

Universidade Federal de São João del-Rei  
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia

NATANAEL TAVARES DE OLIVEIRA

**MECANISMOS DE AÇÃO DE UM BIOESTIMULANTE À BASE DE SUBSTÂNCIAS  
HÚMICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO MILHO**

SÃO JOÃO DEL-REI  
MINAS GERAIS - BRASIL  
FEVEREIRO DE 2020

NATANAEL TAVARES DE OLIVEIRA

**MECANISMOS DE AÇÃO DE UM BIOESTIMULANTE À BASE DE SUBSTÂNCIAS  
HÚMICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO MILHO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del-Rei como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de “*Doctor Scientiae*.” (DS).

SÃO JOÃO DEL REI  
MINAS GERAIS – BRASIL  
FEVEREIRO DE 2020

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)  
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

d048m de Oliveira, Natanael Tavares.  
Mecanismos de ação de um bioestimulante à base de  
substâncias húmicas sobre o desenvolvimento do milho  
/ Natanael Tavares de Oliveira ; orientadora Sylvia  
Morais de Sousa Tinoco. -- São João del-Rei, 2020.  
137 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em  
Bioengenharia) -- Universidade Federal de São João  
del-Rei, 2020.

1. Auxina. 2. Leonardita. 3. Transcriptoma. 4.  
Raiz. 5. Milho. I. Morais de Sousa Tinoco, Sylvania ,  
orient. II. Título.

NATANAEL TAVARES DE OLIVEIRA


**MECANISMOS DE AÇÃO DE UM BIOESTIMULANTE A BASE DE SUBSTÂNCIAS  
HÚMICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO MILHO**


Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del-Rei como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


Aprovado em: 28 de fevereiro de 2020

  
Dra. Cynthia Maria Borges Damasceno  
Embrapa

  
Prof. Dr. Daniel Basilio Zandonadi  
UFRJ

  
Prof. Dr. Leonardo Lucas Carnevalli Dias  
UFSJ

  
Dr. Luis Willian Pacheco Argê  
UFRJ

  
Profa. Dra. Sylvia Moraes de Sousa Tinôco  
Orientadora - Embrapa / UFSJ

## AGRADECIMENTOS

À minha estimada esposa Érika pelo carinho, dedicação, incentivo e paciência durante a minha formação acadêmica;

As minhas queridas filhas, Emanuely e Nicolly, pelo o amor e carinho que recebo de vocês todos os dias;

Aos meus pais José e Maria, ao meu irmão Elionai, a minha carinhosa tia Vanessa e a todos da minha família que acreditam no meu sucesso;

À Profa. Dra. Sylvia Moraes de Sousa pela orientação nesse trabalho, por todo apoio e disponibilidade em todos os momentos em que precisei, pela amizade e principalmente por acreditar e confiar na minha capacidade;

Ao Dr. Luiz Willian Pacheco Arge por todo apoio e disponibilidade para executar e ensinar o *pipeline* das análises de bioinformática e pela amizade;

Ao Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana da Embrapa Milho e Sorgo / NBA pela ajuda nas análises de expressão gênica de PCR em tempo real e por contribuir com sugestões e diretrizes na parte escrita do trabalho;

Ao Dr. Roberto Willian Noda da Embrapa Milho e Sorgo / NBA pelos primeiros passos na área da bioinformática e pelas sugestões no projeto, contribuindo para melhoria do trabalho;

Ao Dr. Daniel Basílio Zandonadi da UFRJ por ter me recebido no NUPEM / UFRJ em Macaé para execução das análises bioquímicas. Agradeço também a Dra. Mirella Pupo Santos, sua esposa, pela recepção e apoio.

À técnica Gislene Braga da Embrapa Milho e Sorgo pela paciência e ensinamentos. Pela disponibilidade e ajuda nos experimentos realizados na câmara de crescimento e pelas suas palavras de sabedoria;

Aos membros da banca examinadora, Dr. Daniel Basílio Zandonadi, Dra. Cynthia Maria Borges Damasceno, Dr. Leonardo Lucas Carnevalli Dias e Dr. Luiz Willian Pacheco Arge por aceitarem meu convite e pela valiosa contribuição neste projeto;

Ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD) da UNICAMP por ter me recebido no curso de bioinformática. Agradeço também pela participação no curso de verão em Bioinformática da UFMG e o curso de Análise de Transcritomas e MicroRNAs, oferecido pelo Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC);

À Universidade Federal de São João del-Rei pela oportunidade de realizar o

doutorado no Programa de Pós-graduação em Bioengenharia e pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela disponibilidade de recursos financeiros para execução do projeto;

À Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas pela estrutura e recursos disponibilizados para execução desse projeto e por contribuir na minha formação profissional.

Às colegas Simara e Mariana pelo auxílio na interpretação dos resultados moleculares e bioquímicos.

Aos amigos e colegas de trabalho do laboratório de bioinformática pelo o compartilhamento de *scripts* do R, pelas chuvas de ideias nos momentos de incertezas, pelos conselhos que extrapolavam o trabalho, pelo carinho, pelas comemorações e risadas;

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desta tese.

*“A persistência é o menor caminho do êxito”.*

*(Charles Chaplin)*

OLIVEIRA, Natanael Tavares de (DS). Universidade Federal de São João del-Rei, fevereiro de 2020. **MECANISMOS DE AÇÃO DE UM BIOESTIMULANTE À BASE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO MILHO.** Orientadora: Sylvia Morais de Sousa Tinôco. Coorientadores: Roberto Willians Noda e Ubiraci Gomes de Paula Lana.

## RESUMO

O uso de bioestimulantes tem crescido nos últimos anos e aumentado a produtividade de culturas importantes, como o milho. Os bioestimulantes à base de substâncias húmicas (SH) alteram o metabolismo das plantas de diferentes maneiras, no entanto os mecanismos de ação ainda são pouco conhecidos. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar os mecanismos de ação de um bioestimulante comercial à base de SH derivadas de leonardita no crescimento e desenvolvimento de plântulas de milho. As plântulas de milho foram crescidas em solução nutritiva por sete dias (aclimatação), após o período metade do experimento foi suplementado com o bioestimulante enquanto o restante manteve-se sem o bioestimulante (controle) por mais sete dias. Inicialmente a raiz e a parte aérea foram coletadas separadamente, o RNA extraído e as bibliotecas sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq 2500 Paired-End 2x150pb gerando um total de 264,3 milhões de leituras, das quais 92,8% foram mapeadas em posição única no genoma de referência de milho B73 (versão AGPv4). Pela análise de transcriptômica identificou-se um total de 370 genes diferencialmente expressos (DEGs) na raiz e 809 na parte aérea pela comparação das plantas tratadas *versus* controle (FDR <0,05). Os genes superexpressos na raiz foram associados a processos metabólicos de aminoácido e cetona, catabolismo de quitina, mecanismos de transporte de cobre e ferro iônicos, enquanto os genes superexpressos na parte aérea foram associados a processos fotossintéticos, sinalização e biossíntese de diferentes hormônios vegetais. Foram identificados agrupamentos de genes regulando as mesmas funções biológicas em ambos tecidos, sendo esses relacionados à proteção contra os diferentes estresses bióticos e abióticos, metabolismo de lipídios, síntese e degradação de componentes de parede celular, biossíntese de metabólitos secundários, resposta e transporte de nitrato. Por outro lado, o bioestimulante reprimiu genes ligados à resposta de alta intensidade de luz (fotoinibição), resposta ao estresse salino e resposta ao calor. O bioestimulante induziu a superexpressão de genes ligados a desenvolvimento do sistema radicular como, os genes



transportadores de basípito de auxina *ZmLAX3* (parte aérea) e *ZmPIN9* (raiz), além da superexpressão do gene relatado pela translocação de nitrato, fitormônios, peptídeos e aminoácidos, o *ZmNTR1.1* em ambos tecidos, porém não houve acúmulo de macro e micronutrientes, com exceção de manganês na raiz. O bioestimulante levou a um aumento da superfície radicular e conseqüentemente a uma maior biomassa da planta seca. A atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática foi 2,6 vezes superior nas plantas tratadas com bioestimulante que também apresentaram maior acidificação rizosférica do que o controle. Além disso, houve aumento de transcritos codificadores de expansinas e xiloglucano relacionados ao mecanismo de crescimento ácido, que é desencadeado por ácido indol-3-acético (AIA) nas plântulas tratadas com o bioestimulante, o qual apresentou AIA em sua composição. As análises moleculares, bioquímicas e fisiológicas realizadas auxiliaram na compreensão dos mecanismos de ação do bioestimulante à base de SH.

**Palavras-Chave:** auxina; hidroponia; Leonardita; H<sup>+</sup>-ATPase; raiz; transcriptoma; *Zea mays*.

OLIVEIRA, Natanael Tavares de (DS). Universidade Federal de São João del-Rei, fevereiro de 2020. **MECHANISMS OF ACTION OF A HUMIC SUBSTANCES-BASED BIOESTIMULANT ON MAIZE GROWTH.** Orientadora: Sylvia Morais de Sousa Tinôco. Coorientadores: Roberto Willians Noda e Ubiraci Gomes de Paula Lana.

## ABSTRACT

The use of biostimulants has grown in recent years and increased the productivity of important crops, such as maize. Humic substances-based biostimulants (HS) alter plant metabolism in different ways, however their mechanism of action is still poorly understood. Therefore, this work aimed to identify the mechanisms of action of HS-based commercial biostimulant derived from leonardite in the growth and development of maize seedlings. The maize seedlings were grown in nutrient solution for seven days (acclimatization), after the period half of the experiment was supplemented with the biostimulant while the rest remained without the biostimulant (control) for another seven days. Initially, the root and the shoot were collected separately, the RNA extracted and the libraries sequenced on the Illumina HiSeq 2500 Paired-End 2x150pb platform generating a total of 264.3 million reads, which 92.8% were mapped in a unique position in the B73 maize reference genome (AGPv4 version). Transcriptome analysis identified a total of 370 differentially expressed genes (DEGs) in the root and 809 in the shoot by comparing treated versus control plants (FDR <0.05). The overexpressed genes in the root were associated with metabolic processes of amino acid and ketone, chitin catabolism, ion and copper transport mechanisms, while overexpressed genes in the shoot were associated with photosynthetic processes, signaling and biosynthesis of different plant hormones. Clusters of genes have been identified regulating the same biological functions in both tissues, which are related to protection against different biotic and abiotic stresses, lipid metabolism, synthesis and degradation of cell wall components, biosynthesis of secondary metabolites, response and nitrate transport. On the other hand, the biostimulant repressed genes linked to the high intensity light response (photoinhibition), salt stress response and heat response. The biostimulant induced the overexpression of genes linked to the development of the root system, such as the auxin basipet transporter genes *ZmLAX3* (shoot) and *ZmPIN9* (root), in addition to the overexpression of the gene reported to be involved in the translocation of nitrate, phytohormones, peptides and amino acids, *ZmNTR1.1* in both tissues, however there was no accumulation of macro and micronutrients, with the exception

of manganese in the root. The biostimulant led to an increase in the root surface area and consequently to a greater plant biomass. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity was 2.6-fold higher in plants treated with biostimulant which also showed higher rhizospheric acidification than the control. In addition, there was an increase of transcripts encoding expansins and xyloglucan related to the acid growth mechanism that is triggered by indole-3-acetic acid (IAA) in seedlings treated with the biostimulant which presented IAA in its composition. The molecular, biochemical and physiological analyzes carried out helped to understand the mechanisms of action of the HS-based biostimulant.

**Keywords:** auxin; hydroponics; Leonardite; H<sup>+</sup>-ATPase; root; *Zea mays*; transcriptome.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismo de expansão celular induzido por auxina exógena presente em SH.....	<b>19</b>
<b>Figura 2</b> - Correlação de Pearson entre as análises de RNAseq e qPCR dos genes modulados no sistema radicular (A) e parte aérea (B) em plântulas de milho tratadas com bioestimulante a base de substâncias húmicas e controle. ....	<b>39</b>
<b>Figura 3</b> - Diagrama de Venn mostrando a distribuição de genes específicos e comuns à raiz e parte aérea de plantas de milho submetidas ao tratamento com bioestimulante a base de substâncias húmicas.....	<b>40</b>
<b>Figura 4</b> - Atribuição dos genes de raiz e parte aérea de milho submetido ao tratamento com bioestimulante diferencialmente expressos a termos ontológicos (GO terms) enriquecidos nas categorias Processos Biológicos (A), Função Molecular (B) e Componente Celular (C).....	<b>44</b>
<b>Figura 5</b> - Perfil de expressão dos genes diferencialmente expresso em raiz e parte aérea de plantas de milho submetidas a tratamento com bioestimulante a base de substâncias húmicas representada na plataforma Mapman..	<b>45</b>
<b>Figura 6</b> - Anotação dos genes diferencialmente expressos em raiz e parte aérea de milho submetidos ao tratamento com bioestimulante realizada no <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (KEGG).....	<b>46</b>
<b>Figura 7</b> - Vias de biossíntese dos fitormônios ácido jasmônico (JA) e ácido abscísico afetadas pelo bioestimulante (B+) na parte aérea das plântulas de milho representada na plataforma Mapman. ....	<b>47</b>
<b>Figura 8</b> - <i>Heatmap</i> da expressão de genes em plântulas de milho tratadas com bioestimulante a base de substâncias húmicas. ....	<b>51</b>
<b>Figura 9</b> - Plântulas de milho crescidas em solução nutritiva tratada (B+) e não tratada (B-) com bioestimulante. ....	<b>52</b>
<b>Figura 10</b> - Características radiculares e massa seca de plântulas de milho após sete dias de tratamento com bioestimulante (B+) e controle negativo (B-). ....	<b>54</b>
<b>Figura 11</b> - Efeito sobre atividade da enzima H <sup>+</sup> -ATPase de membrana plasmática e tonoplasto isolada de raízes de milho com sete dias após tratamento com bioestimulante (B+) e controle negativo (B-).....	<b>56</b>

**Figura 12** - (A) Acidificação rizosférica das plântulas de milho tratadas com bioestimulante (B+) e controle (B-). (B) Medidas de pH obtidas a partir de 12, 24 e 36 mm de distância da raiz primária e convertidos em concentração de H<sup>+</sup>. Os asteriscos (\*) indicam diferença significativa pelo teste t ( $p < 0,05$ ). ..... **57**

**Figura S1** - Proteínas quinases *SnRKs-TOR-MAPKs* como principais reguladoras do metabolismo e crescimento das plantas moduladas por bioestimulante de SH.....**93**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais bioestimulantes comerciais de substâncias húmica derivado de Leonardita. ....	<b>10</b>
<b>Tabela 2</b> - Representação de uma tabela de contingência de expressão diferencial (DEG) e fator de anotação para aplicação do teste exato de Fisher. ....	<b>27</b>
<b>Tabela 3</b> - Sequência dos oligonucleotídeos para análise de qPCR. ....	<b>30</b>
<b>Tabela 4</b> - Qualidade do RNA avaliada por Bioanalyzer, expresso em RNA Integrity Number (RIN), das amostras de raiz e parte aérea tratadas com bioestimulante (B+) e controle negativo (B-). ....	<b>38</b>
<b>Tabela 5</b> - Total de <i>reads</i> obtidos para cada biblioteca de raiz e parte aérea de plântulas de milho submetidas aos tratamentos com bioestimulante (B+) e controle negativo (B-). ....	<b>38</b>
<b>Tabela 6</b> - Genes de milho diferencialmente expressos no tratamento com o bioestimulante a base de substâncias húmicas. ....	<b>49</b>
<b>Tabela 7</b> - Resumo das análises de variância para características radiculares e peso seco de plântula de milho avaliado sob efeito do bioestimulante. ....	<b>53</b>
<b>Tabela 8</b> - Conteúdo de macro e micronutrientes de raiz e parte aérea (PA) de plântulas de milho após sete dias de tratamento com bioestimulante (B+) e controle negativo (B-). ....	<b>55</b>
<b>Tabela S1</b> - Proteínas quinases associadas a via da quinase TOR (KEGG) diferencialmente expressas na raiz e parte aérea das plântulas de milho tratadas com bioestimulante. ....	<b>94</b>
<b>Tabela S2</b> - Genes diferencialmente expressos (DEGs) na raiz de plântula de milho tratadas com bioestimulante de substâncias húmicas. ....	<b>95</b>
<b>Tabela S3</b> - Genes diferencialmente expressos (DEGs) na parte aérea de plântula de milho tratadas com bioestimulante de substâncias húmicas. ....	<b>109</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....</b>	<b>3</b>
2.1. IMPORTÂNCIA DO MILHO .....	3
2.2. MERCADO E REGULAMENTAÇÃO DOS BIOESTIMULANTES VEGETAIS.....	4
2.3. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS COMO BIOESTIMULANTES VEGETAIS.....	6
2.4. BIOESTIMULANTES COMERCIAIS DERIVADOS DE LEONARDITA....	7
2.5. MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS .....	14
2.5.1. Citocinina .....	15
2.5.2. Giberelina.....	16
2.5.3. Ácido indol-3-acético (AIA) .....	17
2.6. TRANSCRIPTÔMICA PARA ANÁLISE FUNCIONAL DE PLANTAS TRATADAS COM BIOESTIMULANTES.....	20
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1. CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO E TRATAMENTO COM BIOESTIMULANTE.....	24
4.2. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA .....	25
4.2.1. Extração de RNA, Construção de Biblioteca e Sequenciamento em Larga Escala (RNA-Seq).....	25
4.2.2. Processamento de Reads e Expressão Gênica Diferencial.....	25
4.2.3. Anotação Funcional de Genes Diferencialmente Expressos .....	27
4.2.4. Validação dos Resultados da Análise de RNA-Seq Por qPCR .....	28
4.3. FENOTIPAGEM.....	34
4.3.1. Caracterização da Morfologia Radicular .....	34
4.3.2. Determinação de Peso Seco e Macro e Micronutrientes .....	34
4.3.3. Análise de Dados .....	35
4.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA H <sup>+</sup> -ATPase.....	35
4.4.1. Isolamento de Membranas .....	35
4.4.2. Determinação da Atividade H <sup>+</sup> -ATPase.....	36

4.5. DETERMINAÇÃO DO PH RIZOSFÉRICO.....	36
4.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) DO BIOESTIMULANTE COMERCIAL BLACKGOLD® .....	37
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
5.1. ANÁLISE DO TRANSCRIPTÔMICA DE PLÂNTULAS DE MILHO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM BIOESTIMULANTE A BASE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS .....	38
5.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE PLÂNTULAS DE MILHO TRATADAS COM BIOESTIMULANTE A BASE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS .....	52
5.3. AUMENTO DA EXTRUSÃO DE PRÓTONS H <sup>+</sup> EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE MILHO TRATADAS COM BIOESTIMULANTE A BASE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS .....	56
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo. Com o crescimento da população mundial e o aumento da demanda por alimentos há a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias e práticas que permitam elevar a produtividade agrícola de forma sustentável e segura, além de minimizar os impactos gerados por estresses bióticos e abióticos (Wang *et al.* 2013). Nesse contexto, os bioestimulantes vegetais são uma alternativa para promover o rendimento das culturas e reduzir o uso de agroquímicos proporcionando maior custo-benefício aos produtores.

Os bioestimulantes são produtos derivados de compostos orgânicos naturais ou de microrganismos, capazes de atuar diretamente no metabolismo das plantas, melhorar processos fisiológicos, contribuir para a absorção de nutrientes, induzir resistência aos estresses bióticos e abióticos e aumentar a produtividade (Olaetxea *et al.* 2015; Canellas *et al.* 2015; Bulgari *et al.* 2015; Halpern *et al.* 2015; Yakhin *et al.* 2017; Van Oosten *et al.* 2017). Além de atuarem de forma direta, promovem outros benefícios às culturas de forma indireta melhorando a estrutura do solo, reduzindo sua compactação, garantindo mais carbono no solo, e ainda contribuem na manutenção da microbiota da rizosfera (Pascale *et al.* 2017). Apesar dos benefícios promovidos pelos bioestimulantes, esses ainda não possuem uma regulamentação definida. Os bioestimulantes não são defensivos agrícolas por não oferecem proteção direta às plantas contra pragas e patógenos e não são fertilizantes agrícolas, o que gera incompatibilidade com as legislações vigentes (Caradonia *et al.* 2019). Mesmo sem uma definição regulatória clara as perspectivas de otimização das culturas impulsionam o mercado global de bioestimulantes, que estimou uma movimentação para setor de 2,6 bilhões de dólares para 2019. Uma projeção até 2025 estima uma taxa crescimento anual de 11,24%, levando o mercado a atingir 4,9 bilhões de dólares (Marketsandmarkets.com 2019). Nesse mercado, os principais produtos disponíveis são os derivados de substâncias húmicas (SH), extratos de algas, proteínas hidrolisadas (PHs) e aminoácidos (AA) e bactérias promotoras de crescimento de planta (BPCP) (du Jardin 2015; Calvo *et al.* 2014).

As SH podem ser extraídas de diversas fontes de material orgânico humificado, sendo a leonardita uma delas. A partir dessas extrações, são formulados os humatos comerciais (Little *et al.* 2014; Conselvan *et al.* 2017). Os humatos

melhoram absorção e transportes de nutrientes nos vegetais, otimizam as reações bioquímicas do ciclo de Krebs, aumentam a produção de ATP, elevam a atividade das H<sup>+</sup>-ATPases de membranas, estimulam a síntese de clorofila, carboidratos e ácidos nucleicos (Nardi *et al.* 2017; Nardi *et al.* 2002; Canellas & Olivares 2014; Pizzeghello *et al.* 2001; Çelik *et al.* 2011), o que pode resultar no aumento do sistema radicular, área foliar, maior biomassa e aumento da produtividade das culturas. Os efeitos dos humatos podem ser comparados aos causados por reguladores de crescimento de planta, como os modulados pela auxina (Muscolo *et al.* 1998; Quaggiotti *et al.* 2004, Zandonadi *et al.* 2007). Embora esses estudos relatem que os efeitos das SH possam superar os efeitos causados pelos hormônios vegetais, os mecanismos de ação das SH são pouco conhecidos, sendo necessário o uso de ferramentas da biologia molecular para melhor compreensão sobre os modos de ação das substâncias húmicas nos vegetais.

Estudos fisiológicos aliados às tecnologias de sequenciamento de nova geração são ferramentas poderosas para o entendimento mais profundo dos mecanismos e redes moleculares. A técnica de RNA-Seq permite a avaliação da expressão de milhares de genes simultaneamente e auxiliam na caracterização de processos celulares, tais como sinalização celular, absorção e transporte de nutrientes, biossíntese de hormônios, modulados por diferentes tratamentos (Liu *et al.* 2015; He *et al.* 2016; Trevisan *et al.* 2017).

Nesse contexto, uma abordagem fisiológica e molecular pode ajudar a compreender melhor os mecanismos de ação dos humatos comerciais, e auxiliar no estabelecimento dos processos regulatórios dos bioestimulantes à base de substâncias húmicas.

## 2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1. IMPORTÂNCIA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família Poaceae e é um dos cereais mais cultivados em todo o mundo devido ao seu alto potencial produtivo e facilidade de adaptação a diversas condições ambientais (Khan *et al.* 2018). A produção mundial de milho em 2019 ultrapassou 1 bilhão de toneladas, sendo os Estados Unidos, China e Brasil, seus maiores produtores, os quais produziram respectivamente 34%, 24% e 8% do volume mundial (FAO 2019).

O milho é um cereal de alto valor econômico, pois é matéria prima para uma variedade de produtos, sendo grande parte da sua produção destinada a alimentação animal e humana (Ranum *et al.* 2014). Em termos nutricionais, o milho contém cerca de 72% de amido, 10% de proteína e 4% de óleo, sendo fonte de diversas vitaminas e nutrientes (Serna-Saldivar *et al.* 2019; Khan *et al.* 2018). Na indústria, os grãos de milho podem ser processados em uma variedade de produtos alimentícios, incluindo cereais matinais, salgadinhos, adoçantes, óleos, bebidas, dentre outros (Serna-Saldivar *et al.* 2019). Na última década, a utilização do milho para produção de etanol combustível aumentou significativamente, sendo que nos Estados Unidos cerca de 40% da sua produção é destinada a indústria alcooleira (Ranum *et al.* 2014).

Devido a sua alta importância econômica e nutricional, caracterizar o genoma do milho auxilia nas abordagens de melhoramento genético desta cultura. Neste contexto, no ano de 2002 lançou-se o projeto de sequenciamento do genoma do milho (Chandler & Brendel 2002) e em 2009 foi lançada a primeira versão completa do genoma de referência do milho (linhagem B73) (Schnable *et al.* 2009), apresentando mais de 32 mil genes distribuídos nos dez cromossomos e possibilitando desde então estudos genômico e transcriptômico nesta espécie vegetal. Atualmente, está disponibilizada a versão 4 da linhagem B73, sequenciada com a tecnologia *single-molecule real-time sequencing* (SMRT), a qual fornece maior precisão para as pesquisas básicas e aplicadas (Jiao *et al.* 2017).

Apesar dos avanços biotecnológicos e programas de melhoramento do milho, as mudanças climáticas globais, como o aumento gradativo da temperatura do

planeta, baixos índices de precipitações dentre outros fatores, são desafios para os produtores (Cairns *et al.* 2012). Estresses bióticos e abióticos impactam diretamente na produção desse cereal, uma vez que há alto investimento metabólico a fim de mitigar os danos e garantir a sobrevivência da planta em detrimento do crescimento e da produtividade (Atkinson & Urwin 2012). Estresses bióticos provocados por patógenos, herbívoros e ervas daninha, podem reduzir cerca de 30% a produtividade da cultura do milho, enquanto os estresses abióticos como seca, salinidade, frio, geada e alagamento, a redução na produtividade da cultura pode ser superior a 65% (Wang *et al.* 2013).

Diante dos impactos negativos promovidos pelos fatores bióticos e abióticos, torna-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias e estratégias de cultivo das culturas visando suprir a alta demanda de alimento, tendo em vista a estimativa do crescimento da população mundial que deverá ultrapassar 9 bilhões de pessoas até 2050 (ONU 2019).

