetobacter* e *H. seropedicae* (BPCV) com (HA + BPCV) ou sem ácidos húmicos (AH) e controle.

APENDICE 2

Chemical	Amount (mg)	Final Concentration (ug/mL)
Methyl caprylate/octanoic (C8)	20	0.8
Methyl perlargonate/nonanoic (C9)	20	0.8
Methyl caprate/decanoic (C10)	20	0.8
Methyl laurate/dodecanoic (C12)	20	0.8
Methyl myristate/tetradecanoic (C14)	20	0.8
Methyl palmitate/hexadecanoic (C16)	20	0.8
Methyl stearate/octadecanoic (C18)	10	0.4
Methyl arachidate/icosanoic (C20)	10	0.4
Methyl behenate/docosanoic (C22)	10	0.4
Methyl tetracosanoic (C24)	10	0.4
Methyl hexacosanoic (C26)	10	0.4
Methyl octacosanoic (C28)	10	0.4
Methyl triacontanoic (C30)	10	0.4

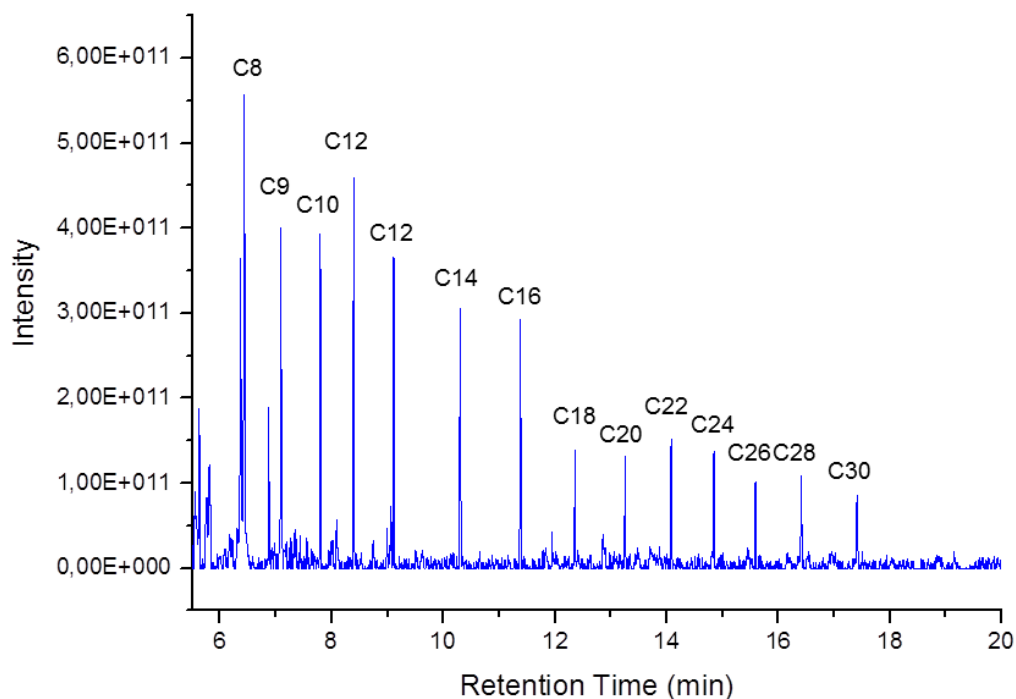


Figura 2. Cromatograma de uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos FAME (C8-C30) usados como padrão interno.