



ARTÍCULO ORIGINAL

## Humatos isolados de vermicomposto como promotores de crescimento em cultivo orgânico de alface

*Humates isolated from vermicompost as growth promoter in organic Lettuce production*

## Humatos aislados del vermicompost como el promotor de crecimiento en la producción de la Lechuga orgánica

Orlando L. Hernandez<sup>1</sup> Rafael Huelva<sup>1</sup> Fernando Guridi<sup>2</sup> Fábio L. Olivares<sup>3</sup> & Luciano P. Canellas<sup>3</sup>

**RESUMO.** O crescente mercado de produtos orgânicos tem atraído o interesse de novos produtores. Um dos principais problemas na transição de áreas de cultivo tradicionais para orgânico é a mudança no ciclo de produção de cultivares tradicionais em resposta à adaptação ao novo sistema de cultivo. Esse trabalho foi realizado a campo com o objetivo de acelerar o ciclo de cultivo de alface com aplicação foliar de substâncias húmicas. Foram avaliadas modificações nas atividades das enzimas associadas ao metabolismo de nitrogênio. Os humatos isolados (extratos alcalinos de matéria orgânica) de vermicomposto, produzido com esterco de curral (criação semi-extensiva de gado leitero), foram aplicados nas folhas nas concentrações de 1,6; 1,3 e 1,2 mmol C/L no estágio de 15 dias após o transplante a taxa de 300 L·ha<sup>-1</sup>. Foi observado uma redução de 21 dias no ciclo de produção da alface tratada com humato na concentração de 1,3 mmol C/L enquanto nas concentrações de 1,6 e 1,2 mmol C/L a redução no ciclo foi de 15 dias. Também foi observado um número maior de folhas por pés de alface com o uso dos humatos. A promoção do crescimento induzida pelos humatos foi consequência da alteração no metabolismo vegetal. O uso de humatos diminuiu o conteúdo de carboidratos totais nas folhas e promoveu aumento significativo no conteúdo de proteínas totais e nas atividades da nitrato redutase e fenilalanina amônia liase. A ativação metabólica induzida pelos humatos resultou em vantagens na produção de alface orgânica.

**Palavras-chave:** substâncias húmicas, efeitos fisiológicos, agricultura orgânica, metabolismo de nitrogênio.

**ABSTRACT.** The rising market for organic products has attracted attention of new farmers. One of the main problems related to the transition from conventional to organic production management have been the changes on production cycles of traditional cultivars in response to plant adaption to new tillage systems. This field work was conducted with the objective to evaluate the possibility to accelerate lettuce crop cycle with foliar application of humic substances associated with changes on enzymatic activity related to the nitrogen metabolism. To perform it, humates obtained from vermicompost produce with cattle manure were applied by leaf spray at 300 L·ha<sup>-1</sup> rate under 1,6;1,3 and 1,2 mmol C/L concentrations on the lettuce plantlets with x days after transplantation. It was observed that leaf spray with humate at 1,2 mmol C/L dose reduce the ontogeny cycle of lettuce production in 21 days, while both 1,6 and 1,2 mmol C/L doses had shown a reduction of 15 days over the yield cycle. Also, it was noted an increased number of leaves per plant. The plant growth promotion observed was followed by changes in plant metabolism, since humate application reduced total foliar carbohydrates content while increased protein contents, nitrate reductase and phenylalanine ammoniolyase. Such metabolic activation promoted by humates resulted in increased lettuce yields and reduced time cycle with benefits to lettuce under organic system of production.

**Keywords:** humic substances, physiological effects, organic agriculture, nitrogen metabolism.

**Recibido** 04/10/11, aprobado 21/12/12, trabajo 12/13, artículo original.

<sup>1</sup> M.Sc., Prof., Departamento de Química. Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez" UNAH. Autopista Nacional Km 231/2, Carretera a Tapaste, San José de las Lajas, Mayabeque. Cuba. E-✉: orlazaroz@isch.edu.cu

<sup>2</sup> Dr., Professor, Departamento de Química. Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana.