## 2.2. MERCADO E REGULAMENTAÇÃO DOS BIOESTIMULANTES VEGETAIS

Com o aumento da demanda na produção de alimento há uma intensificação do uso de áreas agricultáveis, com demanda de água, energia, agroquímicos e outros insumos agrícolas (Garnett *et al.* 2013). Diversas estratégias e ferramentas biotecnológicas têm sido desenvolvidas para garantir a produção de alimentos de forma mais eficiente, visando minimizar impactos ambientais e mitigar o uso de recursos naturais não renováveis, como a extração de matéria prima para fabricação de fertilizantes químicos. Algumas dessas estratégias incluem a comercialização de culturas transgênicas, cultivares melhoradas e aplicação de bioprodutos (Moose & Mumm 2008).

Os promotores de crescimento ou bioestimulantes vegetais trazem uma nova perspectiva para agricultura moderna. Esses compostos melhoram processos fisiológicos dos vegetais, contribuem para a absorção de nutrientes, aumentam a produtividade, conferem tolerância a estresses bióticos e abióticos, beneficiam as culturas indiretamente como, por exemplo, o fornecimento gradual de carbono no solo modificando sua estrutura, contribuindo para a redução da compactação, além de atuarem na manutenção da microbiota da rizosfera (Calvo *et al.* 2014; Yakhin *et al.* 2017).

O uso de bioestimulantes tem aumentado nos últimos anos, principalmente nas culturas de alto valor econômico, como, arroz, trigo, milho e cevada. O mercado global de bioestimulantes já contabiliza aproximadamente 2,6 bilhões de dólares em 2019 e uma projeção até 2025, estima uma taxa crescimento anual de 11,24%, levando o mercado a atingir 4,9 bilhões de dólares (Marketsandmarkets.com 2019). A Europa representa 42% do mercado mundial de bioestimulantes, sendo esse setor impulsionado pela alta demanda por alimentos orgânicos (Caradonia *et al* 2019; Marketsandmarkets.com, 2019).

Os bioestimulantes estão classificados atualmente em defensivos ou fertilizantes agrícolas, porém não atuam na proteção direta de plantas contra pragas e patógenos e não são fertilizantes (La Torre *et al.* 2016; Conselvan *et al.* 2017; Barone *et al.* 2019). Fertilizantes são produtos cuja função principal é fornecer macro e/ou micronutrientes às plantas e neste contexto, a definição de bioestimulantes é incompatível com a legislação atual de fertilizantes, pois, os bioestimulantes promovem o crescimento das plantas por outros meios (Caradonia *et al* 2019). A composição desses produtos pode apresentar múltiplos componentes, sendo que, muitos destes não são caracterizados. Assim, a bioatividade ocorre de forma combinada e não por meio de componentes isolados (Caradonia *et al* 2019; Yakhin *et al.*, 2017). Por serem obtidos de diversas fontes orgânicas, a maioria dos bioestimulantes possui uma composição complexa, o que gera dificuldades para determinar seus mecanismos de ação, dificultando a definição legal dessas substâncias (Conselvan *et al.* 2017; La Torre *et al.* 2016). O uso de equipamentos analíticos avançados, ferramentas de bioinformática e biologia molecular podem ajudar a compreender os mecanismos e modos de ação dos bioestimulantes e auxiliar nas adequações das legislações atuais de fertilizantes (Yakhin *et al.* 2017).

Em países da União Europeia e nos Estados Unidos, os bioestimulantes são inseridos no mercado com a mesma legislação para defensivos agrícolas e/ou fertilizantes químicos (du Jardin 2015). No Brasil, os bioestimulantes se enquadram na legislação de fertilizantes nas categorias de inoculantes e biofertilizantes (Caradonia *et al* 2019) sob o Decreto nº 4.954 de 14 de janeiro de 2004 (Brasil 2004). Uma Instrução Normativa de nº 25 de 23 de julho de 2009 (Brasil 2009) foi publicada para complementar o Decreto nº 4.954 de 2004 ampliando o registro de produtos de origem orgânica que passaram a ser enquadrados nas classes de fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes

destinados à agricultura. No entanto, a legislação brasileira não contempla o termo “bioestimulante”.

Foram criadas associações por empresas de bioestimulantes na Europa, o “*European Biostimulants Industry Council*” (EBIC), e nos EUA a “*Biostimulant Coalition*”, com intuito de gerar diálogos entre empresas, órgãos governamentais, agricultores e a comunidade científica e intensificar os esforços para a regulamentação dos bioestimulantes (La Torre *et al.* 2016; Caradonia *et al.* 2019). Novos regulamentos para os bioestimulantes podem garantir o desenvolvimento do mercado nacional e internacional, assegurando o mesmo padrão de qualidade e a concorrência justa entre as empresas fabricantes desses produtos, além de evitar confusões no intercâmbio internacional. Por exemplo, Brasil e Índia consideram os bioestimulantes como biofertilizante o que gera inconsistência no mercado internacional, uma vez que termos diferentes são utilizados para designar a mesma substância, dificultando negociações entre os países e a expansão do mercado (Caradonia *et al.* 2019).

### 2.3. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS COMO BIOESTIMULANTES VEGETAIS

Apesar dos bioestimulantes não terem uma divisão específica no regulamento de fertilizantes, organizações internacionais, como a EBIC e a comunidade científica, reconhecem oito principais categorias de bioestimulantes: substâncias húmicas (SH), extratos de algas, proteínas hidrolisadas (PHs) e aminoácidos (AA) e bactérias promotoras de crescimento de planta (BPCP) (Halpern *et al.* 2015). Compostos inorgânicos, quitosana e outros biopolímeros, além de fungos, como *Trichoderma spp* também são considerados bioestimulantes (Pascale *et al.* 2017; du Jardin 2015; Calvo *et al.* 2014).

As substâncias húmicas (SH), não possuem uma definição clara de suas estruturas bioquímicas, sendo, portanto, classificada conforme sua solubilidade em meio ácido ou alcalino. Estudos mais detalhados sobre as estruturas bioquímica das SH categorizam-nas como associações supramoleculares de moléculas orgânicas de massa molecular pequena que se mantêm unidas por forças de atração fraca conforme as ligações de Van der Waals (Piccolo 2002). As SH são resultantes da transformação e decomposição física, química e microbiológica de resíduos vegetais e animais. Ocorrem naturalmente no ambiente, particularmente em solos através de

sedimentos em processo de fossilização (Tahiri *et al.* 2016). Essas substâncias podem ser obtidas de diversas fontes de matéria orgânica, sendo uma delas a leonardita, nomeada em homenagem ao geólogo Dr. Arthur Gray Leonard (1865 – 1932) pelo seu trabalho nas reservas de lignito em Dakota do Norte, EUA (Ghabbour *et al.* 2007).

As substâncias húmicas (SH) constituem o produto final da decomposição de resíduos orgânicos e representam a maior parte da matéria orgânica na água, no solo e nos sedimentos. Aminoácidos, pectinas, carboidratos, açúcares e outros compostos também são precursores de SH. As SH são divididas em ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e huminas. Ácidos húmicos e ácidos fúlvicos representam a fração solúvel em solução alcalina e huminas a fração insolúvel (Peña-Méndez *et al.* 2005). A bioatividade das SH, pode ser ampliada a partir de interações com ácidos orgânicos presentes na rizosfera (Canellas *et al.* 2008). A estrutura macromolecular e a natureza polimérica das SH foram revisadas após a publicação de informações obtidas usando diferentes métodos, como cromatografia de exclusão por tamanho de alto desempenho (Piccolo 2002), ressonância magnética nuclear (Simpson, 2002), espectroscopia de massa (Piccolo & Spiteller, 2003; Sáiz-Jiménez *et al.* 2006) e uma abordagem matemática (Peuravuori 2005). De acordo com esses novos dados, a SH e sua fração solúvel alcalina, os AH devem ser consideradas um complexo supramolecular contendo vários compostos heterogêneos, que possuem uma massa molecular relativamente baixa, mas estão associadas dinamicamente a interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Sutton & Sposito 2005). Além das SH modularem vias hormonais, também contribuem para o aumento da produtividade das culturas indiretamente, uma vez que podem modificar a estrutura do solo, por meio da redução da compactação e retenção de umidade (Muscolo *et al.* 2007; Schiavon *et al.* 2010; Calvo *et al.* 2014).

#### 2.4. BIOESTIMULANTES COMERCIAIS DERIVADOS DE LEONARDITA

Produtos derivados de Leonardita, também denominado de humatos comerciais, podem ser formulados como grânulos e pó solúvel de liberação lenta, líquidos de aplicação direta no solo ou semente, ou como *spray* foliar (Rose *et al.* 2014). Sendo que os bioestimulantes derivados de Leonardita são ofertados no mercado há mais de cinco décadas como insumo agrícola (Burdick 1964; Tabela 1).

Recentemente, a crescente demanda por alimentos orgânicos, saudáveis e seguros impulsionou o mercado de humatos comerciais. Em relação aos insumos agrícolas convencionais, os humatos podem apresentar vantagens econômicas promovendo maior produtividade com elevada qualidade das culturas.

O uso de humatos comerciais de Leonardita tem apresentado resultados positivos significativos, tanto em condições controladas, quanto em condições de campo. Por exemplo, dois produtos comerciais o AGRO-LIG® e o ENERSOL® foram capazes de aumentar em duas vezes as raízes de emergência, resultando em maior peso das raízes (Sanders *et al.* 1990) e no aumento de até 75% na produção de cenouras (*Daucus carota L.*). O produto AGRO-LIG promoveu aumento de 99% na produção de batata (*Solanum tuberosum L.*) em experimentos de campo com uma dose de 600 kg ha<sup>-1</sup> (Ekin 2019). Um produto comercial de Leonardita, fornecido por uma empresa brasileira, a NUTRIPLANT®, aplicado por imersão das plântulas e pulverização foliar em cebola (*Allium cepa L.*) aumentou a biomassa dos bulbos, o teor de amido, de açúcares solúveis e de proteína (Bettoni *et al.* 2016). O bioestimulante granulado, o K-HUMATE® em solos calcários, com a dosagem de 15 kg ha<sup>-1</sup>, reduziu em cerca 25% o uso de fertilizantes inorgânicos NPK na produção de milho no campo, além de aumentar a produção de grãos e a absorção de nutrientes (Ibrahi & Ali 2018). Doses do humato comercial, BLACKGOLD® que variou de 0 a 80 mg L<sup>-1</sup>, sendo essas dosagens equivalente ao ácido húmico presente no humato, aumentou a área de superfície total e o peso seco total de plântulas de milho crescidas em solução nutritiva sob condições controladas na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> de AH (de Oliveira & de Sousa 2016). Já o BLACKJAK® lançado recentemente no mercado de bioestimulantes promoveu maior absorção de macro e micronutrientes, aumentou o comprimento total radicular, raízes finas e o número de ramificações em plântulas de beterraba sacarina (*Beta vulgaris L.*) cultivadas em solução nutritiva sob condições controladas (Barone *et al.* 2019).

Apesar dos resultados positivos alcançados com humatos comerciais de Leonardita em várias culturas, alguns produtos apresentam inconsistências. Por exemplo, seis produtos comerciais de leonardita ofertados por três fabricantes diferentes apresentaram uma drástica variação nos teores de ácido húmico (13,9% a 82,3%). Quando a dosagem recomendada foi aplicada em duas espécies de pastagem, a alfafa (*Medicago sativa L.*) e azevém (*Lolium multiflorum Lam.*), cultivadas em estufa, cinco dos seis produtos comerciais, não aumentaram o



crescimento da parte aérea e a biomassa das raízes (Little *et al.* 2014). Um humato conhecido comercialmente como Leonardite Plus<sup>®</sup> não aumentou o crescimento e a produção de frutos nas culturas de laranja doce (*Citrus sinensis* L.) e limão (*Citrus limon* (L.) *Burm. f.*), quando aplicado via solo no terceiro e quinto ano após o plantio nas doses recomendadas (818 kg ha<sup>-1</sup> e 511 kg ha<sup>-1</sup>) (Nemec & Lee 1992). Em câmara de crescimento, casa de vegetação e no campo, o bioestimulante K-HUMATE<sup>®</sup>, aplicado em doses crescentes (0 a 6 L ha<sup>-1</sup>), não melhorou a microbiota do solo e não aumentou o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular do trigo (*Triticum aestivum* L.) (Van Tonder 2008).

As variações apresentadas por humatos, considerando a fonte de extração, origem da matéria prima, concentração de SH, dosagem, espécie, tipo de solo e vias de aplicação precisam ser consideradas, uma vez que recomendações generalizadas no uso bioestimulantes à base SH podem resultar em efeitos negativos, gerando incertezas para o mercado (Rose *et al.* 2014; Lyons & Genc 2016). Normalmente, os rótulos dos produtos apresentam informações muito generalizadas (Tabela 1), sendo recomendadas doses únicas para diversas culturas, o que aumenta o risco de insucesso dos produtos.

**Tabela 1** - Principais bioestimulantes comerciais de substâncias húmicas derivados de Leonardita.

<b>Produto</b>	<b>Empresa</b>	<b>País</b>	<b>Benefício</b>	<b>Recomendação</b>	<b>Site</b>
ACTOSOL®	ARCTECH INC.	EUA	Melhora a estrutura do solo, aumenta atividade da microbiota do solo, absorção de nutrientes, biomassa, tolerância à estresses bióticos e abióticos.	Diversas culturas	<a href="http://www.arctech.com/actosol.html">http://www.arctech.com/actosol.html</a>
AGRO-LIG®	MINERALS TECHNOLOGIES INC.	EUA	Aumenta a absorção de nutrientes, melhora a estrutura do solo, a qualidade e o rendimento das culturas.	Diversas culturas	<a href="https://www.mineralstech.com/technologies-solutions">https://www.mineralstech.com/technologies-solutions</a>
BIOSCI HUMATES®	BIOSCI INC.	EUA	Melhora a qualidade do solo e das culturas; aumenta absorção de nutrientes, o crescimento radicular e o vigor.	Diversas culturas	<a href="https://biosci.com/biosci-humates/">https://biosci.com/biosci-humates/</a>
BLACKGOLD®	FORTGREEN	BRASIL	Aumenta o enraizamento, maior disponibilização de nutrientes no solo.	Diversas culturas	<a href="http://www.fortgreen.com.br/produto/12-Black+Gold.html">http://www.fortgreen.com.br/produto/12-Black+Gold.html</a>
BLACKHEART ACIDE SL®	GEOAGRO ITALIA	ITALIA	Melhora a absorção de nutrientes pelas raízes, promove o desenvolvimento radicular (ação semelhante à auxina), melhora a fertilidade do solo.	Diversas culturas	<a href="https://www.geoagroitalia.it/nutrizione/biostimolanti/blackheart-acide-sl-estratti-umici-liquidi-da-leonardite/">https://www.geoagroitalia.it/nutrizione/biostimolanti/blackheart-acide-sl-estratti-umici-liquidi-da-leonardite/</a>
BLACKJAK®	SUMI AGRO	FRANÇA	Promove a liberação gradual de nutrientes, manutenção da rizosfera, modula a biossíntese de proteína e ácidos nucleico, maior crescimento radicular.	Diversas culturas	<a href="https://www.sumiagro.fr/stimulation/biostimulants/blackjak">https://www.sumiagro.fr/stimulation/biostimulants/blackjak</a>

[continua]

[continuação]

DIEHARD™ HUMATE SP	HORTICULTURAL ALLIANCE INC.	EUA	Melhora sobrevivência, enraizamento, disponibilidade de nutrientes, fitossanidade, qualidade do solo; aumenta da acumulação de clorofila, açúcar e aminoácidos.	Diversas culturas	<a href="https://horticulturalalliance.com">https://horticulturalalliance.com</a>
DISPER HUMIC 85% GS	DISPER	ESPAÑA	Melhora as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, proporcionando maior disponibilidade de água e nutrientes.	Diversas culturas	<a href="http://disper.info/en/gama/disper-humic-85-gs-2/">http://disper.info/en/gama/disper-humic-85-gs-2/</a>
ECO 80® GEL	TECNOBAC LTDA	CHILE	Melhora a estrutura do solo, absorção de nutrientes, manutenção da microbiota.	Diversas culturas	<a href="http://www.tecnobac.cl/eco80gel.html">http://www.tecnobac.cl/eco80gel.html</a>
ENERSOL®	MINERALS TECHNOLOGIES INC.	EUA	Aumenta o sistema radicular, a parte aérea, a absorção de nutrientes e a produtividade; induz a tolerância à estresses abióticos.	Diversas culturas	<a href="https://www.mineralstech.com/technologies-solutions">https://www.mineralstech.com/technologies-solutions</a>
EXCALIBUR®	FERVALLE	ESPAÑA	Estimula o desenvolvimento da parte aérea, influência o metabolismo enzimático e hormonal das plantas, melhor absorção de nutrientes.	Diversas culturas	<a href="https://www.fervalle.com/pt/excalibur/">https://www.fervalle.com/pt/excalibur/</a>
FITOHÚMICO 75 P.S.	GRUPO DUWEST	PERU	Melhora a absorção de nutrientes, aumenta o tamanho dos frutos; estimula processos de desenvolvimento e formação de raízes.	Diversas culturas	<a href="http://drokasa.pe/index.php?seccion=productos_detalle&amp;id_producto=273&amp;cat=35">http://drokasa.pe/index.php?seccion=productos_detalle&amp;id_producto=273&amp;cat=35</a>
FUL-HUMIX®	BIOAG INC.	EUA	Aumenta de absorção de nutrientes do solo, atividade celular, crescimento radicular, manutenção da microbiota, sequestra íons indesejáveis do solo.	Diversas culturas	<a href="https://www.bioag.com/products/ful-humix/">https://www.bioag.com/products/ful-humix/</a>

[continua]

[continuação]

HUMATE PLUS®	PROACTIVE AGRICULTURE INC.	EUA	Melhora a estrutura do solo (aeração e estabilização de agregados), biodisponibilidade de nutrientes a logo prazo, aumenta teor de clorofila, fotossíntese, proteínas, fibras e açúcar.	Diversas culturas	<a href="http://www.proactiveag.com/humates">http://www.proactiveag.com/humates</a>
HUMIC	ADLER AGRO	ESPANHA	Melhora as propriedades do solo e aeração, aumenta a absorção de nutrientes e formação de raízes.	Diversas culturas	<a href="http://adleragro.com/productos/familia-acidos-humicos/humic/">http://adleragro.com/productos/familia-acidos-humicos/humic/</a>
HUMIC DG™	THE ANDERSONS INC.	EUA	Melhora a eficiência de nitrogênio e fósforo, melhora desenvolvimento radicular, melhora a estrutura do solo e retenção de água.	Diversas culturas	<a href="https://andersonshumates.com/products/">https://andersonshumates.com/products/</a>
HUMIC FH®	AGRIFERTIL	BRASIL	Retém e facilita a absorção de nutrientes, estimula a microbiota do solo, favorece a fotossíntese, a síntese de ácidos nucleicos, a germinação de sementes e o crescimento radicular.	Diversas culturas	<a href="http://www.agrifertil.com.br/turfa-liquida.php">http://www.agrifertil.com.br/turfa-liquida.php</a>
HUMILIG 25 PLUS	JILOCA INDUSTRIAL, SA	ESPANHA	Aumenta a disponibilidade e uso de nutrientes pela planta, maior atividade vegetativa e produtiva das culturas.	Diversas culturas	<a href="https://www.acidoshumicos.com/acidos-humicos/humilig-25-plus/">https://www.acidoshumicos.com/acidos-humicos/humilig-25-plus/</a>
HUMIPOWER SOLUBLE®	LEMDAX LTDA	BRASIL	Estimula a síntese de auxina; aumenta a biodisponibilidade de nutrientes do solo; retenção de água e nutrientes no solo; melhora a estrutura do solo.	Diversas culturas	<a href="https://lemdax.com.br/lolja/substancias-humicas/">https://lemdax.com.br/lolja/substancias-humicas/</a>

[continua]

[conclusão

HUMISOL™	NUTECH	EUA	Melhora a estrutura do solo, retenção de água e disponibilidade de nutrientes.	Diversas culturas	<a href="http://www.nutechag.com/humisol.html">http://www.nutechag.com/humisol.html</a>
HUMITA.15	HÚMICOS Y BIOLÓGICOS S.A.S	COLOMBIA / EQUADOR	Melhora a absorção de nutrientes, promove a manutenção da microbiota, melhora a germinação de sementes e o desenvolvimento radicular	Diversas culturas	<a href="https://humicosybiologicos.es.tl/HUMITA--15.htm">https://humicosybiologicos.es.tl/HUMITA--15.htm</a>
HUMITEC® WG	TRADECORP	BRASIL	Melhora a disponibilidade de nutrientes, maior enraizamento, aumento da biomassa e maior área de superfície	Diversas culturas	<a href="http://tradecorp.com.br/?product=humitec-wg">http://tradecorp.com.br/?product=humitec-wg</a>
HUMUS LIGHT® LEONARDITE	PROMISOL	ESPAÑA	Melhora estrutura do solo, promove manutenção da microbiota, retenção de água, aumenta a disponibilidade de nutrientes, maior enraizamento	Diversas culturas	<a href="https://www.promisol.com/producto/40/catalogo/acondicionadores-especificos-para-suelo/humuslight-leonardita">https://www.promisol.com/producto/40/catalogo/acondicionadores-especificos-para-suelo/humuslight-leonardita</a>
K-HUMATE®	OMNIA FERTILIZANTES	BRASIL	Melhora a estrutura do solo, melhora a eficiência dos nutrientes na planta, maior enraizamento e produtividade das culturas	Diversas culturas	<a href="https://www.omniabrasil.com.br/produtos/via-solo/k-humate/">https://www.omniabrasil.com.br/produtos/via-solo/k-humate/</a>
NATURVITAL® PLUS	DAYMSA	ESPAÑA	Melhora a estrutura do solo, retenção de água no solo, aumenta a absorção e eficiência dos nutrientes	Diversas culturas	<a href="https://daymsa.com/producto/naturvital-plus-2/">https://daymsa.com/producto/naturvital-plus-2/</a>
PERLHUMUS® GRANULES	HUMINTECH	ALEMANHA	Reduz a lixiviação de nutrientes, melhora a tolerância a estresses, aumenta a biomassa, promove o desenvolvimento radicular	Diversas culturas	<a href="https://www.humintech.com/es/agricultura/productos/granulados-productos/perlhumus-granules.html">https://www.humintech.com/es/agricultura/productos/granulados-productos/perlhumus-granules.html</a>

Estima-se que estejam disponíveis comercialmente mais de 200 produtos derivados SH no mercado. No entanto, existe uma grande variedade de métodos e processos de extração de humatos, que podem resultar em produtos com diferentes composições, mesmo sendo produzidos pela mesma empresa e com a mesma matéria prima. Muitas empresas ainda protegem seus métodos de extração como segredo industrial, o que gera dificuldade na padronização entre os fabricantes (Lyons & Genc 2016). Um estudo com dez produtos comerciais a base Leonardita, utilizando o método padrão de análise de solos “*International Humic Substances Society (IHSS) standard method*” identificou uma variação na porcentagem de ácido húmico de até cinco vezes menos do que o informado pelo fabricante (Fataftah *et al.* 2001). Estas variações no produto final dificultam a recomendação para uma variedade de culturas, solos e condições de cultivo (Yakhin *et al.* 2017; Lyons & Genc 2016).

## 2.5. MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DAS SH

Compostos com atividade bioestimulante desencadeiam diferentes processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos nas plantas. Os efeitos das SH nas plantas são variáveis e dependem da fonte de extração e dose, podendo causar: (i) aumento da eficiência de aquisição de nutrientes, por meio da síntese de proteínas transportadoras de membrana (Nardi *et al.* 2017), (ii) aumento da cinética das reações bioquímicas no ciclo de Krebs (ciclo TCA), devido a maior produção de ATP (Nardi *et al.* 2007, (iii) estímulo da atividade enzimática na membrana plasmática e parede celular (Canellas & Olivares 2014), (iv) aumento da concentração de clorofila, (v) e maior síntese de aminoácidos, carboidratos, proteínas e ácido nucleicos (Pizzeghello *et al.* 2001; Çelik *et al.* 2011).

Os estímulos causados pelas SH podem ser comparados aos causados por hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas (GA), citocininas (CK), brassinoesteróides (BR), etileno (ET), ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (JA) (Barone *et al.* 2019; Casadesús *et al.* 2019; Tahiri *et al.* 2016; Mora *et al.* 2014, Morard *et al.* 2010). Sinais exógenos fornecidos pelas SH alteram vias metabólicas e provocam alterações anatômicas no sistema radicular, acelerando, por exemplo, o processo de diferenciação e divisão celular em células de raízes laterais, favorecendo o alongamento de raízes e surgimento de pelos radiculares (Canellas

2014; Muscolo *et al.* 2013; Schmidt *et al.* 2007) resultando em maior biomassa da planta em menor tempo (Eyheraguibel & Morard 2008). As SH podem apresentar benefícios aos vegetais em diversos estágios de desenvolvimento da planta. Inicialmente, acelerando o processo de germinação de sementes (Masciandaro *et al.* 2002), e posteriormente, aumentando a área radicular e foliar durante o estágio vegetativo (Eyheraguibel & Morard 2008), induzindo a floração, aumentando a quantidade, tamanho e peso, nas fases reprodutiva e de maturação (Lima *et al.* 2014; Kovshov & Iconnicov 2017; Olivares *et al.* 2015; Azcona *et al.* 2011; Ferrara & Brunetti 2010).

### 2.5.1. Citocinina

Predominantemente sintetizadas nas raízes, as citocininas são consideradas a principal classe de hormônios envolvidas no desenvolvimento da parte aérea. Atuam no processo de diferenciação, divisão e alongamento celular, na formação do meristema apical do caule e na organogênese. Dessa forma, o hormônio, coordena a expansão da folha e senescência foliar, o desenvolvimento de flores e sementes, além de atuar no processo de germinação de sementes e absorção de nutrientes (Zalabák *et al.* 2013). A citocinina regula a distribuição do nitrogênio, através modulação da expressão do gene da família *NRT* (*Nitrate Transporter*) ligado ao transporte de nitrogênio inorgânico (Hirose *et al.* 2008; Mora *et al.* 2010; Zanin *et al.* 2018), que após ação enzimática, é incorporado em diversos compostos orgânicos, como, aminoácidos, nucleotídeos e proteínas (Xu *et al.* 2012). A ação das citocininas nos vegetais, não se limita apenas na nutrição das plantas e no desenvolvimento da parte aérea, mas tem um papel importante no desenvolvimento do sistema radicular, atuando na proliferação de raízes e no processo de iniciação de raiz lateral (Zanin *et al.* 2018; Wybouw & Rybel 2019).