<sup>3</sup> Dr., Professor, Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Av. Alberto Lamego 2000, 28013-602 Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

**RESUMEN.** El creciente mercado de productos orgánicos ha atraído la atención de los nuevos agricultores. Uno de los principales problemas relacionados con la transición de convencional a la gestión de la producción orgánica ha habido cambios en los ciclos de producción de cultivos tradicionales en respuesta a plantar adaptación a nuevos sistemas de labranza. Este trabajo de campo se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la posibilidad de acelerar el ciclo de cultivos de lechuga con la aplicación foliar de sustancias húmicas asociadas con los cambios en la actividad enzimática relacionada con el metabolismo del nitrógeno. Para llevarlo a cabo, humatos Obtenidos a partir de estiércol de bovino producir humus de lombriz con hoja fueron aplicados por aspersión a 300 L ha<sup>-1</sup> tasa de menos de 1,6; 1,3 y 1,2 mmol C/L Las concentraciones en las plántulas de lechuga con x días después del trasplante. Se observó que la pulverización foliar con humato C a 1,2 mmol /L dosis Reducir la ontogenia del ciclo de producción de lechuga en 21 días, mientras que ambones 1,6 y 1,2 mmol de dosis de C/L habían demostrado la reducción de 15 días durante el ciclo de producción. Además, se trataba de un número creciente de Observó hojas por planta. La promoción del crecimiento vegetal se observó Seguido por cambios en el metabolismo de la planta, ya que humato aplicación foliar reducida carbohidratos totales se incrementaron el contenido de proteínas, mientras que el contenido, la nitrato reductasa y amonialisas fenilalanina. Dicha activación metabólica promovido por humatos resultó en rendimientos de lechuga y aumento de tiempo de ciclo reducido con beneficios para la lechuga bajo el sistema orgánico de producción.

**Palabras clave:** sustâncias húmicas, efectos fisiológicos, agricultura orgánica, metabolismo del nitrógeno.

## INTRODUÇÃO

O mercado mundial de produtos orgânicos tem crescido cerca de 20% ao ano chamando a atenção de novos produtores. A agricultura orgânica tem por princípio estabelecer sistemas de produção com base em tecnologias de processos, ou seja, um conjunto de procedimentos que envolvam a planta, o solo e as condições climáticas, produzindo um alimento sadio e com suas características e sabor originais, que atenda às expectativas do consumidor. A adaptação das cultivares ao novo sistema é o principal problema na transição de sistemas resultando, algumas vezes, em aumento no ciclo produtivo.

As substâncias húmicas (SH) têm reconhecida capacidade de estimular o crescimento vegetal modificando o metabolismo e a absorção de nutrientes (NARDI *et al.*, 2009). Essas mudanças induzidas incluem aumento da atividade de enzimas associadas à glicólise, ciclo de Krebs e assimilação de N (MUSCOLO *et al.*, 2007). RODDA *et al.* (2006) verificaram aumento no crescimento radicular de alface associado ao estímulo na atividade das H<sup>+</sup>-ATPases isoladas de raízes. O aumento da síntese e da atividade das bombas de prótons membranares pelas SH também estimula a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (CANELLAS *et al.*, 2006).

A eficiência do uso do N em sistemas orgânicos de produção depende da mineralização dos fertilizantes orgânicos e da atividade das enzimas que catalisam a absorção e a sua assimilação. A medida da atividade da nitrato redutase (NR) nas folhas fornece informações diretas sobre a eficiência do metabolismo de N (VACCARO *et al.*, 2009). Essa enzima também participa na catálise da redução do nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (CAMPBELL, 1999). Outra enzima chave no metabolismo de N é a fenilalanina amônia liase (PAL) que catalisa o primeiro passo da biossíntese de fenilpropanóides pela conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (FERNÁNDEZ, 2003). VACCARO *et al.* (2009) encontraram aumento da atividade da NR em folhas de milho e LIMA *et al.* (2008) em folhas de alface tratadas com SH e modificações na atividade da PAL foram observadas por SCHIAVON (2010).

A alface é a hortaliça folhosa mais consumida *in natura* no mundo e a mais cultivada em sistemas orgânicos. Objetivou-se como o presente trabalho avaliar o efeito da aplicação foliar de humatos isolados de vermicomposto na produção de alface

orgânico. As mudanças induzidas no metabolismo foliar foram relacionadas com o aumento de produção nas plantas tratadas com os humatos.

## MÉTODOS

O experimento foi conduzido área de cultivo orgânico de alface pertencente ao Movimento de Agricultura Urbana, no município de Guines sudeste do Estado de Mayabeque, Cuba. A variedade *Black Seed Simpson* foi semeada e cultivada nos meses de setembro a dezembro de 2010 períodos considerado ótimo para o cultivo de alface nas condições climatológicas de Cuba. O cultivo foi realizado em canteiros de 40 m de comprimento e 1 m de largura com espaçamento de 0,15 m entre plantas e 0,25 m entre as linhas. Os canteiros foram constituídos de uma mistura de terra e vermicomposto (3:1, v:v) com as seguintes propriedades: pH (água): 7,03; Carbono orgânico (dicromatometria): 306 g kg<sup>-1</sup>; Potássio, cálcio, magnésio e sódio (extração com KCl 1 mol·L<sup>-1</sup> e determinação por espectrometria de absorção atômica): 0,57; 14,9; 2,0 e 2,0 cmol·kg<sup>-1</sup>, respectivamente; Fósforo disponível (extrator Melich 1 e determinação por colorimetria do complexo fosfomolibdico formado): 1388 mg·kg<sup>-1</sup>.

Os tratamentos (três concentrações de humatos e o controle sem aplicação) foram dispostos em blocos ao acaso com três repetições. Foi realizada a análise da variância (Anova) e teste de comparação de médias (Tukey, P<0,01) quando necessário.

Os humatos foram obtidos de vermicomposto de esterco de curral com solução alcalina (KOH, 0,01 mol·L<sup>-1</sup>) na proporção 1:1 (m/v). O conteúdo de carbono no extrato alcalino foi determinado por dicromatometria e correspondeu a 82,5 mmol C. A condutividade elétrica foi 5,81 mS·cm<sup>-1</sup> e pH igual a 8,73. O humato de potássio foi aplicado nas plântulas de alface aos 10 e aos 15 dias após o transplante em três diluições (1:50; 1:60 e 1:70) equivalente a concentração de 1,6 mM C, 1,3 mM C e 1,2 mM correspondentes aos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente.

As análises bioquímicas das folhas de alface foram realizadas cinco dias após a última aplicação dos humatos em 60 plantas (20 plantas em cada bloco compuseram uma repetição). O conteúdo de pigmentos fotossintéticos foi realizado de acordo com PLUMMER (1981) numa massa de 250 mg de tecido fresco

de folhas macerado em acetona 85 % filtrado posteriormente em papel filtro. O filtrado obtido foi submetido à análise da absorvância em 470, 646,8 e 663 nm. O conteúdo de pigmentos fotossintéticos foi expresso como equivalente a  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do extrato cetônico. O conteúdo total de carboidratos nas folhas foi determinado de acordo com TANFORD (1961). A curva de calibração foi realizada com padrão de glicose a  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . A atividade foi expressa como  $\mu\text{g}$  de glicose  $\text{g}^{-1}$  massa fresca (MF). O conteúdo total de proteínas foliares foi determinado pelo método de Bradford.

A curva de calibração foi obtida com uma solução padrão de BSA a 0,01 %. O conteúdo de proteínas foi expresso como  $\mu\text{g}$  de proteína  $\text{g}^{-1}$  MF. O conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  foliar foi determinado de acordo com CATALDO & MINGGUANG (1975) com medida da absorvância em 410 nm em espectrômetro UV-VIS. A curva padrão foi obtida a partir de uma solução padrão de  $\text{KNO}_3$  (Sigma Aldrich) e o conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  expresso como  $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  de MF. A atividade da nitrato redutase (NR) (EC:1.6.6.1) *in vivo* foi realizada de acordo com a metodologia proposta por JAWORSKI (1971) utilizando-se uma quantidade de discos foliares até massa adequada retirados do limbo foliar da última folha completamente expandida. O material vegetal foi incubado por uma hora a 30 °C. Foram retiradas alíquotas do meio de incubação e a reação enzimática foi parada com a adição de sulfanilamida e N-naftiletilendiamida (NND). A absorvância foi medida em 540 nm num espectrômetro UV-VIS para a determinação da concentração de  $\text{NO}_2^-$ .