As SH podem fornecer sinais exógenos semelhante aos efeitos biológicos causados por citocininas. Plântulas de pepino (*Cucumis sativus L. cv Ashley*), cultivadas em solução nutritiva e tratadas com ácidos húmicos extraídos de leonardita, tiveram aumento na biomassa da parte aérea, na concentração de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e na concentração de citocinina nas folhas (Mora *et al.* 2010). Já o tratamento

com o bioestimulante BLACKJAK® em beterraba sacarina alterou sua morfologia radicular, sendo essa alteração atribuída à modulação da expressão de um gene da via biossintética de citocinina (Barone *et al.* 2019). Em geral, a atividade de citocinina nas SH estão associadas à regulação dos genes que codificam as enzimas denominadas *LONELY GUY (LOG)* e *ISOPENTENIL TRANSFERASE (IPT)* (Barone *et al.* 2019; Pizzeghello *et al.* 2013; Hwang *et al.* 2012; Mora *et al.* 2010), que catalisam a reação de ativação da citocinina. Frações de SH extraídas de turfa (material fóssil orgânico de origem vegetal, semelhante a leonardita) também modulam a expressão do gene que codifica a enzima *CITOCININA OXIDASE DESIDROGENASE (CKX)*, envolvida na degradação da citocinina, principalmente quando ocorre regulação positiva mediada por auxina, promovendo o desenvolvimento radicular em milho (Zanin *et al.* 2018).

### 2.5.2. Giberelina

A classe de hormônio denominada giberelina (GA) modula vários processos ligados ao desenvolvimento da parte aérea, incluindo alongamento do caule, expansão das folhas, desenvolvimento de flores e sementes, além de influenciar processos de germinação (Ito *et al.* 2018). Sinais exógenos promovido por SH podem regular a transcrição de genes dependente da sinalização de giberelina (Barone *et al.* 2019).

Uma proteína denominada *DELLA* atua como regulador negativo da sinalização de GA, atuando como repressora do crescimento vegetal. As proteínas *DELLA* inibem outras proteínas responsáveis por regular a transcrição de genes envolvidos no crescimento da planta, as denominadas *PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIFs)*, pertencentes à subfamília de fatores de transcrição *bHLH*. No entanto, um receptor de GA, chamado *GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF (GID)*, ligado a GA, interage com os repressores *DELLA*, sendo que essa ligação permite que as proteínas *DELLA* sejam recrutadas pela proteína F-box em um complexo de ubiquitina ligase E3 ( $SCF^{SLY1/GID2}$ ) para poliubiquitinação, resultando na sua degradação pelo proteassoma 26S. A degradação de *DELLA* induzida por GA–*GID* permite reprogramação transcricional



de genes responsivos a GA, resultando no melhor desenvolvimento da planta, como aumento da biomassa da parte aérea (Ito *et al.* 2018; Hedden & Sponsel 2015; Sun 2010; Murase *et al.* 2008).

### 2.5.3. Ácido indol-3-acético (AIA)

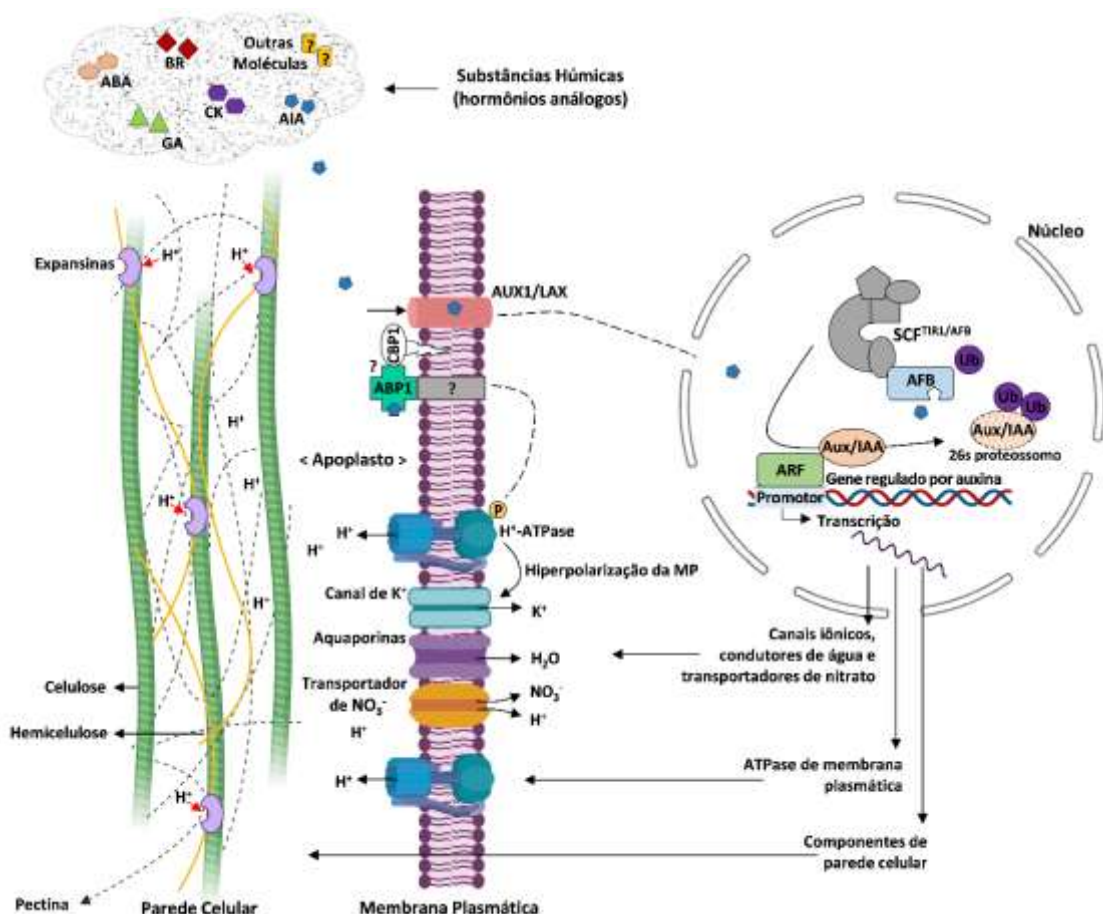
O ácido indol-3-acético (AIA) é o mais estudado entre as auxinas e mais predominante nas plantas e é conhecido por regular o crescimento e desenvolvimentos dos vegetais em três aspectos principais, divisão, alongamento e diferenciação celular (Teale *et al.* 2006). Desse modo, na raiz o AIA regula a formação da raiz embrionária, raízes laterais e de emergência, enquanto, na parte aérea, o hormônio regula a formação de flores e folhas, atuando também na distribuição dessas folhas ao longo do caule (filotaxia), além de coordenar os processos de senescência e abscisão foliar e floral (Weijers *et al.* 2018; Li *et al.* 2016; Teale *et al.* 2006).

As SH são dotadas de atividade semelhante ao AIA. A sinalização exógena fornecida por SH, além de promover efeitos biológicos similares à auxina, atuam na translocação do AIA endógeno (Trevisan *et al.* 2010). Sintetizado principalmente nas folhas jovens (Zhao 2010), necessita ser transportada para diversos tecidos e órgãos vegetais que são locais alvos da ação do fitormônio. As SH otimizam o transporte de AIA, modulando a transcrição de genes que codificam proteínas transportadoras do hormônio (Tahiri *et al.* 2016). O influxo de AIA é facilitado por membros das famílias permeases *AUXIN RESISTANT1 (AUX1)* (Marchant *et al.* 1999) e *LIKE-AUX1 (LAX1)* (Swarup & Péret 2012), e o efluxo por membros das famílias *PIN-FORMED (PIN)* (Carraro *et al.* 2006) e *P-GLYCOPROTEIN ABC transporter* (Geisler & Murphy 2006).

A sinalização por AIA influencia a expressão de um conjunto grande e diversificado de genes em uma via dependente do hormônio, a *TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT 1 (TIR1)*. Na ausência de auxina, proteínas repressoras *AUX/AIA*, se ligam a um fator de transcrição, denominado *Auxin Response Factors (ARFs)*, inibindo os *ARFs* de se ligarem a promotores de genes que são induzidos pela auxina (Mockaitis & Estelle 2008). A proteína *TIR1* e a *Auxin F-box Binding*

(AFBs), (*TIR1/AFB*), são receptoras de auxina e componentes do complexo ubiquitina E3 ligase, denominado *SCF*. Quando os complexos *SCF<sup>TIR1/AFB</sup>* são ativados pelo AIA, ubiquitinam as proteínas *AUX/AIA*, promovendo sua degradação pela proteassoma 26S (Figura 1). Com a remoção da *AUX/AIA* dos ARFs, os fatores de transcrição ficam livres, formam dímeros ARF/ARF e se ligam a uma região promotora conservada dos genes, denominada de Elementos de Resposta à Auxina (AuxRE: TGTCTC), modulando genes responsivos à auxina (Wang & Estelle 2014; Grones & Friml 2015).

Em milho, foram identificados 36 genes que codificam os fatores de respostas a auxina (*ZmARFs*) (Wang *et al.* 2012). Além de membros desta família serem regulados por auxina endógena e exógena, alguns também são regulados por microRNAs (Xing *et al.* 2011). Membros de *ZmARF* na presença de auxina induzem a expressão de genes que codificam enzimas de remodelação de parede celular, expansinas, canais iônicos e ATPase de membrana plasmática que desencadeiam o processo de expansão celular (Perrot-Rechenmann 2010) (Figura 1).



**Figura 1** - Mecanismo de expansão celular induzido por auxina exógena presente em SH. O esquema representa os efeitos na parede celular e membrana plasmática promovidos pela ação da auxina. A auxina é reconhecida por uma proteína receptora (*ABP1*) que interagem com outras proteínas de membrana plasmática. Isso ativa a bomba de prótons ATPase, provocando acidificação ( $H^+$ ) no apoplasto e, por conseguinte, ativação das expansinas que favorecem o afrouxamento da rede polissacarídica da parede celular (celulose, hemicelulose e pectina). A atividade da  $H^+$ -ATPase também induz a hiperpolarização da membrana plasmática, levando a ativação de canais iônicos como o de potássio ( $K^+$ ), sendo os íons, essenciais para geração um gradiente eletroquímico, atuando na captação de água para o meio intracelular e manter a pressão de turgor no vacúolo, contribuindo no processo de expansão celular por aumento do volume interno. A atividade da bomba de  $H^+$ , ainda, garante o influxo de nitrato para o citoplasma da célula, onde  $NO_3^-$  se acopla ao  $H^+$ , e ambos passam pelo de transportador de  $NO_3^-$ . Além dos efeitos não transcricional induzido pela auxina, também modulam a expressão de genes que codificam ATPase de membranas, canais iônicos, proteínas condutoras de água (aquaporinas), transportadores de nitrato, enzimas que atuam na remodelagem (expansinas), e outros componentes da parede celular. Esquema adaptado de Perrot-Rechenmann (2010).

A sinalização mediada por auxina tanto endógena quanto exógena, promove a ativação não transcricional das  $H^+$ -ATPases. A auxina é percebida por uma proteína receptora (*ABP1*), que interage com a proteína *CBP1* e outras proteínas desconhecidas de membrana. Essas interações provocam ativação das  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática que acarretam numa rápida acidificação por extrusão de prótons ( $H^+$ ) no apoplasto, favorecendo ações enzimáticas (expansinas) que promovem um relaxamento da parede celular, gerando condições para o alongamento celular de acordo com a teoria do crescimento de ácido (Rayle & Cleland 1992; Canellas 2014; Perrot-Rechenmann 2010). A atividade das  $H^+$ -ATPases não apenas favorece o processo de alongamento celular, como também, tem um papel importante no influxo de nutrientes. O influxo de  $NO_3^-$ , por exemplo, consiste num transporte acoplado dependente de prótons  $H^+$ . Portanto, o aumento da extrusão de prótons  $H^+$  pela ATPase de membrana plasmática possui uma relação direta com a absorção do nitrogênio pelos vegetais (Sorgonà *et al.* 2011; Mora *et al.* 2010).

Além da ativação das  $H^+$ -ATPases por auxina, o hormônio induz a expressão de uma família multigênica (*MHA*) que codificam as  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática na via *SCF<sup>TIR1/AFB</sup>* (Perrot-Rechenmann 2010). Esta mesma via é responsável pela biossíntese de canais de íons como potássio ( $K^+$ ) (Philippar *et al.* 1999), cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e sódio ( $Na^+$ ) (Sze *et al.* 1999). Modulam a expressão de genes

relacionados a transportadores de  $\text{NO}_3^-$  e canais condutores de água, conhecidos como aquaporinas (Péret *et al.* 2012). As proteínas *PIPs* são aquaporinas de membrana plasmáticas, enquanto as *TIPs* são aquaporinas de tonoplasto (Kaldenhoff *et al.* 2008). A atividade dessas proteínas condutoras, principalmente de tonoplasto, facilita o influxo de água e manutenção da pressão de turgor no vacúolo, sendo esse processo essencial para o alongamento e crescimento celular (Perrot-Rechenmann 2010) (Figura 1).

## 2.6. TRANSCRIPTÔMICA PARA ANÁLISE FUNCIONAL DE PLANTAS TRATADAS COM BIOESTIMULANTES

Os mecanismos de ação dos bioestimulantes de SH ainda não foram completamente elucidados. É comum identificar a presença moléculas similares aos hormônios vegetais nos extratos húmicos como AIA (Muscolo *et al.* 1998; Quaggiotti *et al.* 2004; Zandonadi *et al.* 2007), citocinina (Zhang & Ervin 2004) e giberelina (Conselvan *et al.* 2017) e relacionar seus efeitos na planta. No entanto, alguns bioestimulantes não apresentam esses hormônios, sendo, porém, capazes de alterar o metabolismo de plantas, aumentando seu rendimento (Elena *et al.* 2009; Jannin *et al.* 2012). Dessa forma, as interações planta-SH vão além da sinalização por moléculas com estruturas semelhantes aos hormônios vegetais presentes nos bioestimulantes. Portanto, é necessário aumentar a compreensão do modo de ação dos humatos a nível bioquímico e transcricional (Xu & Geelen 2018).

O sequenciamento *shotgun* do transcriptoma (RNA-Seq) usa sequenciamento de última geração (NGS – *Next Generation Sequencing*), sendo atualmente uma ferramenta que possui vantagens na identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs), pois considera o processo de *splicing* alternativo. Esta abordagem permite compreender as variações fenotípicas entre os tratamentos em uma amostra biológica em um determinado momento (Costa-Silva *et al.* 2017; Wang *et al.* 2009).

Entre as tecnologias NGS, uma das plataformas mais utilizadas é a Illumina (Illumina Inc., EUA). Dados gerados por esta plataforma garantem leituras de

tamanhos uniformes, além de baixa taxa de erro e maior precisão na detecção DEGs (Lahens *et al.* 2017; Quail *et al.* 2012). Esta tecnologia baseia-se no uso de fluorescência para leituras das bases em uma sequência de nucleotídeos (Lahens *et al.* 2017). Para o sequenciamento na plataforma HiSeq, utiliza-se PCR de fase sólida. Essa abordagem consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos de cDNA em uma lâmina de vidro que possui oito canaletas, sendo possível sequenciar até doze bibliotecas em cada canaleta. São fixados oligonucleotídeos (adaptadores) em cada uma das canaletas, ancorando-se a extremidade 5' na superfície da lâmina de vidro, deixando livre a extremidade 3' para o início da reação de sequenciamento dos fragmentos do cDNA, que são imobilizados por hibridização. Para isso, o cDNA é previamente fragmentado de forma arbitrária e adaptadores universais são inseridos em ambas extremidades dos fragmentos. Além disso, códigos de barra são incorporados em cada uma das bibliotecas para posterior identificação. No primeiro ciclo de amplificação dos fragmentos imobilizados, são adicionados nucleotídeos para síntese da segunda fita complementar, no ciclo de anelamento, forma-se uma estrutura denominada de “ponte”, na qual ocorre também a extensão da fita complementar. No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Esse ciclo se repete várias vezes conforme o tamanho das *reads*, gerando assim centenas de cópias do fragmento, formando *clusters* do sequenciamento. Nos ciclos de amplificação, terminadores marcados com fluoróforos que produzem quatro cores diferentes são utilizados, garantindo que a cada etapa somente um nucleotídeo é incorporado. A cada incorporação o nucleotídeo é detectado o sinal de fluorescência por um dispositivo de leitura que interpreta qual é o nucleotídeo que representa fluorescência capturada. Dessa forma, o sequenciamento ocorre em paralelo em todos os *clusters* concomitantemente (Morozova & Marra 2008; Shendure *et al.* 2011).

De modo geral, para análise da expressão diferencial utilizando-se RNA-Seq são comumente adotadas cinco etapas: (i) as amostra de RNA são fragmentadas em pequenas sequências de cDNA (DNA complementar) e sequenciadas em uma plataforma de alto rendimento; (ii) os fragmentos gerados (*reads*) são mapeados no genoma ou transcriptoma; (iii) os níveis de expressão para cada gene ou isoforma são calculados; (iv) os dados são normalizados, por exemplo, usando métodos estatísticos e conjuntos de algoritmos, permitindo a identificação de genes

diferencialmente expressos (DEGs) e (v) finalmente os dados produzidos são avaliados a partir de um contexto biológico (Costa-Silva *et al.* 2017).

O sequenciamento na plataforma Illumina/HiSeq foi utilizado para avaliar o perfil transcricional de plântulas de pepino (*Cucumis sativus*) tratadas com cápsulas de proteína hidrolisadas, um bioestimulante obtido partir de tecido conjuntivo de animais (Wilson *et al.* 2015). Neste estudo, foram encontrados um total de 620 DEGs, sendo que 455 genes foram regulados positivamente com o bioestimulante. Esses genes foram associados à síntese de proteínas, fotossíntese, metabolismo de hormônios, metabolismo secundário, remodelação de parede celular, sinalização, transporte, fatores de transcrição e indução de tolerância à estresse biótico e abiótico. A plataforma Illumina também foi empregada para analisar o transcriptoma de plântulas de milho tratadas com um bioestimulante à base de proteína hidrolisada derivada de couro bovino (Trevisan *et al.* 2017). O estudo identificou um total de 1006 DEGs, sendo que 563 genes foram regulados positivamente. O tratamento com o bioestimulante ativou vias ligadas ao estresse oxidativo (tolerância à estresse abiótico), respostas de sinalização a estímulos exógenos e endógenos, tolerância à estresse biótico, diversos fatores de transcrição, transportes de nutrientes, biossíntese de componentes e enzimas de parede celular (celulose, hemicelulose, pectina e expansinas). A análise do transcriptoma usando RNA-Seq (Illumina) mostrou em ambos experimentos que os bioestimulantes alteram o padrão de expressão de genes relacionados a diversos processos fisiológicos e metabólicos nas plantas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a variação do nível de transcritos e inferir sobre os mecanismos de ação possíveis de um bioestimulante comercial à base de SH derivado de leonardita durante o crescimento inicial de plântulas de milho.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do bioestimulante à base de SH sobre o crescimento, a nutrição e o metabolismo de plantas de milho crescidas em condições controladas;

Caracterizar rotas metabólicas e genes envolvidos na sinalização e translocação de hormônios afetados pelo bioestimulante à base de SH;

Verificar o papel do bioestimulante à base de SH na regulação da enzima marcadora  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática e nos transcritos relacionados ao hormônio auxina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO E TRATAMENTO COM BIOESTIMULANTE

Sementes do genótipo de milho L521274/CMSM033 da Embrapa Milho e Sorgo foram esterilizadas com NaClO a 0,5% (v/v) por 10 min, lavadas e imersas em água deionizada por 4 horas para pré-umbebição. Após a germinação por quatro dias em rolos de papel sob condições controladas, plântulas uniformes de aproximadamente 5 cm foram selecionadas e transferidas para um sistema flutuante contendo solução nutritiva modificada de Hoagland meia força com pH 5,65 (Liu *et al.* 1998). A solução foi trocada a cada três dias durante todo experimento. Após a aclimação das plântulas em solução nutritiva por sete dias, metade do experimento recebeu suplementação com 54,4  $\mu\text{L L}^{-1}$  do bioestimulante comercial BLACKGOLD® (equivalente a 10 mg  $\text{L}^{-1}$  de ácido húmico - AH), sendo denominado B+ (de Oliveira & de Sousa 2016). Este produto à base de SH é derivado do mineral leonardita fabricado pela FORTGREEN, foi previamente avaliado em milho em condições de hidroponia (de Oliveira & de Sousa 2016). A outra metade do experimento permaneceu apenas na solução nutritiva (controle, denominado B-). As plântulas foram mantidas na câmara de crescimento por mais sete dias com temperatura diurna de  $27 \pm 3$  °C, noturna de  $20 \pm 3$  °C sob luz fluorescente ( $330 \text{ mmol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) com fotoper\u00edodo de 12 horas e aera\u00e7\u00e3o cont\u00ednua. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com tr\u00eas repeti\u00e7\u00f5es com 36 pl\u00e2ntulas cada. As pl\u00e2ntulas coletadas foram utilizadas para os experimentos de an\u00e1lise de express\u00e3o g\u00eanica (4.2), fenotipagem (4.3) e atividade enzim\u00e1tica da  $\text{H}^+$ -ATPase de membrana plasm\u00e1tica (4.4).



## 4.2. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

### 4.2.1. Extração de RNA, Construção de Biblioteca e Sequenciamento em Larga Escala (RNA-Seq)

O RNA total foi extraído da parte aérea e da raiz de cinco plantas de milho tratadas com bioestimulante (B+) e controle (B-) com o kit de extração RNeasy Plant Mini (Qiagen, Alemanha) e tratado com 10 U de DNase I RNase-free enzyme (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada utilizando espectrofotômetro UV Nanodrop (Techno Scientific, EUA) e quantificado com o fluorímetro Fluorometer Qubit<sup>®</sup> 2.0 (Life Technologies, EUA). A qualidade do RNA foi confirmada com o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA) no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD), Universidade Estadual de Campinas, Brasil, onde as bibliotecas foram preparadas usando desnaturação e diluição para análise no sequenciador HiSeq<sup>®</sup> e GAIIx (utilizando 15 pM de amostra por lane), TruSeq<sup>®</sup> RNA Sample Preparation v2 e cBot (Illumina, EUA). As 12 bibliotecas foram sequenciadas em um sequenciador Illumina HiSeq 2500 System (Illumina<sup>TM</sup>) RNA STRANDED Módulo RAPID – Paired-End 2x150pb, com cobertura de cerca de 50M reads por amostra, sendo cada repetição sequenciada em *lanes* diferentes.

### 4.2.2. Processamento de Reads e Expressão Gênica Diferencial

A análise de qualidade das leituras foi realizada utilizando o software FastQC Ver. 0.11.4 (Andrews 2010), em seguida, o software Trimmomatic Ver. 0,39 (Bolger *et al.* 2014) foi usado para remover bases de baixa qualidade e adaptadores em cada biblioteca. Os parâmetros para esta etapa foram: PE, indicando que as sequências estão no formato paired-end; ILLUMINA-CLIP para remover possíveis sequências de adaptadores; SLIDINGWINDOW 4:15 para remover as bases com qualidade abaixo de 15 em uma janela de 4 bases; LEADING 3 e TRAILING 3 para cortar bases com baixa qualidade em ambos os lados das leituras; e o MINLEN 60

para manter leituras com pelo menos 60 bases, descartando quaisquer *reads* menores após a limpeza.

As leituras foram mapeadas utilizando-se o genoma de referência do milho cv. B73, versão 4 do banco de dados Ensembl versão 36, pelo software STAR versão 2.7.3 (Dobin *et al.* 2013) e contagem de leituras mapeadas pelo software HTSeq versão 0.11.1 (Anders *et al.* 2015). A análise de expressão gênica diferencial foi realizada utilizando o software R Ver. 3.5.3 com o pacote edgeR Ver. 3.9 (Robinson *et al.* 2010) do repositório Bioconductor (<http://bioconductor.org/packages/3.9/bioc/html/edgeR.html>). O pacote edgeR foi usado para a normalização das leituras mapeadas por gene pelo total de leituras mapeadas na biblioteca de sequenciamento, assumindo-se distribuição binomial negativa (BN), modelo proposto por Robinson *et al.* (2010), descrito como:

$$Y_{gi} \sim BN (M_i P_{gj}, \phi_g)$$

Em que,

- $Y_{gi}$  são dados relativos à contagem das *reads* mapeadas em um gene  $g$  na biblioteca  $i$ ;
- $M_i$  é o tamanho da biblioteca, equivalente ao número total das *reads* alinhadas;
- $P_{gj}$  é a abundância relativa do gene  $g$ , do grupo experimental  $j$ , pertencente à biblioteca  $i$ ;
- $\phi_g$  é o coeficiente de variação biológica do gene  $g$

Adicionalmente, outras etapas foram executadas onde o software estimou as dispersões gene a gene pelo método de Dispersão por Máxima Verossimilhança Condicional (Smyth & Verbyla, 1996). Em seguida um modelo empírico de Bayes foi aplicado para reduzir as dispersões comum a todos genes, sendo calculadas as dispersões específicas para cada gene (Robinson & Smyth 2007). Finalmente, a expressão diferencial foi avaliada para cada gene usando um teste exato, análogo ao teste exato de Fisher (teste F), com adaptações para dados superdispersos (Robinson & Smyth 2008). A partir do contraste entre os tratamentos B- e B+ e para raiz e parte aérea os genes foram considerados diferencialmente expressos pelo p-valor corrigido com o método da Taxa de Falsa Descoberta (*False Discovery Rate - FDR*) < 0,05% (Benjamini & Hochberg 1995), sendo encontrados os valores log

*FoldChange* (logFC), por meio da razão de B+ / B- e transformados para escala logarítmica de base 2 (log2FC), para representação dos genes superexpressos e reprimidos.