A curva de calibração foi obtida com solução padrão de  $\text{Na}_2\text{NO}_2$  (Sigma-Aldrich). A atividade da NR foi expressa em  $\text{mmol de NO}_2^- \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$ . A atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) (EC:4.3.1.5) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por HAROLD *et al.* (2007) com algumas

pequenas modificações descritas a seguir. Foram tomados 0,5 g de tecido foliar fresco e macerados em banho de gelo com acetona até a secagem do tecido. Foram adicionados 2 mL de tampão borato ( $\text{H}_3\text{BO}_3$   $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{ H}_2\text{O}$   $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pH 8,8. Alíquotas de 1 mL do extrato foram adicionadas em todos de ensaio com 0,9 mL de L-fenilalanina e incubados a 40 °C por 30 min. Foram adicionados posteriormente 250  $\mu\text{L}$  de HCL  $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e os tubos foram colocados em banho de gelo por 30 min. Após esse tempo foi adicionado 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  e repouso por 15 min. O material foi filtrado e a absorvância medida em 290 nm. A curva de calibração foi obtida com ácido cinâmico e a atividade enzimática foi expressa como em  $\text{mmol de ácido cinâmico min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  massa seca ou  $\text{mmol de ácido cinâmico min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína (atividade específica).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1A mostra a aceleração no ciclo de produção da alface com uso dos humatos. Nas plantas tratadas com a diluição de 1:60 (T2) foi possível observar um encurtamento de 21 dias entre o transplante e a colheita, enquanto que as diluições de 1:50 e 1:70 (T1 e T3) promoveram uma redução de 15 dias no ciclo de produção. O número de folhas também foi significativamente modificado com a utilização dos humatos (Figura 1B). Foi observado maior número de folhas com padrão comercial em relação às plantas controle. O T2 apresentou o maior número de folhas por pé de alface. A promoção do crescimento vegetal induzida pela ação fisiológica dos humatos resultou tanto em redução do ciclo de produção como no aumento do número de folhas por unidade de alface. Modificações bioquímicas significativas nas plantas também foram encontradas e discutidas a seguir.

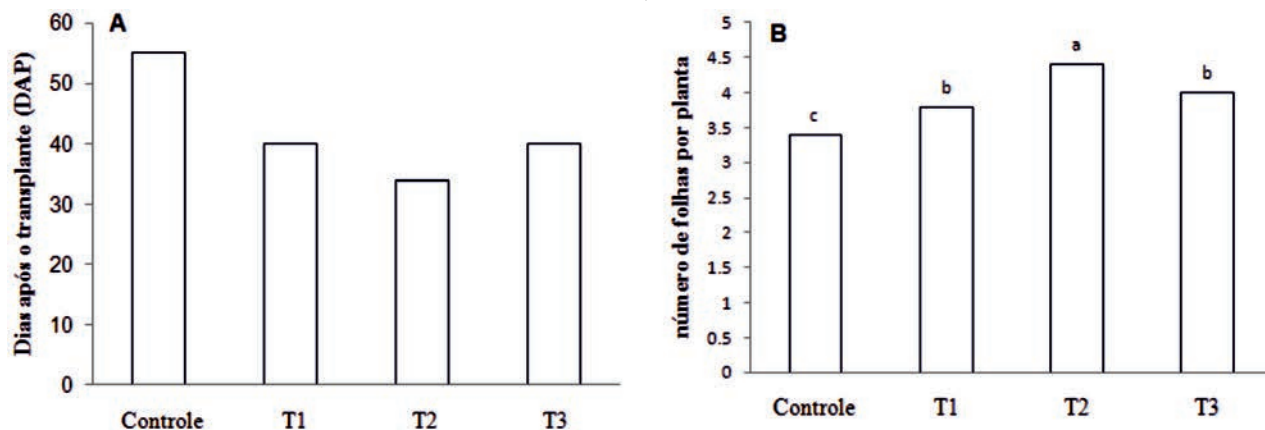


FIGURA 1. Produção de alface em sistema orgânico conduzido com e sem a aplicação de humatos em diferentes concentrações (os tratamentos controle, T1, T2 e T3 correspondem à concentração de humatos de 0, 1,6, 1,3; e 1,2  $\text{mmol C}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente). A: Duração em dias do ciclo de produção da alface. B: número de folhas aos 20 dias após o transplante. CV=9,33%. Letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $P<0.01$ )

O conteúdo equivalente de clorofila a e b não foram modificados significativamente com a aplicação dos humatos (Figura 2A). Já o conteúdo de carotenos foi menor nas maiores diluições aplicada. Resultados anteriores com a aplicação de SH mostraram tanto estímulo como inibição no conteúdo de pigmentos fotossintéticos em diferentes plantas (MARTINEZ, 2006; PFLUGMACHER *et al.* 2008) sugerindo que a resposta é dependente do tipo de planta mais do que da concentração de SH utilizadas. Nesse trabalho não foram observadas modificações importantes no conteúdo de pigmentos fotossintético exceto uma redução estatisticamente significativa no conteúdo de carotenos totais.

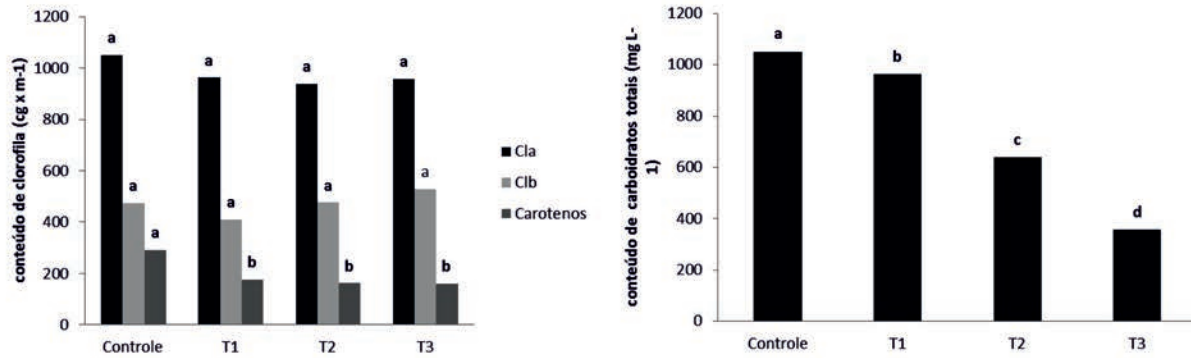


FIGURA 2. Conteúdo de pigmentos e de carboidratos em folhas de alfaca tratadas com humatos isolados de vermicompostos em diferentes concentrações (os tratamentos controle, T1, T2 e T3 correspondem à concentração de humatos de 0, 1,6, 1,3, e 1,2 mmol C L<sup>-1</sup>, respectivamente) aos 15 dias após o plantio. As avaliações foram realizadas aos 20 DAP. Médias seguidas de letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey (P<0,01).

O conteúdo de carboidratos totais é mostrado na Figura 2B. Foi observada a diminuição estatisticamente significativa dos carboidratos com o aumento da diluição do humato aplicado. A mobilização de açúcares redutores das folhas para as raízes, incorporação em diferentes vias metabólicas para crescimento e

desenvolvimento e, ainda, a utilização para síntese de proteínas são processos que contribuem para diminuição do conteúdo total de carboidratos foliares. O conteúdo de proteínas totais aumentou com a aplicação dos humatos. Não foram observadas diferenças entre os T1 e T3 (Figura 3A).