#### 4.2.3. Anotação Funcional de Genes Diferencialmente Expressos

Para uma visão geral da alteração transcricional, o conjunto de genes diferencialmente expressos foram submetidos ao mapeamento de vias metabólicas usando o software MapMan Ver. 3.6 (Thimm *et al.* 2004) a base de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes). Os termos *Gene Ontology* (GO) foram recuperados da anotação gerada por Wimalanathan *et al.* (2018), que apresenta cobertura de 100% de anotação dos genes de *Zea mays*. Os termos GO foram submetidos a análise de enriquecimento para a identificação de fatores sobre-representados. Foi aplicado um teste exato de Fisher sobre uma tabela de contingência (Tabela 2) e assumindo-se a distribuição hipergeométrica dos dados.

**Tabela 2** - Representação de uma tabela de contingência de expressão diferencial (DEG) e fator de anotação para aplicação do teste exato de Fisher.

	DEG	Não DEG	Total da linha
Fator anotação X	a	b	a+b
Fator de anotação: outro	c	d	c+d
Total da coluna	a+c	b+d	a+b+c+d=n

O teste exato de Fisher, é descrito como:

$$p = \frac{(a + b)! (c + d)! (a + c)! (b + d)!}{a! b! c! d! n!}$$

O teste exato de Fisher para os termos GO foi implementado em um script customizado usando *software* R Ver. 3.5.3, a sobre-representação de fator de anotação foi identificada pelo valor p ajustado, usando método FDR < 0,01. A representação gráfica dos resultados da análise de enriquecimento dos termos GO foi gerada com o pacote o ggplot2 (Wickham 2016).

#### 4.2.4. Validação dos Resultados da Análise de RNA-Seq Por qPCR

O RNA total foi isolado e tratado conforme relatado no item 4.2.1. A síntese de cDNA foi feita com 1 µg de RNA total, oligonucleotídeos randômicos e transcriptase reversa com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A análise de qPCR foi realizada no equipamento ABI 7500 FAST usando o gene da  $\beta$ -actina como controle endógeno e os genes específicos descritos na Tabela 3. A reação para o ensaio com SYBR Green foi composta por 125 ng de cDNA, reagente Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, EUA) 1X, 1µM de cada oligonucleotídeo e água ultra pura para volume final de reação de 10 µL. As condições do termociclador foram: 95 °C por 20 segundos uma vez, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos. Todas as reações foram feitas com triplicata biológica e triplicata técnica para os genes alvo e endógeno. A expressão relativa foi calculada pela diferença dos ciclos (Ct) usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001). Os valores médios da expressão relativa foram convertidos em *fold change* através da razão entre tratamento (B+) e controle (B-) para raiz e parte aérea, em seguida os valores de *fold change* foram transformados para escala logarítmica de base 2 (log<sub>2</sub>FC). Para a correlação entre os resultados de RNA-Seq e a expressão relativa do qPCR foram utilizados os valores de log<sub>2</sub>FC de ambas análises, aplicando o coeficiente de correlação linear de Pearson (Pearson 1909), descrito, como:

$$r = \frac{\sum (x - x^0) \cdot (y - y^0)}{(n - 1) \cdot S_x \cdot S_y}$$

Em que,

- $x^0$  é a média do conjunto de dados da primeira variável;
- $S_x$  é o desvio padrão do conjunto de dados da primeira variável;
- $y^0$  é a média do conjunto de dados da segunda variável;
- $S_y$  é o desvio padrão do conjunto de dados da segunda variável.

A significância do coeficiente de correlação foi testada, via determinação do valor p, sendo testadas as hipóteses nulas e alternativa. Esses testes foram

executados usando o software RStudio Ver. 1.1.453 com o pacote ggpubr Ver. 0.2.4 (Kassambara 2017) do repositório CRAN (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/index.html>).

Além desses, foi calculado o coeficiente de determinação  $R^2$ , com o programa Microsoft® Excel® Versão 1902 (Office 365 ProPlus), através do modelo matemático:

$$r^2 = \frac{\sum (\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum (y - \bar{y})^2} = \frac{SQ_{res}}{SQ_{tot}}$$

Em que,

- $\hat{y}$  é o  $y$  estimado e  $\bar{y}$  é a média de  $y$ ;
- $SQ_{res}$  é o somatório dos quadrados dos resíduos;
- $SQ_{tot}$  é o somatório dos quadrados totais.

Os valores de expressão de quatorze genes sendo seis desses expressos em ambos tecidos, totalizando dez transcritos para raiz e dez para a parte aérea, foram correlacionados para validação do RNA-Seq por qPCR (Tabela 2).

Adicionalmente, vinte e oito genes de milho relatados na literatura por estarem envolvidos em diferentes processos relacionados aos mecanismos de ação de diferentes bioestimulantes foram selecionados para análise de expressão gênica por qPCR (Tabela 3). Os oligonucleotídeos foram retirados da literatura ou desenhados com o software Primer3Plus, (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Sequência dos oligonucleotídeos para análise de qPCR.

<b>GENE</b>	<b>ACESSO</b>	<b>OLIGONUCLEOTÍDEO (5' - 3')</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<i>PIN1a</i>	DQ836239	GCAGGGCAAGGCGAACAAGTACGGCCAG GGCGACGGCCATGCGGACCTCCTTGAC	Forestan <i>et al.</i> 2010
<i>PIN1b</i>	DQ836240	CCGACCCGTGGGTGATGGCAATGGCA CTCAAGCCATCAAACCTCCGGAGGTGAGC	Forestan <i>et al.</i> 2010
<i>PIN1c</i>	EU570251	TGACCGTCTCATCCCCATGGAGTCGAGG ATCTCTCCTGTCATAACTCAGAATGG	Forestan <i>et al.</i> 2010
<i>NRT2.1</i>	AY129953	ATCTTCGGGGTTCATCCCCTTTGTCT CAGCGTGCACGCCATGATCAT	Sorgonà <i>et al.</i> 2011
<i>MHA1</i>	U09989	GATGCTTGCCTCTGCGGTATAC TTCTTCTTGCTTGTGAATGCGA	Sorgonà <i>et al.</i> 2011
<i>MHA2</i>	GRMZM2G019404	AACACCTTTGCTGCCCCGAC GAAACTCCCTAGAAAGACGG	Pii <i>et al.</i> 2016
<i>MHA3</i>	AJ441084.1	GACCTTCCTCGCTGTCTACG TGATCAGGTCCAGAGGGAAG	Sorgonà <i>et al.</i> 2011
<i>MHA4</i>	AJ539534.1	GAGAACAAGACCGCCTTCAC CTTGTTGTTCTTGCGACGAC	Sorgonà <i>et al.</i> 2011
<i>LAX1</i>	GRMZM2G129413	CTCCGTCGCCGATGATCAAC GCTGCGTGCTGATGACCAAG	Zhang <i>et al.</i> 2014
<i>LAX2</i>	GRMZM2G149481	CATCACGATGCCATTCAACG CACGCACTACTGGTGGTAAG	Zhang <i>et al.</i> 2014
<i>LAX3</i>	GRMZM2G127949	TCACCGTCTACATCATCCCG GAACGTGTGATCTGCCTCA	Yue <i>et al.</i> 2015
<i>ARF8</i>	GRMZM2G034840	GCGAGAATGGCGTGCATGTC ACAAGAAGAGCCGCTGCGTG	Zhang <i>et al.</i> 2014
<i>ARF37</i>	GRMZM2G086949	CTTCGGAAGTACAGCAGATG ACACTGTGCAGGCTGTAGAG	Zhang <i>et al.</i> 2014

[continua]

[continuação]

<i>NAC1</i>	GRMZM2G081930	CGACCATGTGGCAGTACAGCTC CAGTTGGTGCCTTGCCTCCTCA	Zhang <i>et al.</i> 2014
<i>HSCF1</i>	GRMZM2G139082	TCTGGATCTGCTGGCTACGAGG GTCAGCGCATGCACCTACTCCA	Zhang <i>et al.</i> 2014
<i>BBM1</i>	GRMZM2G366434	CTAACAACTGGAGCTCTCCT AACCAGAACCTGAGCACGTC	Zhang <i>et al.</i> 2014
<i>PLT1</i>	GRMZM2G141638	GAGCAACCACTACATCGGCA TGCAGACATCCTTCCGCCAC	Zhang <i>et al.</i> 2014
<i>PIN2</i>	JQ421085.1	TATTATCCGACGCAGGGCTA TTACCGCAGGAGATGAGCTT	Forestan <i>et al.</i> 2012
<i>PIN9</i>	GRMZM5G859099	ATTCTCGATGCCGAAGATTG GCTATGAACGTCCCTGAAGC	Forestan <i>et al.</i> 2012
<i>FMO</i>	Zm00001d004387	GGCCCATGTACCAGTACTCC GTAGGCGTCCAGGTAGGACA	-
<i>P450</i>	Zm00001d007924	GACCTGCTGGACATCCTCAT CCTTGATGTTCTCCCTGGTC	-
<i>PEP10</i>	Zm00001d029776	AGTACACCGCGCTCTACAGG GCGACACCGAGTAGTTGAAA	-
<i>POXI</i>	Zm00001d018619	GACGTGGTGTCAAGGAGAT AAGCAGTCGACGGAGAAGAG	-
<i>AASR1</i>	Zm00001d023529	GTCCCTCCCCGTGTGCTA TGCATCACACGAGCGCATA	-
<i>PPR</i>	Zm00001d015377	AGCCCAACATCTGCACCTAC CTCCTCGAACACCTCCTCTG	-
<i>cAMP</i>	Zm00001d038618	CAAGTACGTCACGCAGCACT CAGCCGGGCGAGTAGTAG	-

[continua]

[continuação]

<i>PCY</i>	Zm00001d018744	CCAAGGTGACGATGCTGTC CAGGAGCAAGCAGGAGTGA	-
<i>YSL2</i>	Zm00001d025977	AGATCACGTCGCAAGAACCT GTCCCTGTTGAACACCTCGT	-
<i>MYB48</i>	Zm00001d024547	GGAGGTGAATTCCTCTGGTG AAGGAACCGTTTGTGCTCAG	-
<i>UMC2403</i>	Zm00001d002159	GTGGATGGTGGCCATGAG GTAGTTCCAGCGGCAGAGG	-
<i>THI1</i>	Zm00001d011183	CTACGACCTGACGTCCTTCC ATGTAGCGACGGGTCATCTC	-
<i>HSP20</i>	Zm00001d021634	CTTACCCAATGGAGGAGCAG GGGATGAGAGGAGGGAGAAG	-
<i>PPL</i>	Zm00001d050635	CATCTACGGCGAGAAGTTCC GAATTGAGAGCCGTTGGTGT	-
<i>HGT</i>	Zm00001d048711	GACAAGTCCAACCCAGCTA TCGAAGGAGTTGACGAGGAT	-
<i>ALAMY</i>	Zm00001d020350	ACAAGGTCATGCAGGGCTAC AAACCCCCAGTCGAAGAAGT	-
<i>EXO</i>	Zm00001d044864	GGAAGCTCATGTTCTCGTC CGTACCAGAGGATGGAGACC	-
<i>PLAT</i>	Zm00001d008730	AGTGGGTCAGGGTGTACGAG GGTCGCCGTAGTAGAAGGTG	-
<i>TPR</i>	Zm00001d050299	AGCATCAAGCCGATCTCTGT GTCTGTGTTGCAGGGACAAC	-
<i>MNMG</i>	Zm00001d030034	ACCCTCAAGCTCTCCCTCTC CCGGTAGTACCAGGAGCAAG	-
<i>SAUR54</i>	Zm00001d016582	AGGTCATGTGGGAGATGGAG GCACGTGGTGGTAGCCTCTA	-

[continua]



[conclusão]

<i>H3C2</i>	Zm00001d025406	TCCGCAAGTACCAGAAGAGC AGGTCCGTCTTGAAGTCCTG	-
<i>CSU337</i>	Zm00001d005146	CACCAGCAGCAAGTCGTC CACCACCAGGACGGACAC	-
<i>GHP</i>	Zm00001d002410	GCTCCAAGGACACGTACCTC CCCCTCCGAGATGAAGTAGA	-
<i>β-actina</i>	XM_008656735.2	TCCTGACACTGAAGTACCCGATTG CGTTGTAGAAGGTGTGATGCCAGTT	-

### 4.3. FENOTIPAGEM

#### 4.3.1. Caracterização da Morfologia Radicular

Quatro plântulas de milho crescidas sob as condições descritas no item 4.1 foram separadas em raiz e parte aérea, sendo o sistema radicular fotografado com uma câmera digital (Nikon D300S SLR). As imagens capturadas foram convertidas para escala de cinza de oito bits usando um plug-in customizado ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e processadas usando o software RootReader2D (<http://www.plantmineralnutrition.net/>). As imagens foram importadas para o software WinRHIZO (Régent Systems, Canadá) para análise de diversos parâmetros radiculares, como comprimento total de raiz (CRT) (cm), área de superfície total (AST) (cm<sup>2</sup>), diâmetro radicular médio (DM) (mm), área de superfície de raízes superfinais (diâmetro entre 0,0 e 1,0 mm) (AS1), raízes finas (diâmetro entre 1,0 e 2,0 mm) (AS2) e raízes grossas (diâmetro maior do que 2,0 mm) (AS3) (cm<sup>2</sup>) (de Sousa *et al.* 2012).

#### 4.3.2. Determinação de Peso Seco e Macro e Micronutrientes

Após a obtenção das imagens radiculares, as raízes e parte aérea foram colocadas separadamente em sacos de papel e secos em estufa de circulação forçada a 65 °C por 72 horas em seguida pesados em balança de precisão. O peso seco total (PST) foi calculado pela somatória do peso seco da parte aérea (PSPA) e o peso seco de raiz (PSR).

As análises de macro e micronutrientes foram realizadas no Laboratório de Análise Química de Plantas da Embrapa Milho e Sorgo. As amostras foram moídas separadamente em um moinho Wiley Mill por 3 minutos. A determinação de macro e micronutrientes foi feita por digestão nitro-perclórica e análise por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado ICP-OES (VARIAN, 720-ES, Austrália). Para determinação do nitrogênio (N), foi usado um analisador elementar (LECO, FP-528, USA), por combustão, conforme o método Dumas (Dumas 1831). O conteúdo de

cada elemento foi calculado multiplicando-se a concentração do nutriente pelo peso seco.

### 4.3.3. Análise de Dados

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições com quatro plantas cada. Os resultados de caracterização radicular, peso seco e macro e micronutrientes obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo o programa computacional SISVAR versão 5.4 (Ferreira 2011) e as médias comparadas pelo teste LSD ( $p < 0,05$ ).

## 4.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA H<sup>+</sup>-ATPase

### 4.4.1. Isolamento de Membranas

Vesículas de membrana plasmática foram isoladas do sistema radicular de plântulas milho crescidas conforme descrito no item. 4.1. Para o isolamento das vesículas, seguiu-se o protocolo descrito por Zandonadi *et al.* (2007), sendo que todos os procedimentos foram realizados a 4 °C. Três réplicas biológicas compondo 10 g de raiz (peso fresco), foram homogeneizadas usando um almofariz e pistilo em 20 mL de tampão gelado contendo sacarose 250 mM, glicerol 10% (m/v), PVP-40 0,5% (m/v), EDTA 2 mM, BSA 0,2% (m/v), KCl 150 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM, Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8. O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gazes e centrifugado a 1.500 x g por 10 min. O sobrenadante foi centrifugado a 8.000 x g por 10 min e posteriormente a 100.000 x g por 40 min. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL da solução tampão a 4 °C contendo glicerol 10% (v/v), DTT 1 mM, EDTA 1 mM e Tris-HCl pH 10 mM pH 7,5. As vesículas foram utilizadas imediatamente ou congeladas sob N<sub>2</sub> líquido e armazenadas a -80 °C. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método Bradford (1976).

#### 4.4.2. Determinação da Atividade H<sup>+</sup>-ATPase

A atividade ATPásica foi determinada pela medida da liberação de Pi segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske & Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição de ATP e interrompida através da adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10% (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2% + Ácido Ascórbico 1% (100:1) e após 20 minutos foi feita à leitura em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-2000, Japão) no comprimento de onda de 750 nm. Nesta reação o fosfato foi incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul. O meio de reação foi composto por 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico] -Tris pH 6,5, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de KCl e 1 mM de ATP e 50 µg de proteína. Foi utilizado 0,2 mM de ortovanadato de sódio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), de um inibidor da ATPase do tipo P (De Michelis & Spanswick 1986). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H<sup>+</sup>-ATPase foi medida a 30 °C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a ATPase do tipo P.

#### 4.5. DETERMINAÇÃO DO pH RIZOSFÉRICO

As sementes da cultivar de milho L521274/CMSM033 foram esterilizadas com NaClO a 0,5% (v/v) por 10 min, lavadas e imersas em água deionizada por 4 horas. Após a germinação por três dias em rolos de papel, plântulas uniformes foram imersas em solução do BLACKGOLD (10 mg L<sup>-1</sup> de ácido húmico) em solução de AIA a 1 µM (controle positivo) e em água ultrapura (controle negativo) por 60 min. Após esse período, as plântulas, foram colocadas em placa de Petri cobertas por uma camada de 5 mm de meio nutritivo, contendo MS 4,41 g L<sup>-1</sup>, ágar 1% (m/v) e indicador púrpura de bromocresol 0,04 g L<sup>-1</sup>, com o pH ajustado para 6,8. A alteração da cor púrpura para amarela corresponde à região acidificada pelas raízes. As imagens foram capturadas após 6 horas de incubação. Um experimento controle foi realizado com vanadato (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 500 µM), um inibidor da ATPase do tipo P. As alterações de pH da rizosfera foram determinadas com eletrodo com elevada sensibilidade (Zandonadi *et al.* 2010)

#### 4.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) DO BIOESTIMULANTE COMERCIAL BLACKGOLD®

Uma alíquota do bioestimulante comercial BLACKGOLD® foi diluída 1000 vezes com água ultrapura e tratada com trimetilsilil-diazometano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As amostras foram analisadas em duplicata, incubadas a 4 °C por 3 h e lavadas duas vezes com água. A concentração de AIA foi determinada com kit Phytodetek-IAA, Agdia, EUA, de acordo com as recomendações do fabricante. O anticorpo monoclonal anti-AIA contido no kit possui alta especificidade para o AIA metilado. A produção e a caracterização do anti-AIA monoclonal de alta afinidade foram descritas por Mertens *et al.* (1985).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANÁLISE DO TRANSCRIPTÔMICA DE PLÂNTULAS DE MILHO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM BIOESTIMULANTE A BASE DE SH

As amostras de RNA apresentaram alta qualidade, sendo o *RNA Integrity Number (RIN)* superior a oito (Tabela 4). A partir do RNA foram elaboradas doze bibliotecas de RNAseq, correspondentes as amostras de raiz e parte aérea (B- e B+) de plântulas de milho em triplicata biológica, que foram sequenciadas na plataforma Illumina e geraram um total de 264,3 milhões de *reads*, com uma média de 22 milhões de *reads* por biblioteca (Tabela 5), sendo essa distribuição homogênea. Entre 91 a 94% das *reads* foram mapeadas em posição única no genoma de referência do milho cv. B73, versão 4.

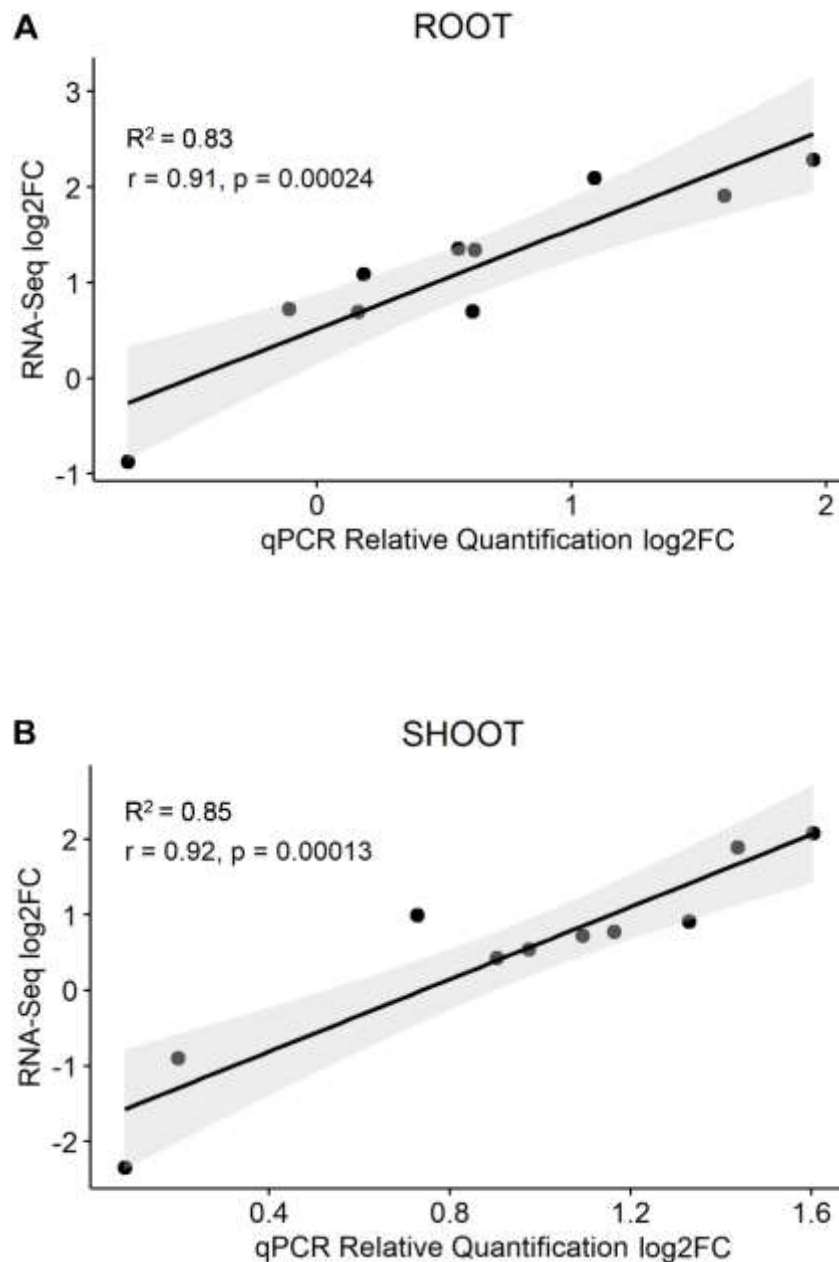
**Tabela 4** - Qualidade do RNA avaliada por Bioanalyzer, expresso em RNA Integrity Number (RIN), das amostras de raiz e parte aérea tratadas com bioestimulante (B+) e controle negativo (B-).

Samples	B- rep1	B- rep2	B- rep3	B+ rep1	B+ rep2	B+ rep3
<b>Root</b>	8.60	8.70	8.90	8.60	9.60	8.10
<b>Shoot</b>	8.70	8.30	8.70	9.10	9.00	8.90

**Tabela 5** - Total de *reads* obtidos para cada biblioteca de raiz e parte aérea de plântulas de milho submetidas aos tratamentos com bioestimulante (B+) e controle negativo (B-).

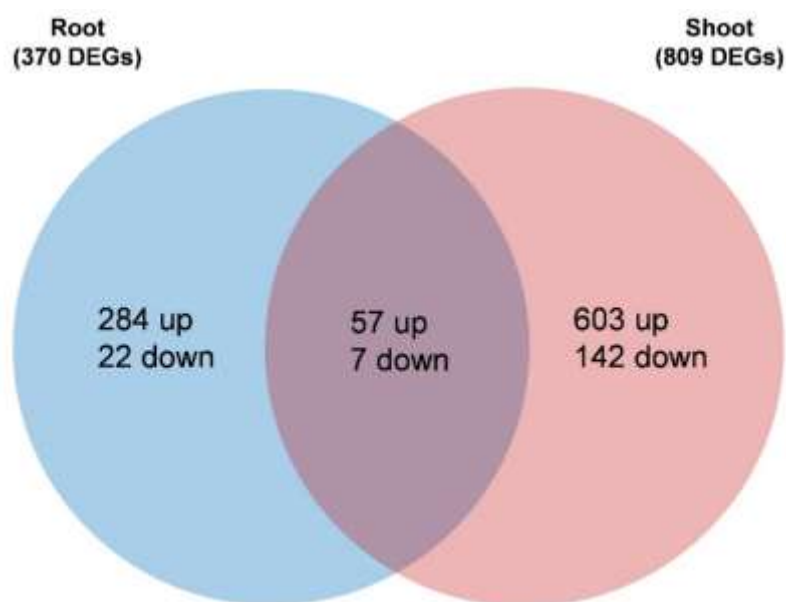
Samples	Condition	Input	Uniquely mapped reads	Multiple mapped reads
<b>Root</b>	B- rep1	28174387	25653528 (91.05%)	2163285 (7.68%)
	B- rep2	18234340	16718751 (91.69%)	1392921 (7.64%)
	B- rep3	27316111	24976823 (91.44%)	2122926 (7.77%)
	B+ rep1	20028192	18421777 (91.98%)	1491934 (7.45%)
	B+ rep2	20376573	18755829 (92.05%)	1441200 (7.07%)
	B+ rep2	25326062	23415689 (92.46%)	1742855 (6.88%)
<b>Shoot</b>	B- rep1	19944269	18748797 (94.01%)	1075839 (5.39%)
	B- rep2	20432346	19192425 (93.93%)	1094566 (5.36%)
	B- rep3	22216849	20876276 (93.97%)	1199800 (5.40%)
	B+ rep1	17620774	16457307 (93.40%)	995337 (5.65%)
	B+ rep2	24946987	23364121 (93.66%)	1386928 (5.56%)
	B+ rep2	19671662	18519222 (94.14%)	1056467 (5.37%)

Para validação dos dados de RNA-Seq, quatorze DEGs modulados pelo bioestimulante foram selecionados e analisados por qPCR. Foi obtida uma correlação significativa ( $p < 0,001$ ) entre os dados de RNA-Seq e qPCR tanto na raiz ( $r = 0,91$ ), quanto na parte aérea ( $r = 0,92$ ), indicando a confiabilidade das análises (Figura 2).