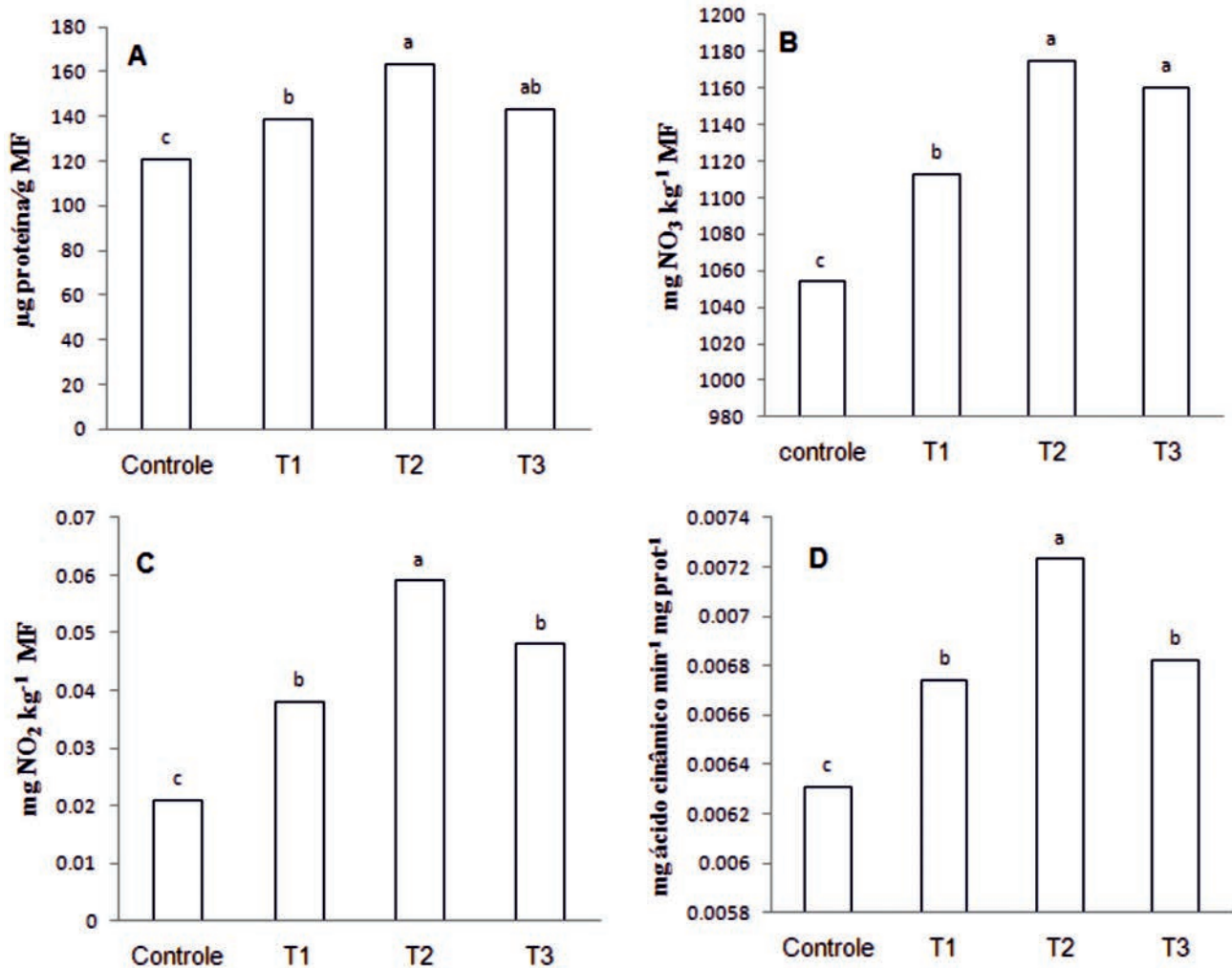


FIGURA 3. Conteúdo de proteínas totais (A), nitrato (B) e atividades da nitrato redutase (NR) (C) e fenilalanina amônia liase (PAL) (D) em folhas de alfaca tratadas com humatos isolados de vermicompostos em diferentes concentrações (os tratamentos controle, T1, T2 e T3 correspondem à concentração de humatos de 0; 1,6; 1,3 e 1,2 mmol C L<sup>-1</sup>, respectivamente) aos 15 dias após o plantio. As avaliações foram realizadas aos 20 DAP. Médias seguidas de letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey (P<0,01).

De modo geral foi verificado que o aumento da diluição do humato aplicado nas folhas resultou em diminuição no conteúdo de carboidratos redutores e em aumento nas proteínas totais. Resultados similares foram observados por HUELVA *et al.* (2004). Outros trabalhos também reportaram estimulação na biossíntese protéica com aplicação de SH isoladas de diferentes fontes (uma síntese desses trabalhos pode ser encontrada na revisão de NARDI *et al.*, 2009).

O conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  foliar foi significativamente maior nos tratamentos T2 e T3 em relação ao controle e a menor diluição de humato aplicada (Figura 3B). A absorção de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes pode ser favorecida pelo aumento no sistema radicular. Além disso, a absorção de  $\text{NO}_3^-$  necessita de energia e o transporte do ânion é realizado via simporte ( $2\text{H}^+ : \text{NO}_3^-$ ) com prótons (GLASS *et al.*, 1992). A estimulação no transporte de prótons para o meio externo em plantas tratadas com ácidos húmicos foi previamente demonstrada por CANELLAS *et al.* (2002). SANTI *et al.* (2003) e QUAGGIOTTI *et al.* (2004) verificaram que SH aumentaram a absorção de  $\text{NO}_3^-$  e o transporte para a parte aérea via estimulação da expressão do RNAm de ZmNtr 2,1, uma família de genes que codifica um tipo de transportador de  $\text{NO}_3^-$  de alta afinidade em milho.

A atividade da NR nas folhas de alface é mostrada na Figura 3C. Foi possível observar maior estimulação na atividade da NR nas folhas com o T2. Além disso, T1 e T3 aumentaram a atividade da NR em 18 e 52%, respectivamente, em relação ao controle. De um modo geral, a atividade da NR está relacionada com a disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$ , já que a atividade é induzida na presença do substrato. LIMA *et al.* (2008) trabalhando com alface em diferentes sistemas de cultivo encontraram correlações entre a estimulação da atividade da NR e o conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  acumulado nas folhas.

A atividade da PAL é mostrada na Figura 3D. Foi possível observar que o T2 estimulou mais a atividade da PAL. Esse resultado está de acordo com o maior conteúdo de proteínas verificado nas plantas tratadas com os humatos nessa diluição sugerindo a síntese de metabólitos precursores dessa enzima. A partir da eritorse-4-P e do ácido fosfoenolpirúvico é inicia-

do uma seqüência de reações que conduz a síntese do ácido chiquímico e seus derivados, os aminoácidos aromáticos (fenil alanina, triptofano e tirosina). O menor conteúdo de carboidratos totais (Figura 2B) nas plantas tratadas com humatos sugere o direcionamento metabólico para biossíntese de compostos do metabolismo secundário. A PAL (EC 4.3.1.5) está situada num ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário e a reação catalisa uma importante etapa reguladora na formação compostos fenólicos como parte da estratégia desenvolvida pelas plantas para evitar a infecção de patógenos (SALDANA, 2007). Atualmente são conhecidos dois tipos de resistência sistêmica: a resistência sistêmica adquirida ou a induzida (RSA e RSI, respectivamente).

A RSA pode ser induzida por agentes bióticos (tais como patógenos atenuados) ou abióticos (compostos químicos) e está associada à concentração do hormônio salicilato e produção de proteínas relacionadas a patogênese. A aplicação foliar dos humatos resultou em maior quantidade de alface com padrão comercial mais elevado, ou seja, menos danificadas. A polifuncionalidade e composição estrutural heterogênea das substâncias húmicas em solução pode conter os compostos abióticos estimuladores da atividade da PAL.

## CONCLUSÃO

- As modificações metabólicas encontradas nas folhas de alface tratadas com os humatos em diferentes diluições, tais como, diminuição no conteúdo de carboidratos totais, aumento de proteínas e atividade da NR e PAL resultaram em maior produção e no encurtamento significativo do ciclo de produção. Os humatos são eficientes promotores de crescimento vegetal.

## AGRADECIMENTOS

Uma parte desse trabalho foi realizada com auxílio da CAPES e do Ministério da Educação Superior de Cuba sob acordo de intercâmbio científico.

Para Darlin Quintero; Liane Portuondo; Dariellys Martínez e Andrés Calderín, que colaborou na pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMPBELL, W. H. "Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology". *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* v.50 p.277-303, 1999. Disponível em: <http://www.annualreviews.org> Acesso em 06 maio 2010. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.277.
2. CANELLAS, L.P. OLIVARES, F. L., OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L. & FAÇANHA, A.: "Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase activity in maize roots". *Plant Physiol.*, v.130p.1951-1957, 2002. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org>. Acesso em 03 maio 2010. doi: 10.1104/pp.007088.
3. CANELLAS, L.P; OLIVARES, F.: "Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às  $\text{H}^+$ -ATPases". In: FERNANDES, M.S. *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa: SBCS, 2006. Cap.2, p.175-200.
4. CATALDO, D.; MINGGUANG, A.R. "Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* v. 6 p.71-90, 1975. Disponível em: <http://journalseek.net/cgi-bin/journalseek/journalsearch.cgi?field=issn&query=0010-3624>. Acesso em 15 maio 2010.