**Figura 2** - Correlação de Pearson entre as análises de RNA-Seq e qPCR dos genes modulados no sistema radicular (A) e parte aérea (B) em plântulas de milho tratadas com bioestimulante à base de substâncias húmicas e controle.

A análise do transcriptoma de milho mostrou alterações significativas após o tratamento com bioestimulante à base de SH. Foram identificados um total de 1.179 DEGs em raiz e parte aérea (PA) a partir das comparações entre as plantas tratadas e o controle (Raiz B- vs Raiz B+; PA B- vs PA B+), utilizando-se o parâmetro *False Discovery Rate* (FDR) a 5%. A raiz apresentou 370 DEGs, sendo 341 superexpressos e 29 reprimidos. Já a parte aérea teve 809 DEGs, desses 660 superexpressos e 149 reprimidos (Figura 3). Uma comparação entre os DEGs de raiz e PA revelou que 64 genes diferencialmente expressos (5,4%) são compartilhados entre os tecidos, sendo 57 superexpressos e 7 reprimidos. De modo geral, o tratamento com o bioestimulante levou a uma maior superexpressão dos genes (80,1%) nas condições avaliadas.



**Figura 3** - Diagrama de Venn mostrando a distribuição de genes específicos e comuns à raiz e parte aérea de plantas de milho submetidas ao tratamento com bioestimulante à base de SH.

Para investigar a função biológica dos DEGs em resposta ao bioestimulante, foi realizada a anotação funcional dos genes com enriquecimento dos termos GO, que foram divididos nas categorias processos biológicos (A), função molecular (B) e componente celular (C) (Figura 4).



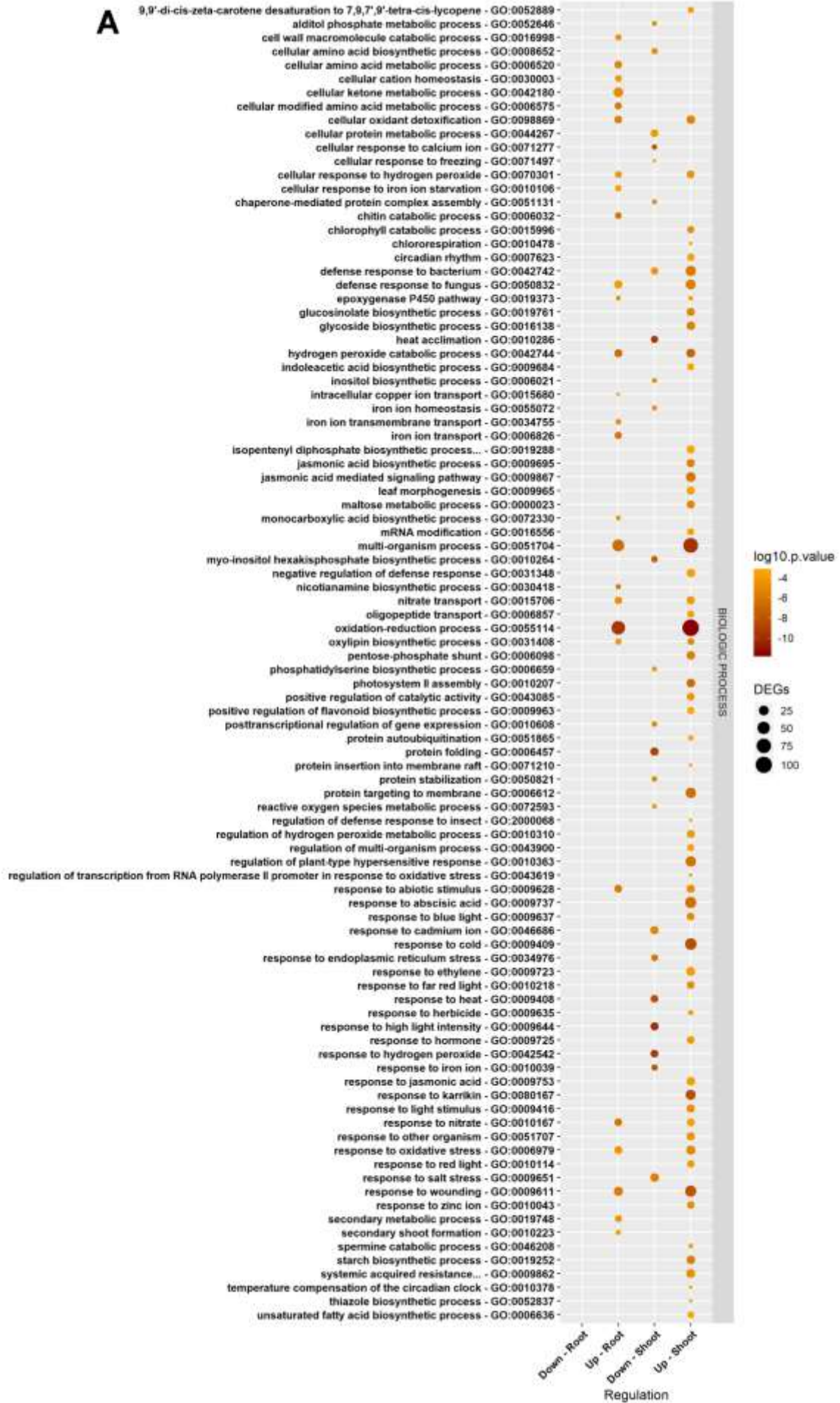
Na categoria processos biológicos os 29 DEGs reprimidos identificados na raiz (Figura 3) não agruparam dentro dos termos GO quando submetidos à análise de enriquecimento (Figura 4A), enquanto os transcritos superexpressos foram agrupados em *cellular amino acid metabolic process* (GO:0006520), *cellular ketone metabolic process* (GO:0042180), *chitin catabolic process* (GO:0006032), *intracellular copper ion transport* (GO:0015680), *iron ion transport* (GO:0006826) e *nicotianamine biosynthetic process* (GO:0030418). Os genes reprimidos identificados na parte aérea foram agrupados em *heat acclimation* (GO:0010286), *response to salt stress* (GO:0009651), *protein folding* (GO:0006457), *response to high light intensity* (GO:0009644), enquanto os superexpressos agruparam em *chlorophyll catabolic process* (GO:0015996), *photosystem II assembly* (GO:0010207), *protein targeting to membrane* (GO:0006612), *starch biosynthetic process* (GO:0019252), *response to cold* (GO:0009409), *response to karrikin* (GO:0080167), *response to hormone* (GO:0009725), *indoleacetic acid biosynthetic process* (GO:0009684), *jasmonic acid biosynthetic process* (GO:0009695), *jasmonic acid mediated signaling pathway* (GO:0009867), *response to abscisic acid* (GO:0009737), *response to ethylene* (GO:0009723) (Figura 4A). DEGs superexpressos tanto em raiz quanto na parte aérea foram agrupados em *oxidation-reduction process* (63 e 106 DEGs na raiz e parte aérea, respectivamente), *multi-organism process*, (43 e 77), *response to wounding* (22 e 38), *defense response to fungus* (16 e 28), *response to oxidative stress* (14 e 22), *hydrogen peroxide catabolic process* (14 e 20), *cellular response to hydrogen peroxide* (9 e 13), *response to nitrate* (13 e 14) e *nitrate transport* (11 e 15) (Figura 4A).

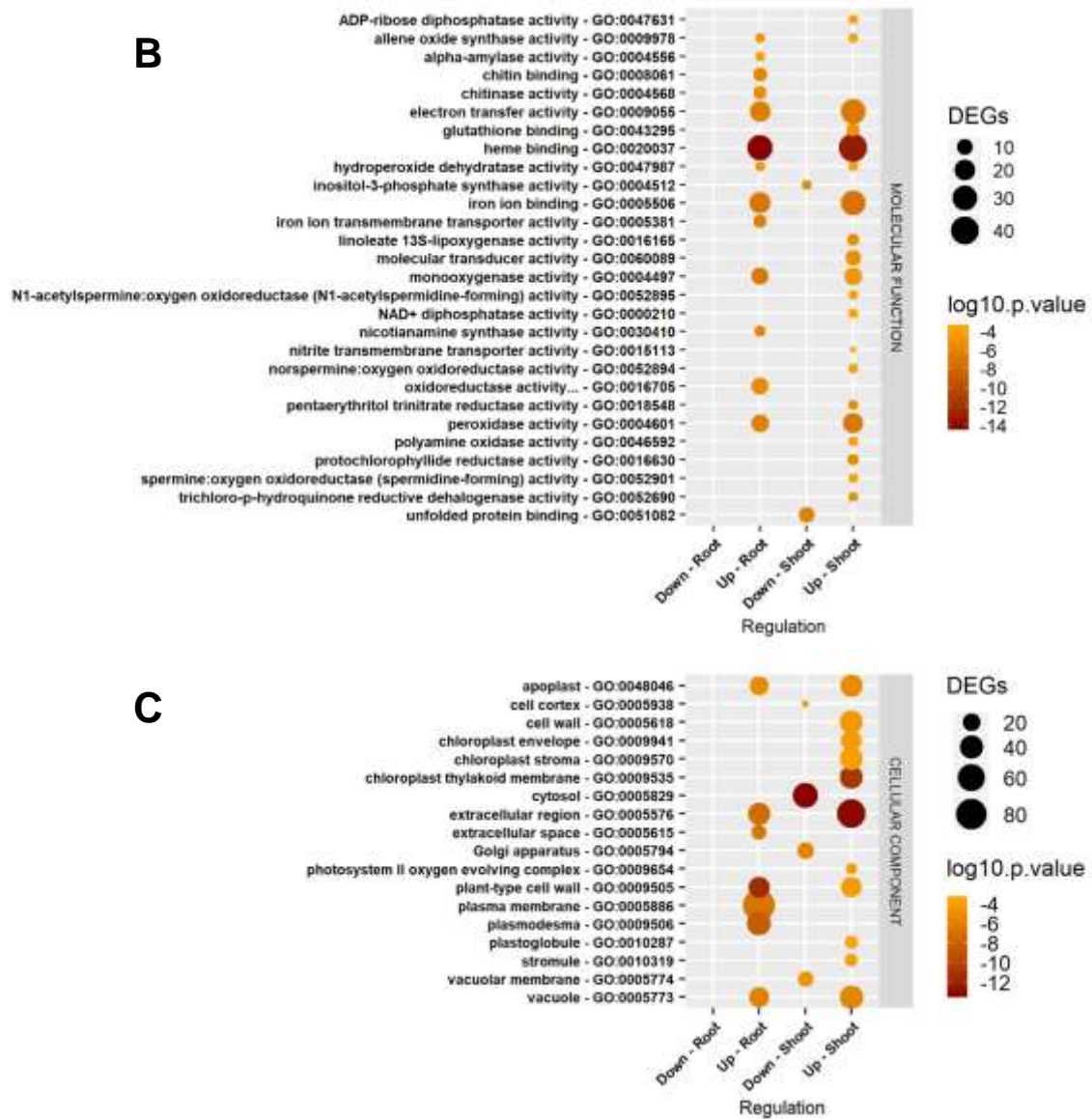
Não houve agrupamento para os DEGs reprimidos de raiz na categoria função molecular (Figura 4B). Entretanto, os genes superexpressos foram agrupados em *alpha-amylase activity* (GO:0004556), *chitinase activity* (GO:0004568), *chitin binding* (GO:0008061), *iron ion transmembrane transporter activity* (GO:0005381), *nicotianamine synthase activity* (GO:0030410) e *oxidoreductase activity* (GO:0016705). Os genes reprimidos na parte aérea formaram apenas dois grupos, o *inositol-3-phosphate synthase activity* (GO:0004512) e *unfolded protein binding* (GO:0051082), enquanto os genes superexpressos para função molecular, forma agrupados principalmente em *glutathione binding* (GO:0043295), *linoleate 13S-lipoxygenase activity* (GO:0016165), *nitrite transmembrane transporter activity* (GO:0015113) e

*protochlorophyllide reductase activity* (GO:0016630). Considerando os dois tecidos analisado, houve agrupamento relativo à função molecular nos termos *heme binding* (32 e 43, DEGs em raiz e parte aérea, respectivamente), *electron transfer activity* (20 e 30,) *iron ion binding* (21 e 31), *monooxygenase activity* (12 e 13) e *peroxidase activity* (13 e 19) (Figura 4B).

A análise de anotação funcional de termos GO enriquecidos para componentes celular não revelou nenhum agrupamento para os DEGs reprimidos na raiz, no entanto, para os DEGs superexpressos, a análise agrupou em *plasma membrane* (GO:0005886), *extracellular space* (GO:0005615) e *plasmodesma* (GO:0009506). Já para os genes reprimidos na parte aérea houve agrupamento em *cytosol* (GO:0005829) e o *Golgi apparatus* (GO:0005794), enquanto para os superexpressos, os DEGs foram agrupados em *cell wall* (GO:0005618), *chloroplast thylakoid membrane* (GO:0009535), *chloroplast envelope* (GO:0009941) e *chloroplast stroma* (GO:0009570) (Figura 4C).

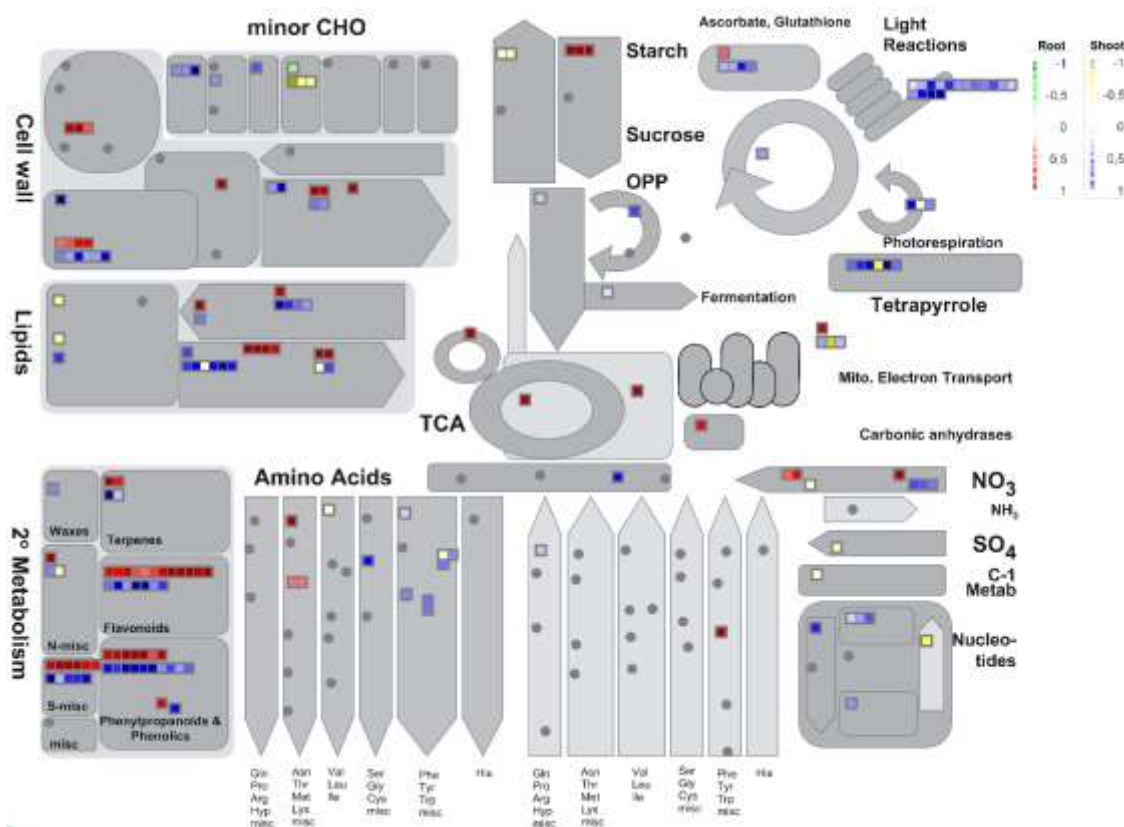
A análise também identificou termos GO enriquecidos para DEGs superexpressos em ambos tecidos, sendo eles *extracellular region* (34 e 65 DEGs em raiz e parte aérea, respectivamente), *plant-type cell wall* (30 e 28), *apoplasto* (23 e 35) e *vacuole* (26 e 39) (Figura 4C).





**Figura 4** - Atribuição dos genes de raiz e parte aérea de milho submetido ao tratamento com bioestimulante diferencialmente expressos a termos ontológicos (GO terms) enriquecidos nas categorias Processos Biológicos (A), Função Molecular (B) e Componente Celular (C).

Nas vias metabólicas afetadas pelo tratamento com o bioestimulante à base de SH, foram observados 65 pontos de um total de 425 DEGs mapeados na raiz (15,3%). Já na parte aérea foram observados 125 pontos de um total de 895 DEGs mapeados (13,9%). Tanto em raiz quanto em parte aérea destacaram-se as vias relacionadas a *cell wall*, *lipids*, *secondary metabolism* e *nitrate assimilation* ( $\text{NO}_3^-$ ). Na avaliação individual, as vias *light reactions*, *photorespiration* e *tetrapyrrole*, destacaram-se na parte aérea (Figura 5).



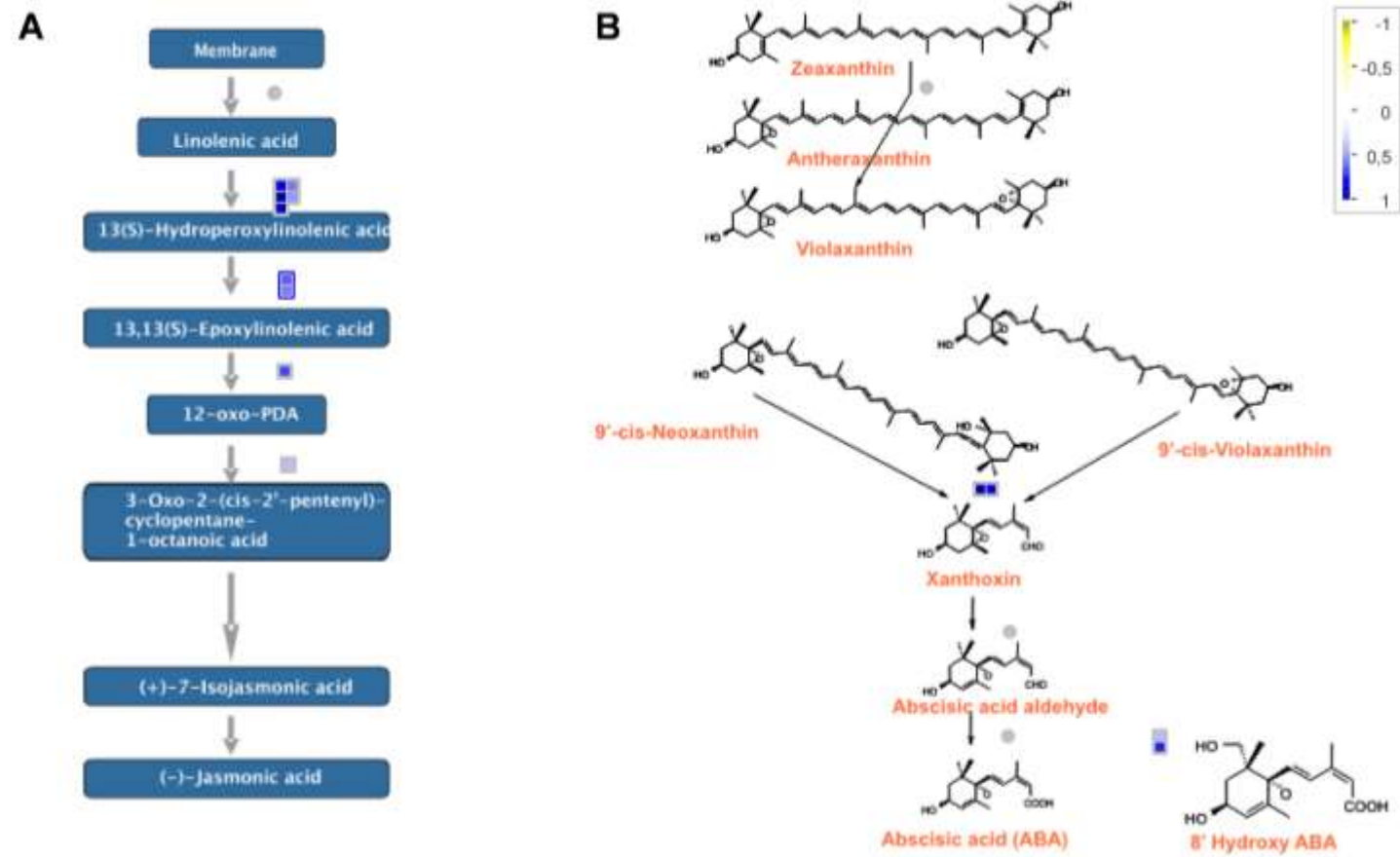
**Figura 5** - Perfil de expressão dos genes diferencialmente expresso em raiz e parte aérea de plantas de milho submetidas a tratamento com bioestimulante à base de SH representada na plataforma Mapman. Todos resultados foram apresentados numa escala log2 correspondendo o FDR 0,05% de significância. As cores vermelhas e azuis representam os genes superexpressos em raiz e parte aérea, respectivamente. As cores verdes e amarelas representam os genes reprimidos em raiz e parte aérea, respectivamente.

A anotação dos DEGs no *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) mostrou que as vias metabólicas relacionadas aos DEGs superexpressos tanto na raiz quanto na parte aérea estão categorizadas como *phenylpropanoid biosynthesis: map00940* (13 e 14 DEGs de raiz e parte aérea, respectivamente), *amino sugar and nucleotide sugar metabolism: map00520* (6 e 4), *starch and sucrose metabolism: map00500* (3 e 7), *mTOR signaling pathway: map04150* (5 e 8) (Tabela S1) e *thermogenesis: map04714* (4 e 7). Para os DEGs de parte aérea superexpressos, duas vias foram destacadas, *phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis: map00400* e a *glutathione metabolism: map00480* (Figura 6).

Estão destacadas as vias biossintética de hormônios vegetais, ácido jasmônico e ácido abscísico, moduladas pelo bioestimulante (Figura 7).



**Figura 6** - Anotação dos genes diferencialmente expressos em raiz e parte aérea de milho submetidos ao tratamento com bioestimulante realizada no *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG).



**Figura 7** - Vias de biossíntese dos fitormônios ácido jasmônico (JA) e ácido abscísico afetadas pelo bioestimulante (B+) na parte aérea das plântulas de milho representada na plataforma Mapman. Genes superexpressos envolvidos na síntese de precursores para formação do JA (A) e precursores para formação do ABA (B). Na escala localizada no canto superior direito, a cor azul representa os genes superexpressos, enquanto a cor amarela representa os genes reprimidos.

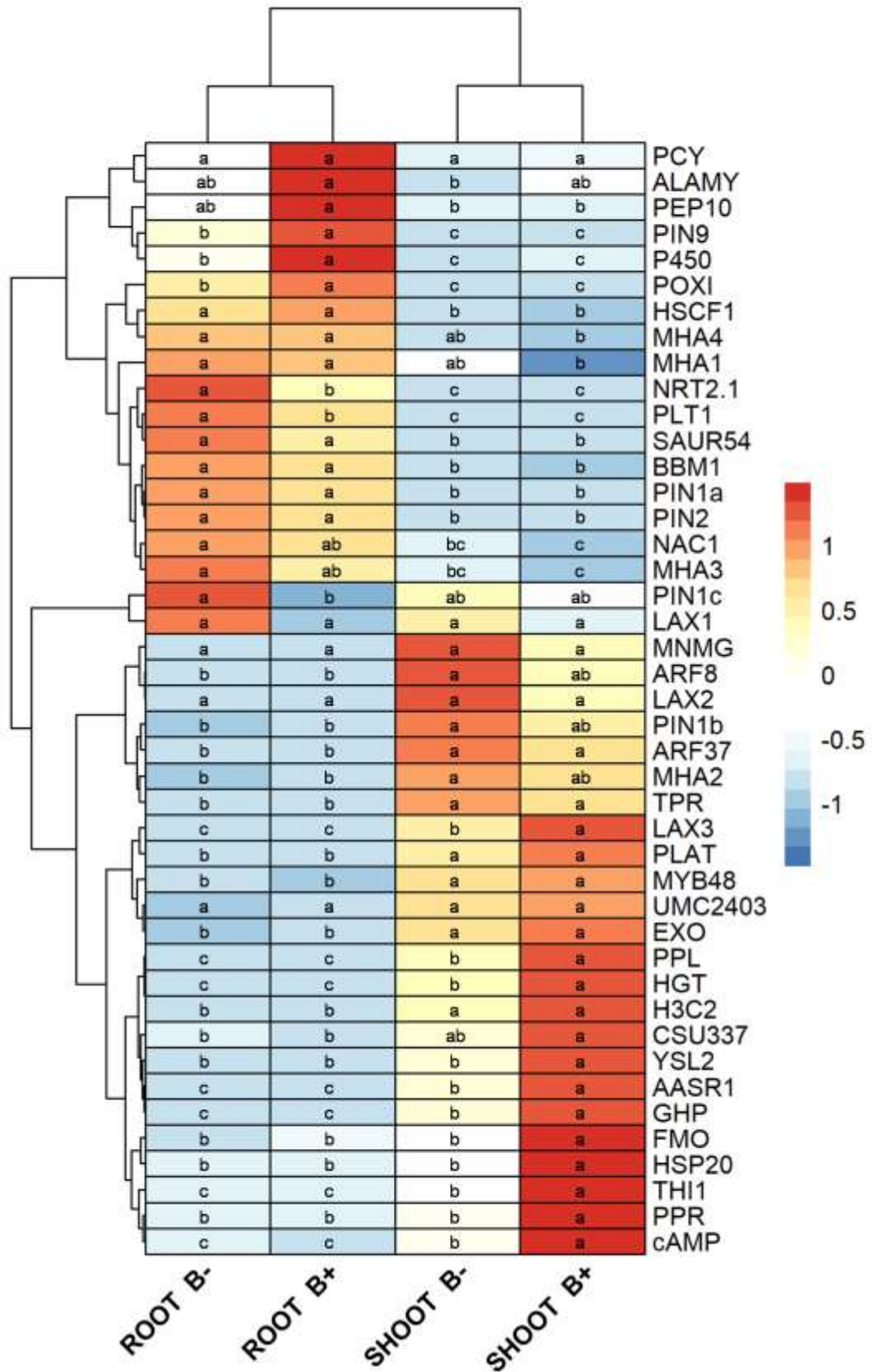
Os genes com maior diferença de expressão entre o tratamento e controle e foram destacados na tabela 6. Entre esses, estão os genes envolvidos na degradação de amido (Zm00001d020350), um regulador de genes de crescimento responsivo a brassinoesteróide (Zm00001d044864), um ligado ao desenvolvimento embrionário (Zm00001d008730), um regulador de morte celular programada e remodelamento de tecido em desenvolvimento (Zm00001d007464) em raiz apresentaram maior expressão quando submetidos ao bioestimulante. Entre os DEGs superexpressos na parte aérea e tratados com o bioestimulante, destacaram-se, um membro de uma família de proteína de resposta a infecção por fungo (Zm00001d036366), um cofator (tiamina), responsável por atividades enzimáticas (Zm00001d011183), um membro de uma família de proteína ligada a proteção de danos causado por calor (Zm00001d021634) (Tabela 6).



**Tabela 6** - Genes diferencialmente expressos em plântulas de milho tratadas com o bioestimulante à base de SH.

<b>ROOT</b>		
<b>Log2FC</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Function</b>
2.8	Zm00001d020350	<i>Alpha-amylase 1</i>
2.5	Zm00001d044864	<i>Protein EXORDIUM</i>
2.5	Zm00001d008730	<i>Seed gene 3</i>
2.3	Zm00001d007464	<i>KDEL-tailed cysteine endopeptidase CEP1</i>
2.3	Zm00001d004387	<i>Probable flavin-containing monooxygenase 1</i>
2.3	Zm00001d049217	<i>Senescence-specific cysteine protease SAG12</i>
2.1	Zm00001d007924	<i>Cytochrome P450 family 93 subfamily D polypeptide 1</i>
2.1	Zm00001d032839	<i>Uncharacterized protein</i>
1.9	Zm00001d029776	<i>Serine carboxypeptidase-like 34</i>
1.9	Zm00001d020351	<i>Alpha-amylase 1</i>
1.8	Zm00001d049219	<i>Senescence-specific cysteine protease SAG12</i>
-2.1	Zm00001d021135	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein24</i>
-1.4	Zm00001d029596	<i>Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor</i>
-1.4	Zm00001d009599	<i>MYB-related transcription factor</i>
-1.4	Zm00001d007637	<i>ATP-dependent DNA helicase</i>
-1.3	Zm00001d017134	<i>ZCN16</i>
-1.2	Zm00001d046453	<i>DNA replication</i>
-1.1	Zm00001d010634	<i>Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein</i>
<b>SHOOT</b>		
2.2	Zm00001d036366	<i>Basic endochitinase B</i>
2.1	Zm00001d011183	<i>Thiamine biosynthesis1</i>
1.9	Zm00001d021634	<i>Hsp20/alpha crystallin family protein</i>
1.8	Zm00001d044228	<i>Thiamine biosynthesis2</i>
1.6	Zm00001d048178	<i>Polyol transporter protein 4</i>
1.6	Zm00001d024522	<i>Putative HLH DNA-binding domain superfamily protein</i>
1.5	Zm00001d032850	<i>Phosphate transporter protein2</i>
1.5	Zm00001d053845	<i>Uncharacterized protein</i>
1.5	Zm00001d012292	<i>Glucan endo-13-beta-glucosidase 14</i>
1.4	Zm00001d013781	<i>Chloroplast post-illumination chlorophyll fluorescence increase protein</i>
1.4	Zm00001d037779	<i>Tonoplast intrinsic protein4</i>
-2.3	Zm00001d002159	<i>Wound induced protein</i>
-1.5	Zm00001d041794	<i>Uncharacterized protein</i>
-1.2	Zm00001d021698	<i>Receptor-like protein kinase RK20-1</i>
-1.1	Zm00001d028180	<i>Low phytic acid1</i>
-0.9	Zm00001d038164	<i>Methyl binding domain</i>
-0.9	Zm00001d040362	<i>Dof-type zinc finger DNA-binding family protein</i>
-0.9	Zm00001d041684	<i>Uncharacterized protein</i>
-0.9	Zm00001d024547	<i>Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein</i>
-0.9	Zm00001d004057	<i>Cytochrome oxidase 2</i>
-0.9	Zm00001d042880	<i>Regulator of chromosome condensation1</i>
-0.8	Zm00001d049543	<i>Circadian clock associated1</i>

Além da análise de RNAseq, foram avaliados genes candidatos, previamente descritos por atuar em diferentes mecanismos do desenvolvimento de plantas de milho (Forestan *et al.* 2010; Sorgonà *et al.* 2011; Pii *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2014; Yue *et al.* 2015; Forestan *et al.* 2012), que formaram quatro grupos principais (Figura 8). Os genes, *PIN9*, *P450*, *POXI*, tiveram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da expressão no sistema radicular, enquanto os genes *NRT2.1* e *PLT* foram reprimidos nesse tecido. Os genes *cAMP*, *PPR*, *THI1*, *HSP20*, *FMO*, *GHP*, *AASR1*, *YLS2*, *HGT*, *PPL* e *LAX3*, aumentaram significativamente a expressão na parte aérea das plantas tratadas com o bioestimulante de SH.



**Figura 8** - Heatmap da expressão de genes em plântulas de milho tratadas com bioestimulante à base de SH. À direita ao centro encontra-se a escala de cores indicativa da razão de expressão. Diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE PLÂNTULAS DE MILHO TRATADAS COM BIOESTIMULANTE À BASE DE SH

Plântulas de milho submetidas ao tratamento com o bioestimulante comercial à base de SH (B+) mostraram maior sistema radicular do que o controle (B-) (Figura 9). A análise de variância mostrou que o tratamento foi significativo para todas as características radiculares e de peso seco analisadas (Tabela 7). Os valores dos coeficientes de variação (CV) foram de baixo a médio, inferior a 25%, indicando boa precisão experimental (Tabela 7).



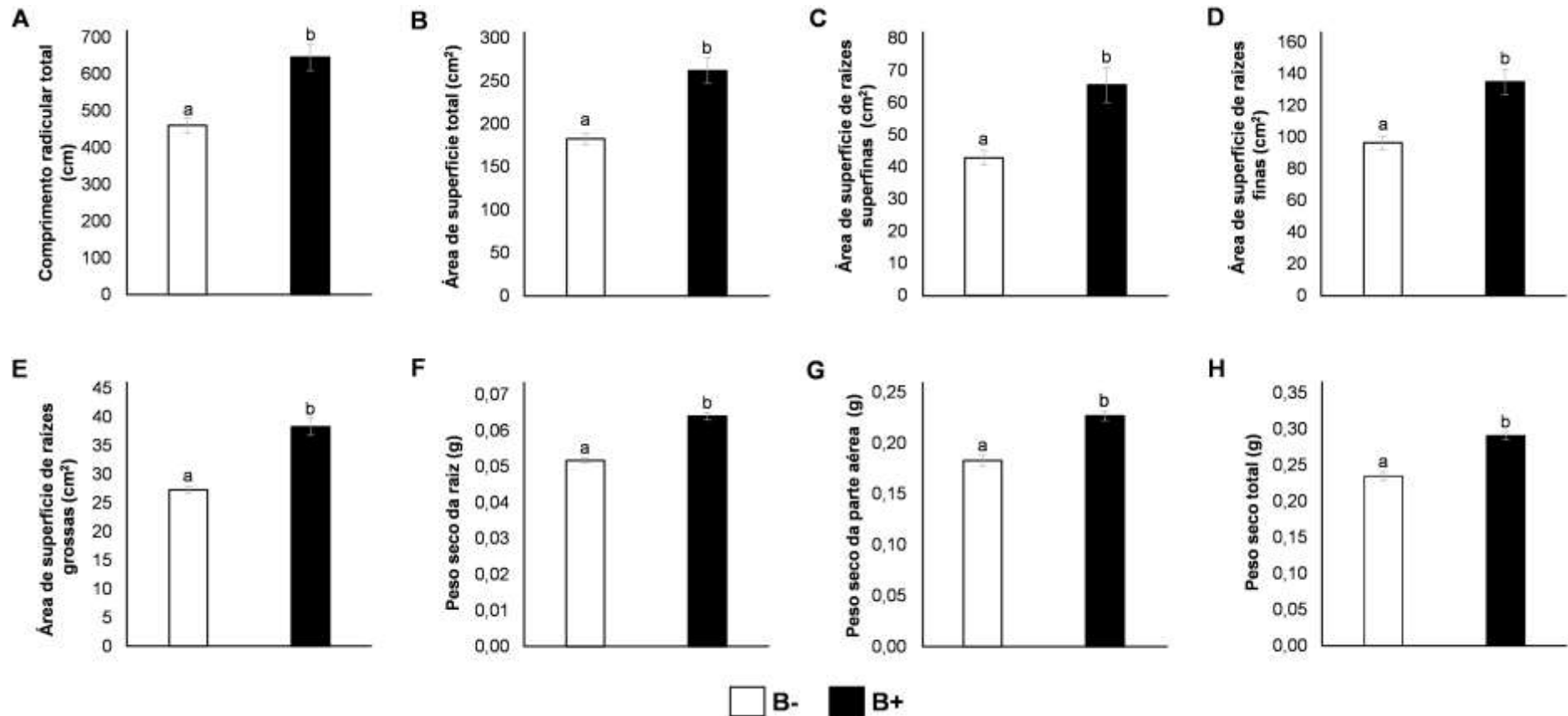
**Figura 9** - Plântulas de milho crescidas em solução nutritiva tratada (B+) e não tratada (B-) com bioestimulante.

Todas as características fenotípicas avaliadas tiveram aumento significativo em resposta ao tratamento com bioestimulante (Figura 10). Não houve diferença no conteúdo de macro e micronutrientes na raiz e parte aérea das plantas submetidas ao tratamento com bioestimulante, com exceção do conteúdo de Mn que foi superior nas raízes tratadas com bioestimulantes (Tabela 8).

**Tabela 7** - Resumo das análises de variância para características radiculares e peso seco de plântula de milho avaliado sob efeito do bioestimulante. Comprimento radicular total (CTR) (cm), área de superfície radicular total (AST) (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes superfinais com diâmetro entre 0 e 1,0 mm (AS1) (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes finas com diâmetro entre 1,0 e 2,0 mm (AS2) (cm<sup>2</sup>), área de superfície de grossas com diâmetro entre (AS3) (cm<sup>2</sup>), peso seco de raiz (PSR) (g), peso seco da parte aérea (PSPA) (g) e peso seco total (PST) (g).

FV	GL	Quadrado Médio							
		CTR	AST	AS1	AS2	AS3	PSR	PSPA	PST
<b>Tratamento</b>	1	2487193,38**	450965,04**	37255,40**	106414,22**	8725,20**	0,0004**	0,0088**	0,0150**
<b>erro</b>	16	111267,70	14444,29	2248,78	5004,49	212,40	0,00001	0,0005	0,0007
<b>Total</b>	17								
<b>CV %</b>		15,06	13,51	21,87	15,27	11,09	7,71	11,61	10,39
<b>Média Geral</b>		2214,35	889,80	216,86	463,27	131,38	0,057	0,20	0,263

\*\* Significativo a 0,01 % de probabilidade pelo teste F.



**Figura 10** - Características radiculares e massa seca de plântulas de milho após sete dias de tratamento com bioestimulante (B+) e controle negativo (B-). (A) Comprimento radicular total (cm), (B) área de superfície total (cm<sup>2</sup>), (C) área de superfície de raízes superfinas (cm<sup>2</sup>), (D) área de superfície de raízes finas (cm<sup>2</sup>), (E) área de superfície de raízes grossas (cm<sup>2</sup>), (F) peso seco da raiz (g), (G) peso seco da parte aérea (g), (H) peso seco total (g). As barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste (LSD) (p < 0,05).

**Tabela 8** - Conteúdo de macro e micronutrientes de raiz e parte aérea (PA) de plântulas de milho após sete dias de tratamento com bioestimulante (B+) e controle negativo (B-).

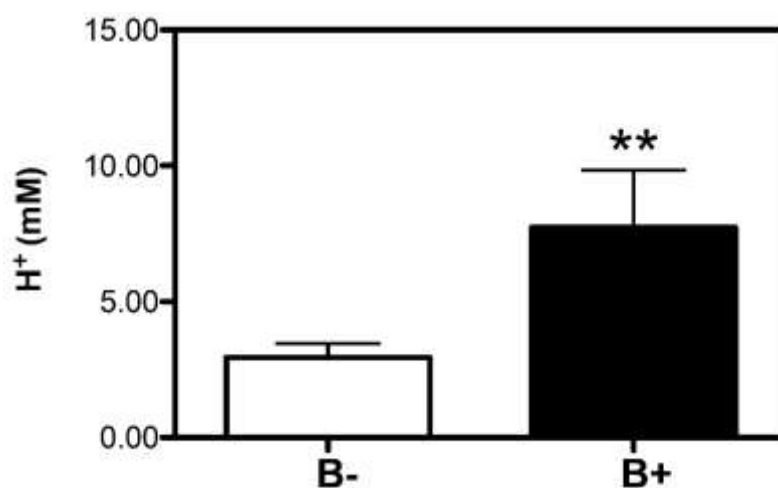
Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
	g.kg <sup>-1</sup>						mg.kg <sup>-1</sup>			
<b>Raiz B-</b>	3,52a	4,31a	31,03a	4,44a	1,81a	4,52a	3,13a	654,95a	406,32b	82,99a
<b>Raiz B+</b>	3,50a	4,57a	28,22a	3,49a	1,88a	4,30a	2,98a	671,42a	467,86a	76,98a
<b>Fc</b>	0,07ns	5,87ns	1,17ns	4,49ns	1,97ns	0,80ns	0,24ns	0,36ns	10,19*	2,25ns
<b>CV</b>	3,02	2,92	10,73	13,93	3,45	7,03	12,34	5,05	5,4	6,13
<b>PA B-</b>	4,56a	10,02a	46,44a	4,77a	2,11a	2,98a	2,43a	91,73a	85,60a	50,42a
<b>PA B+</b>	4,54a	10,44a	45,19a	4,66a	2,19a	3,06a	1,68a	81,26a	96,83a	45,32a
<b>Fc</b>	0,06ns	0,46ns	0,19ns	0,08ns	1,25ns	0,39ns	7,42ns	1,24ns	6,26ns	2,65ns
<b>CV</b>	2,44	7,46	7,57	10,06	4,4	5,19	16,41	13,31	6,03	8,00

As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste LSD (\*significativo ao nível de 5%, ns = não significativo).

### 5.3. AUMENTO DA EXTRUSÃO DE PRÓTONS $H^+$ EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE MILHO TRATADAS COM BIOESTIMULANTE À BASE DE SH

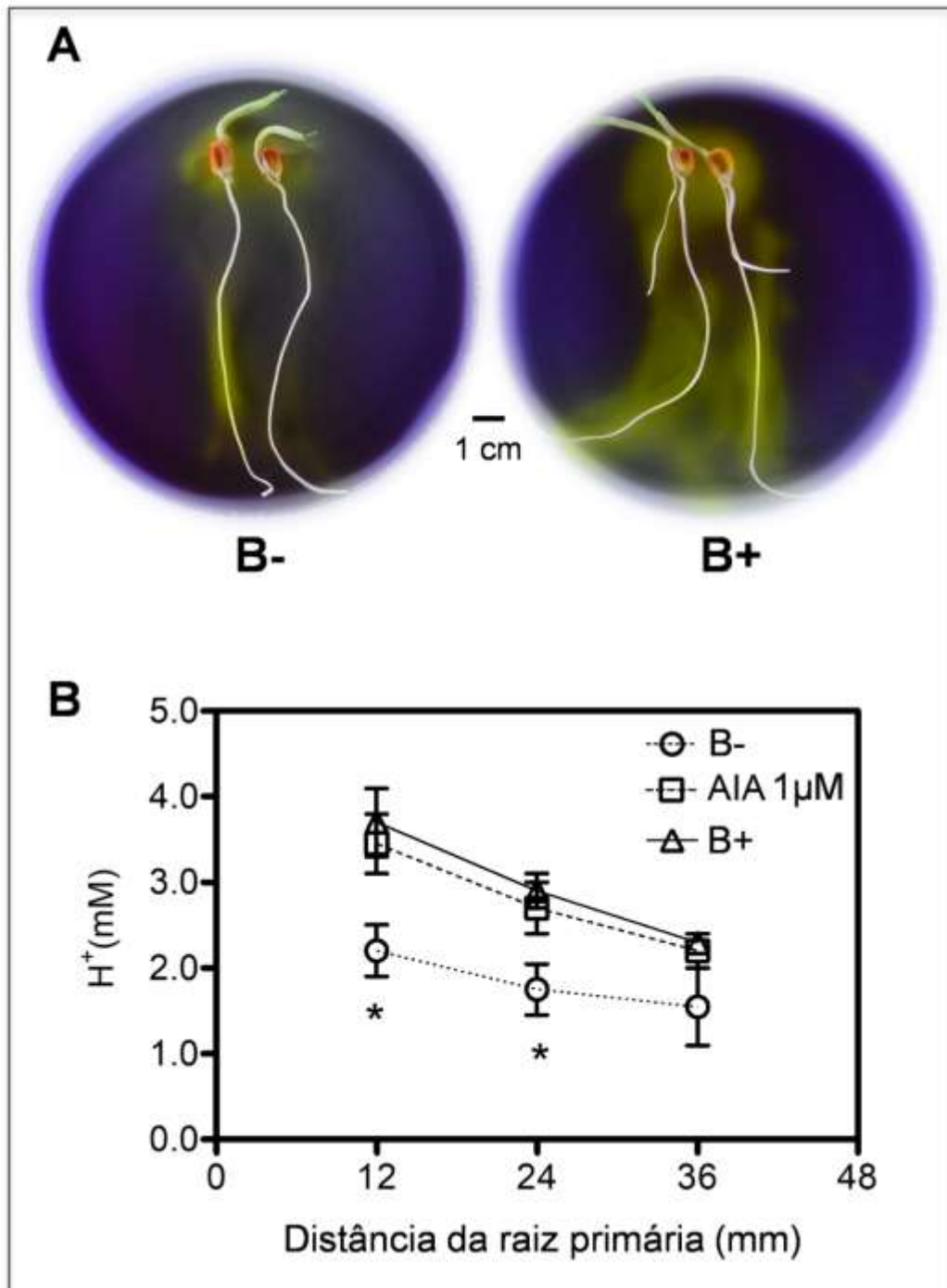
As plântulas de milho tratadas com o bioestimulante aumentaram 2,6 vezes a atividade hidrolítica da enzima  $H^+$ -ATPase (Figura 11).

As plântulas tratadas com o bioestimulantes foram capazes de acidificar maior área na placa contendo o indicador ácido-base púrpura de bromocresol, provocando alteração da cor púrpura para amarela (Figura 12A). As raízes primárias tratadas foram capazes de acidificar significativamente a rizosfera quando comparada com as plantas que não receberam a suplementação com o bioestimulante (Figura 12B). O imunoenensaio mostrou que o produto comercial à base de SH BLACKGOLD<sup>®</sup> tem uma concentração de 9570 pmoles/mL de ácido indol-3-acético (AIA).



**Figura 11** - Efeito sobre atividade da enzima  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática e tonoplasto isolada de raízes de milho com sete dias após tratamento com bioestimulante (B+) e controle negativo (B-). Barra de erro com asteriscos indica diferença significativa pelo teste t ( $p > 0,01$ ).





**Figura 12** - (A) Acidificação rizosférica das plântulas de milho tratadas com bioestimulante (B+) e controle (B-). (B) Medidas de pH obtidas a partir de 12, 24 e 36 mm de distância da raiz primária e convertidos em concentração de  $H^+$ . Os asteriscos (\*) indicam diferença significativa pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Os bioestimulantes promovem o crescimento de plantas e podem induzir a tolerância a estresses bióticos e abióticos, contribuindo para uma agricultura sustentável de alto rendimento com menos insumos agrícolas (Van Oosten *et al.* 2017; Yakhin *et al.* 2017). Apesar dos bioestimulantes estarem sendo cada vez mais empregados na agricultura moderna, pouco se conhece sobre seus mecanismos de ação (Wilson *et al.* 2015; Trevisan *et al.* 2017).

A técnica de RNA-Seq tem sido utilizada para compreender fenótipos em diferentes condições e respostas ambientais das plantas, permitindo a identificação de genes e vias que induzem a tolerâncias a estresses bióticos e abióticos, sinalizações hormonais, dentre outros processos que alteram a fisiologia e morfologia e da planta (Lowe *et al.* 2017). A análise dos transcritos de plântulas de milho tratadas com bioestimulante à base de ácido húmico permitiu a identificação de 91 a 93% de *reads* unicamente mapeadas (*uniquely mapped reads*) no genoma de referência do milho B73 (Tabela 5), indicando que as bibliotecas possuíam alta qualidade. Taxas inferiores de *reads* unicamente mapeadas têm sido utilizadas (Zheng *et al.* 2019), apesar de valores acima 90% estarem associados com bibliotecas com elevada qualidade (Dobin; Gingeras 2016). Valores muito reduzidos podem estar relacionados à má qualidade de sequenciamento, contaminação exógena de RNA ou DNA e problemas na preparação das bibliotecas ou no processamento de dados (Dobin & Gingeras 2016).

A utilização dos *softwares* STAR (Dobin *et al.* 2013) e edgeR resultaram na identificação de 1.179 genes diferencialmente expressos (DEGs) na parte aérea e na raiz das plantas de milho tratadas com o bioestimulante quando comparadas com as plantas controle. Cada *software* utiliza algoritmos específicos, sendo que a escolha depende da estratégia adotada em cada trabalho. O *software* STAR utiliza um algoritmo que o torna um dos alinhadores mais rápidos entre os demais *softwares* livres e possibilita a identificação de junção éxon-íntron em até 90%. Resultados de estudos comparativos com outros alinhadores sugerem que o algoritmo STAR é altamente conservador e, portanto, possui menor taxa de falsos positivos em estudos transcriptômicos (Wang *et al.* 2014). A correlação significativa entre os dados de expressão de RNA-Seq e PCR em tempo real, tanto para raiz ( $r = 0,91$ ), quanto para parte aérea ( $r = 0,92$ ), confirmaram a qualidade do experimento.

Na análise do transcriptoma, a maioria dos genes (66,8%) foram modulados pelo bioestimulante exclusivamente na parte aérea, enquanto 27,4% foram diferencialmente expressos apenas no sistema radicular e apenas 5,7% nos dois tecidos. Embora o tratamento com o bioestimulante tenha sido realizado no sistema radicular, os resultados indicam uma resposta sistêmica e que houve resposta ao tratamento em toda a planta. As análises estatísticas dos processos globais permitiram a identificação de genes diferencialmente expressos relacionados principalmente as vias de biossíntese e respostas à fitormônios na parte aérea e transporte de nutrientes no sistema radicular. Já os processos compartilhados entre os dois tecidos foram associados ao mecanismo redox, resposta a estresses ambientais e ao nitrato.

A parte aérea das plantas de milho suplementadas com o bioestimulante apresentaram aumento na expressão de genes codificadores lipoxigenases (*LOXs*), *ZmLOX3* (Zm00001d033623) e *ZmLOX10* (Zm00001d053675), que são enzimas associadas à produção de ácido jasmônico (*JA*) (Ogunola *et al.* 2017). A atividade das *LOX* desempenha papel fundamental no crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas, em resposta a uma variedade de estresses bióticos e abióticos. Mutantes *knockout* para *ZmLOX3* (*lox3-4*) exibem senescência precoce, comprimento de raiz e altura da planta reduzidos em comparação com o tipo selvagem (*WT*), sugerindo que o *ZmLOX3* é necessário para o desenvolvimento normal da planta. A interrupção de *ZmLOX3* não só impactou o crescimento do milho, como também aumentou cerca de duas vezes a infecção nas raízes por nematoides (Gao *et al.* 2008). Já o gene *ZmLOX10* é relatado por atuar na biossíntese de compostos voláteis em folhas verdes (*green leaf volatile - GLV*) e *JA*. A interrupção da expressão de *ZmLOX10* (mutantes, *lox10*), acarretou drástica redução nos níveis de *GLV* e *JA* e comprometeu a resistências ao ataque de insetos, com redução significativa da biomassa das plantas de milho (Christensen *et al.* 2013). Os resultados obtidos corroboram o papel do bioestimulante na capacidade de induzir a síntese de *JA* nos vegetais (Casadesús *et al.* 2019). A superexpressão dos genes *ZmLOX3* e *ZmLOX10* nas plantas de milho suplementadas com o bioestimulante pode levar ao aumento do desenvolvimento radicular e da parte aérea, e com perspectiva de aumento da proteção das plantas contra o ataque de herbívoros e infecção por patógenos.