5. FERNÁNDEZ, A.: “Actividad peroxidasa, polifenoloxidasa, fenilalaninamonioliase y glucanasa em somaclones y mutantes de arroz”. **Rev. Protección Veg.** v.18. p.183-188, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.sld.cu/scielo>>. **Acesso em 03 maio 2010.**
6. GLASS, A.D.M.; SHAFF, J.E.; KOCHIAN, L.V. “Studies on the uptake of nitrate in barley”. *Electrophysiology. Plant Physiology*, 99, pp. 456-463, 1992. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/>>. **Acesso em 03 setembro 2010.**
7. HAROLD, E. & BAQUERO, B. “Inducción de la enzima fenilalanina amonioliase em clavel”. **Rev. Colomb. Quími.** Vol. V.36, p.51- 167, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo-log.bireme.br/.../scielolog.php?script>>. **Acesso em 07 abril 2010.**
8. JAWORSKY, E.G. “Nitrate reductase assay in intact plant tissues”. **Biochem. and Biophys. Res. Commun.** V.43 p.1274-1279, 1971. Disponível em: <[http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/506062/description](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506062/description)>. **Acesso em 28 dezembro 2010.**
9. LIMA, J.D; MORAES, W.S; GORLA DA SILVA, S.E. M; IBRAHIM, F.N; JÚNIOR, A.C.: “Acúmulo de compostos nitrogenados e atividade da reductase do nitrato em alfalce produzida sob diferentes sistemas de cultivos I”. **Pesq. Agropec. Trop.** v. 38 p. 80-187, 2008. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/pat/article/view/3325/4064>> **Acesso em 06 maio 2011.**
10. MARTINEZ, B., D. “Evaluación del efecto del Liplant en indicadores bioquímicos fisiológicos en el cultivo del maíz (Zea mays L)”. Tesis de maestria en Química Agraria. La Habana. 2006. Universidad Agraria de La Habana.
11. MUSCOLO, A. DIALLO, D. MICHAELSEN, T.E. & NARDI, S.: “The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures”. **J. Chem Ecol** v.33 p.115-129, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>. **doi: 10.1007/s10886-006-9206-9.**
12. NARDI, S; XING, B. & HUANG, P.M.: “Biological Activities of Humic Substances. In Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Non Living Organic Matter in Environmental Systems”. Senesi, N.; Xing, B.; Huang, P.M. (eds) Wiley, New Jersey, pp. 305-340. (2009).
13. PFLUGMACHER, S, PIETSCH, C, RIEGER, W. & STEINBERG, W.: “Influence of structural moieties of dissolved organic matter on the photosynthetic oxygen production of aquatic plants”. **Sci. Total Environ.** v.357 p.169–175, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>. **doi:10.1016/j.scitotenv.2005.03.021**
14. PLUMMER, D.T. “Introducción a la bioquímica práctica”. 1981. Cap. 4, p.94-111. Disponível em: <<http://www.bioquimica.dogsleep.net/Laboratorio/Plummer>> **Acesso em 07 abril 2010.**
15. QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; PIZZAGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V. & NARDI, S.: “Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (Zea mays L.)”. *J. Exp. Bot.* v.55 p.803-813, 2004. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/>>. **Acesso em 05 maio 2010. doi: 10.1093/jxb/erh085**
16. RODDA, M.R.C.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R.; ZANDONADI, D.B.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. & SANTOS, G.A.: “Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alfalce tratadas com humatos de vermicomposto. II - Efeito da fonte de vermicomposto”. **Rev. Bras. Ci. Solo** v.30 p.657-664, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php>>. **Acesso em: 20 jan. 2010.**
17. SALDANA L. H.: “Fenoles, peroxidasa y fenilalanina amonio-lyasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary)”. *Agrociencia* v.41 p. 479-489-xx., 2007. Disponível em: <http://www.colpos.mx/agrocien/agrociencia.htm> **Acesso em 06 maio 2011.**
18. SANTI, S.; LOCCI, G.; MONTE, R.; PINTON, R. & VARANINI, Z.: “Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms”. **J. Exp. Bot.** v. 54 p.1851-1864, 2003. Disponível em: <http://jxb.oxfordjournals.org/>. **Acesso em 06 maio 2011. doi: 10.1093/jbx/erg208**
19. SCHIAVON, M.: “High Molecular Size Humic Substances Enhance Phenylpropanoid Metabolism in Maize (Zea mays L.)”. **J Chem Ecol** v.36, p.662–669, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com>>. **doi: 10.1007/s10886-010-9790-6.**
20. TANFORD, C. “Physical Chemistry of Macromolecules”. John Wiley & Sons, New York, N.Y. 1961. 172p.