Os transcritos *NCED6* (Zm00001d051556) e *NCED8* (Zm00001d017766), precursores de ABA da família 9-*cis*-epóxi-carotenóide-dioxigenases, foram superexpressos na parte aérea de plantas de milho após tratamento com o bioestimulante. Em tomate, o mutante *nced* com deficiência na via biossintética de ABA, tem menor área de foliar, biomassa e menor condutância hídrica nas raízes (Nagel *et al.* 1994; Nitsch *et al.* 2012). O ABA endógeno é capaz de coordenar a sinalização de outros hormônios de forma antagônica, como por exemplo, o excesso de etileno (ET) pode interferir na condução hídrica da raiz-parte aérea. No mutante *nced* deficiente de ABA, as plantas de tomate com altura reduzida, apresentam alta produção de ET, indicando o papel fundamental de ABA na atuação de outras vias hormonais e o desenvolvimento da parte aérea principalmente pela expansão foliar (Nitsch *et al.* 2012).

Neste estudo, houve aumento da expressão dos genes *ZmNIP1.2* (Zm00001d052261) e *ZmPIP2.3* (Zm00001d051174), codificadores de aquaporina no sistema radicular das plantas tratadas com bioestimulante (Péret *et al.* 2012). Pepino tratado com SH teve aumento da expressão de genes codificadores de aquaporina (*PIPs*), devido elevação da concentração de ABA, sendo que inibidores da via biossintética de ABA, interferiu negativamente nesse mecanismo (Olaetxea *et al.* 2015). Por outro lado, plantas de arroz suplementadas com SH, apresentam aumento significativo da expressão de *OsPIP2.1* no sistema radicular e parte aérea, independentemente da concentração de ABA, tanto em condição normal quanto de estresse hídrico (García *et al.* 2014). Além disso, *OsPIP2.1* está envolvido no influxo de água para o vacúolo mediado por ABA (Lian *et al.* 2006). Alguns trabalhos sugerem que os bioestimulantes induzem uma condição de “pré-estresse”, melhorando a tolerância constitutiva (Trevisan *et al.* 2017; Yakhin *et al.* 2017; García *et al.* 2016). Nesse sentido, nossos resultados sugerem que os bioestimulantes possam melhorar o desenvolvimento das plantas a partir da modulação de membros família *NCED* ligados a biossíntese de ABA, potencializando mecanismos envolvidos na condutância hídrica.

Além atuar nas vias de biossintética ou de sinalização de JA e ABA, o bioestimulante avaliado foi capaz de aumentar a expressão de genes de resposta aos hormônios brassinoesteróide (BR) e etileno (ET) na parte aérea das plântulas de milho tratadas. Embora a auxina seja o regulador chave do crescimento vegetal, o BR também atua em vias essenciais de crescimento e desenvolvimento (Ren *et al.*

2019). A produção de óxido nítrico (ON) pode ser induzida pelo BR como um mensageiro secundário, atuando principalmente nos estágios iniciais desenvolvimento das plantas (Li *et al.* 2020). A presença de ON é relacionada com o crescimento do sistema radicular de planta milho (Gouvêa *et al.* 1997). Ademais, ácidos húmicos (AH) induzem a produção de ON na zona de emergência da raiz lateral de plântula de milho, sendo o ON um regulador da formação da raiz (Zandonadi *et al.* 2010). ON pode atuar juntamente com outros hormônios, incluindo o ET ou interagir com as espécies reativas de oxigênio (ROS) e regular respostas fisiológicas e bioquímicas na planta (Li *et al.* 2020; Zandonadi *et al.* 2019). Os bioestimulantes podem promover a homeostase dos hormônios endógenos, seja interferindo em vias de biossíntese das moléculas ou atuando em mecanismos de transportes (Barone *et al.* 2019; Olaetxea *et al.* 2015; Zandonadi *et al.* 2010; Casadesús *et al.* 2019). Os hormônios JA, ABA, BR e ET não apenas modulam o crescimento do sistema radicular das plantas, como também participam da ativação dos sistemas antioxidantes, aumentando a resistência dos vegetais aos estresses ambientais (Samota *et al.* 2017; McAdam *et al.* 2016; Tao *et al.* 2015; Fridman & Savaldi-Goldstein 2013). A sinalização mediada por esses hormônios pode desencadear a ativação de enzimas envolvidas no mecanismo redox, mantendo o equilíbrio entre o crescimento vegetal e a produção de ROS (Bakalova *et al.* 2004; Sharma *et al.* 2018; Alisof *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2016).

Transcritos relacionados à síntese ou atividade da alfa e beta expansinas na raiz de milho, apresentaram maior expressão em plantas tratadas com bioestimulante. Os transcritos codificadores de beta expansina 4 (*EXPB4*; Zm00001d019560) e alfa expansina 11 (*EXPA11*; Zm00001d035111) foram superexpressos especificamente no sistema radicular. As famílias alfa e beta expansinas são catalisadoras do crescimento ácido, por serem ativadas com a redução pH no apoplasto (pH<4,5). Membros dessas duas famílias atuam na separação das microfibrilas de celulose e dos polissacarídeos da matriz, provocando o relaxamento da parede celular e com o afrouxamento desses componentes, a pressão de turgor do vacúolo contribui no processo de expansão e remodelamento celular (Sampedro & Cosgrove 2005). O processo de expansão celular depende da atividade da enzima xiloglucano endotransglicosilase. Neste trabalho, identificamos o gene *ZmXTH* (Zm00001d052651) superexpresso na raiz de plantas tratadas com bioestimulante, que faz parte da via de biossíntese da enzima xiloglucano

endotransglicosilase, pois sua atividade é capaz de clivar e religar os polímeros de xiloglucano, um constituinte essencial da parede celular primária, participante da construção da parede celular dos tecidos em crescimento. Outros genes da mesma família codificadores de expansinas e xiloglucano endotransglicosilase foram identificados por RNA-Seq em raízes de plântulas de milho tratadas com outro bioestimulante comercial (APR®) à base de proteína hidrolisada (Trevisan *et al.* 2017), indicando que diferentes bioestimulantes podem promover o melhor desenvolvimento do sistema radicular, regulando a expressão dos genes envolvidos na atividade enzimática de parede celular.

No presente trabalho, transcritos envolvidos na atividade das enzimas peroxidases (EC 1.11.1.7), glutathiona-ascorbato (EC 1.11.1.11), glutathiona S-transeferase (EC 2.5.1.18), catalase (EC 1.11.1.6), superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) e tioredoxina (EC 1.8.1.9) foram superexpressos na raiz e parte aérea das plantas de milho suplementadas com o bioestimulante. Essas enzimas, por meio de transferência de elétrons, reduzem as espécies reativas de oxigênio (ROS), que tem potencial de causar danos celulares (Mittler 2017). No entanto, a sinalização das ROS pode interagir com sinais hormonais e alterar fisiologicamente e morfológicamente as plantas (Oracz & Karpiński 2016).

Um exemplo de interação entre fitormônios e ROS foi demonstrada em plantas de milho sob déficit hídrico, onde o aumento da produção de ROS induziu o sistema antioxidante mediado pelo aumento da produção ABA, que consequentemente inibiu a produção de ET, garantido o desenvolvimento radicular (Sharp *et al.* 2004). Em nosso estudo, o bioestimulante induziu vias do mecanismo antioxidante, como os genes codificadores de peroxidase (*POX*), *ZmPOX1* (Zm00001d018619) e *ZmPOX42* (Zm00001d022456) e o *Abscisic Acid Stress Ripening1* (*AASR1*) (Zm00001d023529) na parte aérea das plântulas de milho. Os genes *ZmPOX1*, *ZmPOX42* e *ZmAASR1* também tiveram os níveis de mRNA aumentado em plantas de milho sob estresses hídrico, além de outros transcritos envolvidos nas vias das enzimas superóxido dismutase e catalase (Jiang *et al.* 2019). Os bioestimulantes têm o potencial de interferir em vias hormonais, promover homeostase das ROS e induzir mecanismos de proteção contra estresses ambientais, incluindo o estresse hídrico.

Além dos mecanismos antioxidante ativados pelo bioestimulantes nas plântulas de milho, o tratamento estimulou vias ligadas à síntese metabólitos secundários,

como fenilpropanóide, em destaque a superexpressão do gene *ZmPAL1* (Zm00001d033286) no sistema radicular. As SH aceleram o metabolismo de carbono e nitrogênio (Quaggiotti *et al.* 2004; Nardi *et al.* 2007), que direta ou indiretamente podem ativar a nível transcricional genes envolvidos na síntese de compostos secundários (Schiavon *et al.* 2010). A expressão *PAL*, que codifica uma enzima precursora do metabolito fenilpropanóide (Kurepa & Smalle 2019) foi regulada por SH. Essa classe de composto secundário pode ter ativação transcricional induzida por auxina (Lewis *et al.* 2011). Recentemente, um estudo mostrou que o fenilpropanóide eleva a sensibilidade da auxina em *Arabidopsis*, sendo essa interação entre o hormônio e o metabolito aumenta a expansão foliar, portanto, acúmulo de biomassa e o crescimento radicular (Kurepa *et al.* 2018). As SH contêm AIA ou fornecem efeito semelhante a auxina (Zandonadi *et al.* 2007; Canellas *et al.* 2010). Além disso, as SH e bioestimulantes comerciais derivados de subprodutos agroindustriais aumentam a expressão do gene *ZmPAL* em milho (Schiavon *et al.* 2010; Ertani *et al.* 2011b). Portanto, no presente trabalho, o bioestimulante teve efeito em vias do metabolismo de fenilpropanóide, que pode ter sido através da transdução de sinal de moléculas fornecidas pelas SH com bioatividade semelhante à auxina, melhorando desenvolvimento das plantas.

Os genes *ZmLAX3* e *ZmPIN9*, envolvidos no transporte de auxina, foram superexpressos na parte aérea e na raiz das plantas tratadas com bioestimulante a base de SH (Figura 8). O transporte polar de auxina regula processos fisiológicos, bioquímicos e genéticos contribuindo no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular (Forestan & Varotto 2012). O influxo de auxina é mediado pela família das proteínas *AUX/LAX* (Swarup *et al.* 2008). A expressão do *ZmLAX3* pode aumentar na parte aérea de plântula milho por sinais exógenos, aumentando a translocação da auxina para as raízes e o desenvolvimento e a plasticidade do sistema radicular (Yue *et al.* 2015). A elevada concentração de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) aumenta a transcrição do gene *ZmPIN9* e o transporte basipetal de auxina para células do periciclo, onde genes responsivos ao fitormônio, como *CYCB* são ativados, estimulando a divisão celular e o crescimento da raiz (Yu *et al.* 2015). Assim, o bioestimulante à base de SH pode atuar de forma análoga aos hormônios, estimulando o crescimento radicular.

O bioestimulante também aumentou a expressão de genes ligados ao metabolismo de  $\text{NO}_3^-$  na raiz e na parte aérea das plântulas de milho. O transporte

de nitrato é mediado por duas famílias transportadores *NRT1* e *NRT2* (Dechorgnat *et al.* 2018; Criscuolo *et al.* 2012; Plett *et al.* 2010). Nesse estudo, a isoforma *ZmNRT2.1* foi reprimida nas raízes das plantas tratadas com o bioestimulante e sem efeito na parte aérea. Entretanto a análise do RNA-Seq revelou a superexpressão de membros de uma família de proteínas de transporte descrita como *Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter (NRT1/PTR)* nas plantas tratadas com bioestimulante. O gene *ZmNRT1.1* (*Zm00001d024587*) foi superexpresso na raiz, enquanto o *ZmNRT1.1B* (*Zm00001d029932*) foi superexpresso na parte aérea. Em *Arabidopsis*, o gene *NRT1.1* também chamando de *NPF6.3* (Zhao *et al.* 2018; Léran *et al.* 2013) tem sido o gene mais estudado dessa família de transportadores, caracterizado por possuir dupla afinidade ao nitrato, ou seja, atuando no transporte de alta (*HATS*) e de baixa afinidade (*LATS*) de  $\text{NO}_3^-$ . A dinâmica fisiológica do *NRT1.1* envolve a translocação do  $\text{NO}_3^-$  da raiz para parte aérea, no entanto, sua atividade não é limitada apenas no transporte de  $\text{NO}_3^-$ , mas abrange o transporte de outras moléculas, incluindo peptídeos, aminoácidos, auxinas e ácido abscísico (Krouk *et al.* 2010; Tsay *et al.* 2007; Kanno *et al.* 2012; Buchner & Hawkesford 2014). Na parte aérea, o *NRT1.1* exerce sua função nas células guarda, controlando a abertura e fechamento estomáticos, regulando a perda excessiva de água. Na raiz, a expressão do gene *NRT1.1* é crucial para o desenvolvimento da arquitetura radicular, influenciando o desenvolvimento de raiz lateral promovido pela homeostase de auxina regulado pela alta concentração de nitrato (Krouk *et al.* 2010). A atividade do *NRT1.1* é demonstrada em plantas de milho crescidas em condições hidropônicas e tratadas com SH devido ao acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas (Quaggiotti *et al.* 2004). Já em milho tratado com o bioestimulante APR<sup>®</sup> de proteína hidrolisada a expressão do *ZmNRT1.1* não foi alterada significativamente, sendo o *ZmNRT2.1* mais expresso nessa condição (Trevisan *et al.* 2019), indicando que bioestimulantes podem induzir diferentes estratégias nas plantas para o mecanismo de absorção e realocação do nitrogênio.

Embora, neste estudo a concentração de nitrogênio não tenha aumentada nos tecidos analisados, houve aumento da expressão das isoformas *ZmGLN6*, (*Zm00001d028260*, *GS1-1*) e *ZmGLN4* (*Zm00001d017958*, *GS1-3*) na raiz das plântulas de milho suplementadas com o bioestimulante. As isoformas da família *GS1* são associadas à reciclagem de reservas endógenas de N no sistema radicular de milho, assimilação de amônia  $\text{NH}_4^+$  proveniente dos processos de metabólicos,



além de atuar no transporte do nitrogênio (Prinsi & Espen 2015). Em arroz, o mutante *knockout gs1-1* reduziu drasticamente a taxa de crescimento e a produção de biomassa (Tabuchi *et al.* 2005). Enquanto a superexpressão no mutante *ZmGS1-3* aumentou em 30% a produção de grãos de milho (Martin *et al.* 2006) Nossos resultados sugerem que o bioestimulante foi capaz de acelerar o desenvolvimento das plântulas milho no estágio vegetativo, melhorando a eficiência do uso interno de nitrogênio, com a modulação dos mecanismos de transporte (*NRT1.1*), reciclagem (*GS1*) e homeostase de auxina.

No sistema radicular das plântulas de milho tratadas com o bioestimulante, um transcrito codificador da nitrato redutase (NR) (*Zm00001d052139*) teve aumento de 1,1 vezes na expressão em relação ao controle. O metabolismo do  $\text{NO}_3^-$  é regulado pela atividade da NR, sendo essa induzida por AIA (Kolbert & Erdei 2008). No entanto, em detrimento a esse metabolismo é gerado o gás ON, que, conforme discutido anteriormente tem um papel importante no crescimento das raízes (Astier *et al.* 2018). Estudos anteriores relatam que o balanço entre a atividade da NR e a produção de ON coordena o crescimento de raízes primária e laterais e os ajustes finos na arquitetura radicular de planta de milho (Trevisan *et al.* 2011, 2014; Manoli *et al.* 2014; López-Arredondo *et al.* 2013). Além disso, o ON é capaz de regular síntese de componentes do citoesqueleto e enzimas relacionada a expansão celular como xiloglucano endotransglicosilase (Manoli *et al.* 2014; Yu *et al.* 2014). Portanto, o gene *ZmXTH* diferencialmente expressos pode sido regulado pela produção de ON mediada pelo bioestimulante de SH. A atividade da NR não é o único mecanismo para geração do ON, há outro mecanismo não enzimático dependente da atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase (Galatro *et al.* 2020). A bioatividade de AH semelhante à auxina aumenta a extrusão de prótons  $\text{H}^+$  pela  $\text{H}^+$ -ATPase reduzindo o do pH no apoplasto e favorecendo a síntese do NO, sendo a aceleração do crescimento de raiz lateral de milho atribuída ao ON (Zandonadi *et al.* 2010). Esses resultados indicam o papel essencial do ON induzindo pelos AH no controle do desenvolvimento radicular.

Nos ensaios bioquímicos foi observado que as enzimas  $\text{H}^+$ -ATPases isoladas das raízes das plântulas tratadas com o bioestimulante tiveram sua atividade aumentada em 2,6 vezes. No entanto, ao nível transcricional não foi verificado efeito na expressão dos quatro genes codificadores das  $\text{H}^+$ -ATPase de membranas (*MHA1*, *MHA2*, *MHA3* e *MHA4*), embora sua atividade possa ser a estimulada ou

inibida através de sinais exógenos independentemente de síntese da proteína (Zörb *et al.* 2005). Por outro lado, essa enzima apresenta pelo menos quatro isoformas, isso permite a regulação em diferentes níveis incluindo a regulação pós-traducional (Noubhani *et al.* 1996). As H<sup>+</sup>-ATPases podem sofrer rápida modulação pós-traducional por meio de interações entre a parte C-terminal da enzima e seu sítio ativo sendo esse processo regulado por fosforilação (Janicka-Russak 2011). As plantas utilizam-se desse mecanismo em respostas a fatores ambientais e hormonais a fim de estimular hiperpolarização da membrana plasmática e o aumento do bombeamento de prótons H<sup>+</sup> ativando transportadores e canais iônicos para garantir a homeostase dos elementos essenciais para o metabolismo vegetal (Zhang *et al.* 2017; Noubhani *et al.* 1996). Nesse sentido, é possível que o bioestimulante de SH possa ter desencadeado uma regulação pós-traducional das H<sup>+</sup>-ATPases, favorecendo o aumento das enzimas na membrana plasmática. Além disso, foi observado que o bioestimulante promoveu a extrusão de prótons H<sup>+</sup> na rizosfera, indicando alta atividade das H<sup>+</sup>-ATPases, semelhante ao controle positivo com AIA na concentração 1,0 μM. A estimulação das bombas de prótons H<sup>+</sup> por AIA promove acidificação na região do apoplasto, causando a ativação das expansinas, alterando a plasticidade de seus componentes e gerando condições para o processo de expansão celular e alongamento do sistema radicular, por meio do crescimento ácido (Hager *et al.* 1991; Rayle & Cleland 1992). Mecanismos semelhantes foram observados com outras SH, que induziram o bombeamento de prótons (Quaggiotti *et al.* 2004; Canellas *et al.* 2002). Além disso, o efeito das SH sobre as H<sup>+</sup>-ATPases são semelhantes ou superiores aos promovidos por AIA exógeno quando aplicados nas concentrações que variam entre 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-15</sup> M (Zandonadi *et al.* 2007). O bioestimulante à base de SH avaliado neste trabalho apresentou uma concentração de AIA na escala 10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>. Estudos anteriores detectaram a presença de AIA em SH por imunensaio, sendo que o aumento da extrusão de prótons é explicado pela presença do AIA nas substâncias húmicas (Quaggiotti *et al.* 2004; Trevisan *et al.* 2010).

O tratamento das plântulas de milho com o bioestimulante de SH estimulou na raiz e parte aérea a superexpressão de genes codificadores de proteínas quinases (PK) denominada de *SnRK3* (*CBL-interacting serine / threonine-protein kinase*). A família dessas quinase também são conhecidos como *CIPKs* (Chardin *et al.* 2017). No presente estudo, a análise de vias metabólicas por meio do banco de dados

KEGG, as *SnRK3* foram atribuídas por interagir com outra quinase denominado *Target Of Rapamycin kinase (TOR kinase)*. As quinases *SnRKs – TOR* se interagem e atuam em vias comuns entre si. A comunicação entre essas PKs coordenam a transdução de sinais exógenos endógenos como, por exemplo, as ROS geradas por diversos tipos de estresses ambientais e principalmente pelos hormônios ABA e AIA, assim mantém o desenvolvimento da planta em razão do balanço nutricional e energético (Jamsheer *et al.* 2019). Além da resposta hormonal e por estresses ambientais, a família *SnRK3 / CIPK* também recebe sinais de iônicos como o de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), devido sua afinidade as proteínas *CBLs* que são dependentes de  $Ca^{2+}$  para ativação (Tripathi *et al.* 2009; Tang *et al.* 2015; Hey *et al.* 2009; Pareek *et al.* 2017). A família *SnRK3* por meio de fosforilação promove aumento da atividade e ou a biossíntese de vários transportadores, enzimas e canais de membrana plasmática das células, incluindo o transportador de nitrato *NTR1.1* (Maierhofer *et al.* 2014), a bomba de prótons  $H^+$ -ATPase (responsável pelo influxo de nutrientes por transporte acoplado dependente de prótons  $H^+$ ) (Miranda *et al.* 2017) e canais condutores de água (aquaporinas), as proteínas *PIPs* (Kawa *et al.* 2020). As quinases *SnRKs* não apenas recebem sinais hormonais exógenos, como também atuam em vias de biossíntese de hormônios. A síntese de AIA, por exemplo, pode ser modulada por membros dos fatores de transcrição *bZIP* ao serem fosforilados pelas *SnRKs* (Weiste *et al.* 2017; Dröge-Laser & Weiste 2018). No presente estudo, a via biossintética de AIA pode ter sido mediada por *SnRKs* ativadas nas plântulas de milho tratadas com o bioestimulante, uma vez que diversos membros da família *bZIP* foram diferencialmente expressos. Conforme discutido anteriormente, os mecanismos de transporte e biossíntese regulados nas plântulas tratadas, sugerem que as PKs *SnRK3* possam ser receptoras do sinal de SH e desencadear respostas essenciais que envolvam o uso eficiente dos nutrientes e a aceleração do crescimento da planta.

Não foi observada a superexpressão do gene *ZmTOR* nas plântulas de milho tratadas com o bioestimulante. Em contraste, plântulas de milho crescidas em solução nutritiva e suplementada com AH por quatorze dias mostraram aumento na expressão do gene *ZmTOR* na raiz e na parte aérea (Canellas *et al.* 2019). No entanto, a estreita conexão entre as PKs *SnRKs* e *TOR* requer uma análise temporal, pois as *SnRKs* são reguladoras positivas, enquanto a *TOR* é um regulador negativo, ou seja, a atividade da *SnRKs* suprime a atividade de *TOR* em resposta à

deficiência de açúcares e nutrientes. Já em condições nutricionais e energética favoráveis a atividade de *TOR* suprime atividade de *SnRKs* e estimula várias respostas via fatores transcrição, pelos quais genes ligados a divisão, diferenciação e expansão celular, transporte, metabolismo etc., são ativados (Tomé *et al.* 2014; Soto-Burgos & Bassham 2017; Chen *et al.* 2017; Jamsheer *et al.* 2019; Fu *et al.* 2020; Figura S1). Além disso, a via *TOR* pode atuar a jusante da auxina e regular a expressão gênica dos transportadores *PIN*, na sinalização e redistribuição do hormônio, bem como na sua percepção em pontas de raízes, no controle do ciclo celular nos meristemas, ainda na modulação da síntese de glicose através da fotossíntese (Xiong *et al.* 2013). A inibição do gene *AtTOR* em *Arabidopsis* impede a tradução de proteínas relacionadas ao processo de crescimento, sendo reduzidos os processos de diferenciação, divisão e alongamento celular na zona meristemática, enquanto a superexpressão de *AtTOR* tem efeito oposto (Deprost *et al.* 2007; Montané & Menand 2013) no desenvolvimento de embriões, meristemas de raiz primária e lateral e no remodelamento do sistema radicular (Menand *et al.* 2002; Margalha *et al.* 2019). O tratamento de plantas de *Arabidopsis* com substâncias húmicas aumenta expressão do gene *AtTOR* e estimula de forma generalizada a expressão gênica em resposta a vários estímulos nutricionais, como ferro, nitrogênio e sacarose (Trevisan *et al.* 2011). Tais resultados indicam que as substâncias húmicas possam se comportar de maneira semelhante à auxina na via de sinalização *TOR*, bem como, promover uma sinalização na via da *SnRKs* comportando-se como nutriente, acelerando o crescimento vegetal.

Em nossos estudos, identificamos a superexpressão de duas outras PKs, sendo a *ZmMPK1* (Zm00001d047758) no sistema radicular e a *ZmMPK3* (Zm00001d028711) na parte aérea das plântulas de milho tratadas com o bioestimulante. Essas quinases são denominadas de *Mitogen-activated protein kinase* (*MAPK*). A análise de vias metabólicas do KEGG revelou que *ZmMPK1* e *ZmMPK3* também interagiu na via de sinalização da quinase *TOR*, assim como as quinase *SnRKs*. As *MAPKs* desempenham um papel essencial na regulação do desenvolvimento, senescência, sinalização de estresse e aclimação, sendo a que transdução de sinais pode ocorrer através da sinalização de diversos hormônios como AIA, ABA, JA, ET, BR e ON, indicando que essa família quinase são altamente sensíveis a sinais exógenos (Rodriguez *et al.* 2010; Smékalová *et al.* 2014; Lu *et al.* 2015). Em resposta à sinalização, as *MAPKs* ativam (fosforilação) outras quinases,

enzimas, proteínas do citoesqueleto e fatores de transcrição (Jagodzik *et al.* 2018). Além disso, as *MAPKs* fosforilam seus substratos e essas modificações pós-traducionais contribui para a regulação de proteínas ligadas ao mecanismo de resposta a estresses ambientais (Bigeard & Hirt 2018). A superexpressão de *ZmMPK1* em *Arabidopsis* resulta no aumento da expressão de genes precursores de ABA (*NCED*), contribui para manter a biomassa e evita o aumento de ROS, além de aumentar a taxa de sobrevivência das plantas sob estresse térmico e hídrico (Wu *et al.* 2015). Já a superexpressão de *ZmMPK3* é induzida pelos hormônios ABA e ET exógenos em plântulas de milho e ativa vias relacionadas a múltiplos estresses abióticos (Wang *et al.* 2015). Plantas de *Arabidopsis* tratadas com SH não apenas aumentaram a expressão da quinase *TOR* no estudo de Trevisan *et al.* (2011), como também estimularam a superexpressão de *MAPKs*, sugerindo que as SH coordenam a interconexão de outras quinases na via da quinase *TOR*, o que resulta no controle do crescimento das plantas em função dos nutrientes e reservas energéticas disponíveis e ao mesmo tempo ativando vias que induzem a tolerância a estresses ambientais. Este trabalho sugeriu que atividade semelhante a hormônios presentes no bioestimulante à base de SH possam ter aumentando a atividade das quinases *MAPKs* nos tecidos das plântulas de milho tratadas com o bioestimulante que desencadeou respostas em vias precursoras de hormônios, rotas essenciais de controle do crescimento e desenvolvimento vegetal e vias com potencial de mitigar efeitos de estresses abióticos.

O aumento da expressão gênica de várias PKs nas plântulas de milho tratadas com o bioestimulante sugeriu que o bioestimulante pode aumentar os transcritos das PKs, desencadear respostas sistêmicas em processos fundamentais do controle do crescimento vegetal, tais como a biossíntese e transporte de hormônios (Weiste *et al.* 2017; Dröge-Laser & Weiste 2018; Deng *et al.* 2017), uso eficiente de nitrogênio (Maierhofer *et al.* 2014), extrusão de prótons (Yu *et al.* 2014), além da ativação de rotas potencialmente envolvidas na redução dos estresses ambientais (Jamsheer *et al.* 2019; Wu *et al.* 2015).

Além de aumentar significativamente a biomassa da parte aérea, raiz e total em cerca de 25%, o bioestimulante à base de SH também estimulou o desenvolvimento radicular, aumentando em cerca de 40% o comprimento e área de superfície radicular total e sobretudo a área superficial de raízes superfinais. A plasticidade do sistema radicular proporciona uma melhor adaptação ao meio,

contribuindo para a resiliência da planta a diversos estresses ambientais (Freschet *et al.* 2015; Kochian 2016). Alguns estudos testaram os efeitos de SHs extraídas de leonardita para o desenvolvimento de plântulas de milho crescidas em hidroponia. Conselvan *et al.* (2017) observaram aumento de 92% do comprimento e aérea de superfície total do sistema radicular, enquanto Ertani *et al.* (2011a) relataram um aumento da biomassa de 11% na parte aérea e 24% na raiz. Por fim, Sun *et al.* (2016), encontraram aumento de 38% no comprimento radicular total das plântulas de milho sob efeito das SH. As alterações fenotípicas promovidas pelas SHs derivadas de leonardita corroboram com os resultados encontrados no presente estudo. Além disso, SHs de várias origens têm mostrado efeitos positivos nos processos de iniciação de raiz lateral, proliferação e alongamento celular, resultando em maior comprimento radicular total e aérea de superfície total (Eyheraguibel *et al.* 2008). O melhor desenvolvimento do sistema radicular nas fases iniciais do estágio vegetativo garante maior acesso ao solo, maximizando a absorção de água e nutrientes da rizosfera, tornando as culturas potencialmente mais produtivas (Barone *et al.* 2019). Além disso, um bioestimulante derivado de leonardita foi capaz de aumentar em 74% a produção de grãos de milho quando comparado com controle sem bioestimulante (Khaneghah *et al.* 2012; Olk *et al.* 2018).

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que o bioestimulante à base de SH aumentou o sistema radicular e a biomassa da planta através de uma série de sinalizações e interações ligadas principalmente ao mecanismo de crescimento ácido mediado pela alta atividade das H<sup>+</sup>-ATPase de membranas plasmáticas e por efeitos semelhantes a resposta ao AIA presente nas SH. Além disso, o perfil transcricional sugeriu que as atividades das expansinas, resposta ao nitrato e o metabolismo e transporte dos hormônios como auxina, ácido jasmônico, ácido abscísico, brassinoesteróide e etileno podem ter contribuído para alterações fenotípicas observadas no sistema radicular e biomassa vegetal. Este estudo prospectivo indicou diversas vias e genes relacionados a resposta ao bioestimulante à base de SH e caracterizações funcionais mais detalhadas ajudarão a compreender melhor como ocorre estas interações.

## 7. CONCLUSÃO

As análises moleculares indicaram que o bioestimulante à base de SH foi capaz de alterar vias de sinalização, biossíntese e transporte dos hormônios indol-3-acético, ácido jasmônico, ácido abscísico, brassinoesteróide e etileno, de nitrato, do metabolismo secundário e redox de plântulas de milho. Além disso, houve aumento da atividade das H<sup>+</sup>-ATPases de membrana e maior extrusão de prótons H<sup>+</sup>, que resultaram no aumento do comprimento radicular total e peso seco das plântulas de milho. Os resultados obtidos nesse trabalho contribuíram para o melhor entendimento dos mecanismos de ação de bioestimulante à base de SH.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, S., Pyl, P. T., and Huber, W. 2015. Genome analysis HTSeq — a Python framework to work with high-throughput sequencing data. 31:166–169.
- Andrews, S. 2010. FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> Accessed 29 January 2020.
- Astier, J., Gross, I., and Durner, J. 2018. Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany*, 69:14, 3401-3411.
- Atkinson, J. N., and Urwin, E. P. 2012. In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *Journal of Experimental Botany* 63:695–709.
- Azcona, I., Pascual, I., Aguirreolea, J., Fuentes, M., and García-mina, J. M. 2011. Growth and development of pepper are affected by humic substances derived from composted sludge. 916–924.
- Bakalova, S., Nikolova, A., and Nedeva, D. 2004. Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 30:64–77.
- Bigeard, J., and Hirt, H. 2018. Nuclear signaling of plant MAPKs. *Frontiers in plant science*, 9:469.
- Barone, V., Bertoldo, G., Magro, F., Broccanello, C., Puglisi, I., Baglieri, A., Cagnin, M., Concheri, G., Squartini, A., Pizzeghello, D., et al. 2019. Molecular and Morphological Changes Induced by. 1–18.
- Bettoni, M. M., Mogor, Á. F., Pauletti, V., Goicoechea, N., Aranjuelo, I., and Garmendia, I. 2016. Journal of Food Composition and Analysis Nutritional quality and yield of onion as affected by different application methods and doses of humic substances. *Journal of Food Composition and Analysis* 51:37–44.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
- Brasil 2004. Decreto 4.954 de 14 de janeiro de 2004. MAPA. Available at: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm). Accessed 19 January 2020.



- Brasil, I. N. S. nº 25, de 23 de julho de 2009. Aprova as normas sobre as. Available at: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-25-de-23-7-2009-fertilizantes-organicos.pdf>. Accessed 13 March 2020.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., and Pachter, L. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology* 34:525–527.
- Buchner, P., and Hawkesford, M. J. 2014. Complex phylogeny and gene expression patterns of members of the NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family (NPF) in wheat. *Journal of Experimental Botany* 65:5697–5710.
- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., and Ferrante, A. 2015. Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture*, 31:1, 1-17.
- Burdick, M. E. 1964. Commercial Humates for Agriculture and the Fertilizer Industry. 152–156.
- Cairns, J. E., Sanchez, C., Vargas, M., Ordoñez, R., and Araus, J. L. 2012. Dissecting Maize Productivity: Ideotypes Associated with Grain Yield under Drought Stress and Well-watered Conditions. *Journal of Integrative Plant Biology* 54:1007–1020.
- Calvo, P., Nelson, L., and Kloepper, J. W. 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil* 383:3–41.
- Canellas, L. P., and Olivares, F. L. 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1:1–11.
- Canellas, L. P., Canellas, N. O., Soares, T. S., and Olivares, F. L. 2019. Humic Acids Interfere with Nutrient Sensing in Plants Owing to the Differential Expression of TOR. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38:216-224.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P., and Piccolo, A. 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196:15–27.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., and Okorokova-fac, A. L. 2002. Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation , Lateral Root Emergence , and Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Activity in Maize Roots 1. 130:1951–1957.
- Canellas, L. P., Teixeira Junior, L. R. L., Dobbss, L. B., Silva, C. A., Medici, L. O., Zandonadi, D. B., and Façanha, A. R. 2008. Humic acids crossinteractions with

- root and organic acids. *Annals of Applied Biology*, 153:2, 157-166.
- Caradonia, F., Battaglia, V., Righi, L., Pascali, G., and La Torre, A. 2018. Plant Biostimulant Regulatory Framework: Prospects in Europe and Current Situation at International Level. *Journal of Plant Growth Regulation* 38:438–448.
- Carraro, N., Forestan, C., Canova, S., Traas, J., and Varotto, S. 2006. ZmPIN1a and ZmPIN1b Encode Two Novel Putative Candidates for Polar Auxin Transport and Plant Architecture Determination of Maize. *Plant Physiology* 142:254–264.
- Casadesús, A., Polo, J., and Munné-Bosch, S. 2019. Hormonal effects of an enzymatically hydrolyzed animal protein-based biostimulant (pepton) in water-stressed tomato plants. *Frontiers in Plant Science* 10:1–11.
- Çelik, H., Katkat, A. V., Aşık, B. B., and Turan, M. A. 2011. Communications in Soil Science and Plant Analysis Effect of Foliar-Applied Humic Acid to Dry Weight and Mineral Nutrient Uptake of Maize under Calcareous Soil Conditions Effect of Foliar-Applied Humic Acid to Dry Weight and Mineral Nutrient Uptake of Maiz. 3624.
- Chardin, C., Schenk, S. T., Hirt, H., Colcombet, J., and Krapp, A. 2017. Mitogen-Activated protein kinases in nutritional signaling in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 260, 101-108.
- Chen, L., Su, Z. Z., Huang, L., Xia, F. N., Qi, H., Xie, L. J., and Chen, Q. F. 2017. The AMP-activated protein kinase KIN10 is involved in the regulation of autophagy in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 8, 1201.
- Christensen, S. A., Nemchenko, A., Borrego, E., Murray, I., Sobhy, I. S., Bosak, L., Deblasio, S., Erb, M., Robert, C. A. M., Vaughn, K. A., et al. 2013. The maize lipoxygenase, ZmLOX10, mediates green leaf volatile, jasmonate and herbivore-induced plant volatile production for defense against insect attack. *Plant Journal* 74:59–73.
- Conselvan, G. B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Foggia, M. Di, Nardi, S., and Carletti, P. 2017. Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites. 119–134.
- Costa-silva, J., Domingues, D., and Lopes, F. M. 2017. RNA-Seq differential expression analysis : An extended review and a software tool. 1–18.
- Criscuolo, G., Valkov, V. T., Parlati, A., and Alves, L. M. 2012. Molecular characterization of the *Lotus japonicus* NRT1 ( PTR ) and NRT2 families. 1:1567–1581.
- Dechorgnat, J., Francis, K. L., Dhugga, K. S., Rafalski, J. A., Tyerman, S. D., Kaiser,

- B. N., Palmer, L. J., and Kaiser, B. N. 2018. Root Ideotype Influences Nitrogen Transport and Assimilation in Maize. 9:1–16.
- Deng, K., Dong, P., Wang, W., Feng, L., Xiong, F., Wang, K., ... and Ren, M. 2017. The TOR pathway is involved in adventitious root formation in Arabidopsis and potato. *Frontiers in Plant Science*, 8, 784.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolaï, M., and Meyer, C. 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO reports*, 8:9, 864-870.
- Dobin, A., and Gingeras, T. R. 2016. Mapping RNA-seq with STAR. *Curr Protoc Bioinformatics* 51:586–597.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. 2013. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21.
- Dröge-Laser, W., and Weiste, C. 2018. The C/S1 bZIP network: a regulatory hub orchestrating plant energy homeostasis. *Trends in plant science*, 23:5, 422-433.
- Dumas, J. B. . 1831. Procédés de l'analyse organique. *Ann Chem Phys* 47:198–213.
- Ekin, Z. 2019. Integrated Use of Humic Acid and Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Ensure Higher Potato Productivity in Sustainable Agriculture.
- Elena, A., Diane, L., Bacaicoa, E., Fuentes, M., Baigorri, R., Zamarreño, A. M., and Garci 2009. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. 47:215–223.
- Ertani, A., Francioso, O., Tugnoli, V., Righi, V., and Nardi, S. 2011a. Effect of Commercial Lignosulfonate-Humate on *Zea mays* L . Metabolism. 11940–11948.
- Ertani, A., Schiavon, M., Altissimo, A., Franceschi, C., and Nardi, S. 2011b. Phenol-containing organic substances stimulate phenylpropanoid metabolism in *Zea mays*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174:3, 496-503.
- Eyheraguibel, B., Silvestre, J., and Morard, P. 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. 99:4206–4212.
- FAO 2019. Crop Prospects and Food Situation - Quarterly Global Report no. 3, September 2019. Rome. Available at: <http://www.fao.org/home/en/> Accessed 09 February 2020.
- Fataftah, A. K., Walia, D. S., Gains, B., and Kotob, S. I. 2001. A comparative evaluation of known liquid humic acid.

- Ferrara, G., and Brunetti, G. 2010. Effects of the times of application of a soil humic acid on berry quality of table grape ( *Vitis vinifera* L .) cv Italia. 8:817–822.
- Ferreira, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039–1042.
- Fiske, C. H., and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66:375–400.
- Forestan, C., and Varotto, S. 2012. The role of PIN auxin efflux carriers in polar auxin transport and accumulation and their effect on shaping maize development. *Molecular Plant* 5:787–798.
- Forestan, C., Farinati, S., Zambelli, F., Pavesi, G., Rossi, V., and Varotto, S. 2020. Epigenetic signatures of stress adaptation and flowering regulation in response to extended drought and recovery in *Zea mays*. *Plant Cell and Environment* 43:55–75.
- Forestan, C., Meda, S., and Varotto, S. 2010. ZmPIN1-Mediated Auxin Transport Is Related to Cellular Differentiation during Maize Embryogenesis and Endosperm Development. *Plant Physiology* 152:1373–1390.
- Freschet, G. T., Swart, E. M. S., and Cornelissen, J. H. C. C. 2015. Integrated plant phenotypic responses to contrasting above- and below-ground resources : key roles of specific leaf area and root mass fraction. 206:1247–1260.
- Fridman, Y., and Savaldi-Goldstein, S. 2013. Brassinosteroids in growth control: How, when and where. *Plant Science* 209:24–31.
- Fu, L., Wang, P., and Xiong, Y. 2020. Target of Rapamycin signaling in plant stress responses. *Plant Physiology*, 182:4, 1613-1623.
- Galatro, A., Ramos-Artuso, F., Luquet, M., Buet, A., and Simontacchi, M. 2020. An update on nitric oxide production and role under phosphorus scarcity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- García, A. C., Olaetxea, M., Santos, L. A., Mora, V., Baigorri, R., Fuentes, M., Zamarreño, A. M., Berbara, R. L. L., and Garcia-Mina, J. M. 2016. Involvement of Hormone-and ROS-Signaling Pathways in the Beneficial Action of Humic Substances on Plants Growing under Normal and Stressing Conditions. *BioMed Research International* 2016:1–13.
- García, A. C., Santos, L. A., Izquierdo, F. G., Rumjanek, V. M., Castro, R. N., dos Santos, F. S., ... and 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.

- Garnett, T., Appleby, M. C., Balmford, a, Bateman, I. J., Benton, T. G., Bloomer, P., Burlingame, B., Dawkins, M., Dolan, L., Fraser, D.,... 2013. Sustainable Intensification in Agriculture: Premises and Policies. *Science Magazine* 341:33–34.
- Geisler, M., and Murphy, A. S. 2006. The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters* 580:1094–1102.
- Ghabbour, E. A., and Davies, G. 2007. ed. Humic substances: structures, models and functions. *Royal Society of Chemistry*.
- Gouvea, C. M. C. P., Souza, J. F., Magalhaes, A. C. N., and Martins, I. S. 1997. NO<sub>2</sub>-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, 21:3, 183-187.
- Grones, P., and Friml, J. 2015. Auxin transporters and binding proteins at a glance. *Journal of Cell Science* 128:1–7.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H. G., Stransky, H., and Serrano, R. 1991. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta* 185:527–537.
- Halpern, M., Bar-tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., and Yermiyahu, U. 2015. The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake. *Elsevier Inc*.
- He, X., Ma, H., Zhao, X., Nie, S., Li, Y., Zhang, Z., Shen, Y., Chen, Q., Lu, Y., Lan, H., et al. 2016. Comparative RNA-Seq analysis reveals that regulatory network of maize root development controls the expression of genes in response to N stress. *PloS one* 11:1–24.
- Hedden, P., and Sponsel, V. 2015. A Century of Gibberellin Research. *Journal of Plant Growth Regulation* 34:740–760.
- Hey, S. J., Byrne, E., and Halford, N. G. 2009. The interface between metabolic and stress signalling. *Annals of Botany*, 105:2, 197-203.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-nobusada, T., and Hayashi, H. 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis , compartmentalization and translocation. 59:75–83.
- Hwang, I., Sheen, J., and Bruno, M. 2012. Cytokinin Signaling Networks.
- Ibrahim, S. M., and Ali, A. M. 2018. Effect of Potassium Humate Application on Yield and Nutrient Uptake of Maize Grown In a Calcareous Soil.
- Ito, T., Okada, K., Fukazawa, J., and Takahashi, Y. 2018. DELLA-dependent and -independent gibberellin signaling. *Plant Signaling and Behavior* 13:1–3.
- Jagodzik, P., Tajdel-Zielinska, M., Ciesla, A., Marczak, M., and Ludwikow, A. 2018. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers*

*in plant science*, 9, 1387.

- Janicka-Russak M. 2011 Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. In: Shanker A, Venkateswarlu B (eds) Abiotic stress response in plants physiological, biochemical and genetic perspectives, Chap. 8. *InTech*, Rijeka, 197–218
- Jannin, L., Arkoun, M., Ourry, A., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., Fuentes, M., Francisco, S. S., Baigorri, R., Cruz, F., et al. 2012. Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. *Plant and Soil* 359:297–319.
- du Jardin, P. 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196:3–14.
- Jiang, Z., Jin, F., Shan, X., and Li, Y. 2019. Itraq-based proteomic analysis reveals several strategies to cope with drought stress in maize seedlings. *International Journal of Molecular Sciences* 20:1–17.
- Jiao, Y., Peluso, P., Shi, J., Liang, T., Stitzer, M. C., Wang, B., Campbell, M. S., Stein, J. C., Wei, X., Chin, C., et al. 2017. Improved maize reference genome with. *Nature Publishing Group* 546:524–527.
- Kaldenhoff, R., Ribas-carbo, M., Sans, J. F., and Lovisolo, C. 2008. Aquaporins and plant water balance. *Plant, Cell and Environment* 31:658–666.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., and Matsui, M. 2012. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. 109.
- Kassambara, A. 2017. ggpubr:“ggplot2” based publication ready plots. *R package version 0.16*:2017.
- Kawa, D., Meyer, A. J., Dekker, H. L., Abd-El-Halim, A. M., Gevaert, K., Van De Slijke, E., and Schuurink, R. C. 2020. SnRK2 protein kinases and mRNA decapping machinery control root development and response to salt. *Plant Physiology*, 182:1, 361-377.
- Khan, S. A., Ullah, H., Shahwar, D., Fahad, S., Khan, N., Yasir, M., Wahid, F., Adnan, M., and Noor, M. 2018. Heritability and correlation analysis of morphological and yield traits in Maize. *Journal of Plant Biology and Crop Research* 1:1–8.
- khaneghah, A. M., Shahryari, R., Alaei, Y., and Moghanlou, B. S. 2012. Comparison of the effect of liquid humic fertilizers on yield of maize genotypes in Ardabil region. *African Journal of Biotechnology* 11:4810–4814.

- Kochian, L. V. 2016. Root architecture. *Journal of Integrative Plant Biology* 58:190–192.
- Kolbert, Z., and Erdei, L. 2008. Involvement of nitrate reductase in auxin-induced NO synthesis. *Plant signaling & behavior*, 3:11, 972-973.
- Kovshov, S. V, and Iconnicov, D. A. 2017. Growing of grass , radish , onion and marigolds in vermicompost made from pig manure and wheat straw. 51:327–332.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., et al. 2010. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental cell* 18:927–37.
- Kurepa, J., and Smalle, J. A. 2019. *trans*-Cinnamic acid-induced leaf expansion involves an auxin-independent component. *Communicative & integrative biology*, 12:1, 82-85.
- Kurepa, J., Shull, T. E., Karunadasa, S. S., and Smalle, J. A. 2018. Modulation of auxin and cytokinin responses by early steps of the phenylpropanoid pathway. *BMC plant biology*, 18:1, 278.
- Lahens, N. F., Ricciotti, E., Smirnova, O., Toorens, E., Kim, E. J., Baruzzo, G., Hayer, K. E., Ganguly, T., Schug, J., and Grant, G. R. 2017. A comparison of Illumina and Ion Torrent sequencing platforms in the context of differential gene expression. *BMC genomics* 18:602.
- Léran, S., Muños, S., Brachet, C., Tillard, P., Gojon, A., and Lacombe, B. 2013. Arabidopsis NRT1 . 1 Is a Bidirectional Transporter Involved in Root-to-Shoot Nitrate Translocation. 6:1984–1987.
- Lewis, D. R., Ramirez, M. V., Miller, N. D., Vallabhaneni, P., Ray, W. K., Helm, R. F., ... and Muday, G. K. 2011. Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. *Plant physiology*, 156:1, 144-164.
- Li, Y., Wu, Y., Liao, W., Hu, L., Dawuda, M. M., Jin, X., ... and Yu, J. 2020. Nitric oxide is involved in the brassinolide-induced adventitious root development in cucumber. *BMC Plant Biology*, 20:1, 1-12.
- Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., and Zhang, J. Z. 2016. A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 47.
- Lian, H. L., Yu, X., Lane, D., Sun, W. N., Tang, Z. C., & Su, W. A. 2006. Upland rice and lowland rice exhibited different PIP expression under water deficit and ABA treatment. *Cell research*, 16:7, 651-660.
- Lima, S., Olivares, F. L., Oliveira, R. R. De, Raquel, M., Vega, G., Aguiar, N. O., and

- Canellas, L. P. 2014. Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. 1–18.
- Little et al., K. R. L., Rose, M. T. R., Jackson, W. R. J., Cavagnaro, T. R. C., and Patti, A. F. P. 2014. Do lignite-derived organic amendments improve early-stage pasture growth and key soil biological and physicochemical properties? 899–910.
- Liu, C., Muchhal, U. S., Uthappa, M., Kononowicz, A. K., and Raghothama, K. G. 1998. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiology* 116:91–99.
- Liu, X., Xu, X., Li, B., Wang, X., Wang, G., and Li, M. 2015. RNA-seq transcriptome analysis of maize inbred carrying nicosulfuron-tolerant and nicosulfuron-susceptible alleles. *International journal of molecular sciences*, 16:3, 5975-5989.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25:402–408.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., and Shafee, T. 2017. Transcriptomics technologies. *PLoS Computational Biology* 13:1–23.
- López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., Alatorre-Cobos, F., and Herrera-Estrella, L. 2013. Biotechnology of nutrient uptake and assimilation in plants. *International Journal of Developmental Biology*, 57:6-7-8, 595-610.
- Lu, K., Guo, W., Lu, J., Yu, H., Qu, C., Tang, Z., and Liang, Y... 2015. Genome-wide survey and expression profile analysis of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) gene family in *Brassica rapa*. *PLoS One*, 10:7.
- Lyons, G., and Genc, Y. 2016. Commercial Humates in Agriculture: Real Substance or Smoke and Mirrors? *Agronomy* 6:1–8.
- Jamsheer K, M., Jindal, S., and Laxmi, A. 2019. Evolution of TOR–SnRK dynamics in green plants and its integration with phytohormone signaling networks. *Journal of experimental botany*, 70:8, 2239-2259.
- De Michelis, M. I., and Spanswick, R. M. 1986. H<sup>+</sup>-Pumping Driven by the Vanadate-Sensitive ATPase in Membrane Vesicles from Corn Roots. *Plant Physiology* 82:542–547.
- Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, J. N., Lind, C., Bauer, H., Hashimoto, K., ... and Hedrich, R. 2014. Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Sci. Signal.*, 7:342.
- Manoli, A., Begheldo, M., Genre, A., Lanfranco, L., Trevisan, S., and Quaggiotti, S.



2014. NO homeostasis is a key regulator of early nitrate perception and root elongation in maize. *Journal of experimental botany*, 65:1, 185-200.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S. T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-rechenmann, C., and Bennett, M. J. 1999. AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. 18:2066–2073.
- Margalha, L., Confraria, A., and Baena-González, E. 2019. SnRK1 and TOR: modulating growth–defense trade-offs in plant stress responses. *Journal of experimental botany*, 70:8, 2261-2274.
- Marketsandmarkets.com. 2019. Biostimulants Market by Active Ingredient (Humic Substances, Amino Acids, Seaweed Extracts, Microbial Amendments), Crop Type (Fruits & Vegetables, Cereals, Turf & Ornamentals), Application Method, Form, and Region – Global Forecast to 2025. Abril de 2019. *USA MarketsandMarkets™ INC.*. Available at: <http://www.marketsandmarkets.com> Accessed 15 February 2020
- Martin, A., Lee, J., Kichey, T., Gerentes, D., Zivy, M., Tatout, C., ... and Tercé-Laforgue, T. 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *The Plant Cell*, 18:11, 3252-3274.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Ronchi, V., Benedicto, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Ronchi, V., and Benedicto, S. 2002. Communications in Soil Science and Plant Analysis Humic substances to reduce salt effect on plant germination and growth. 3624.
- McAdam, S. A. M., Brodribb, T. J., and Ross, J. J. 2016. Shoot-derived abscisic acid promotes root growth. *Plant Cell and Environment* 39:652–659.
- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C. 2002. Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99:9, 6422-6427.
- Mertens, R., Eberle, J., Arnscheidt, A., Ledebur, A., and Weiler, E. W. 1985. Monoelonal antibodies to plant growth regulators. *Planta (1985)*166:389-393 166:389–393.
- Miranda, R. D. S., Alvarez-Pizarro, J. C., Costa, J. H., Paula, S. D. O., Prisco, J. T., and Gomes-Filho, E. 2017. Putative role of glutamine in the activation of CBL/CIPK signalling pathways during salt stress in sorghum. *Plant signaling & behavior*, 12:8, 522-36.

- Mittler, R. 2017. ROS Are Good. *Trends in Plant Science* 22:1–9.
- Mockaitis, K., and Estelle, M. 2008. Auxin Receptors and Plant Development : A New Signaling Paradigm.
- Montané, M. H., and Menand, B. 2013. ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *Journal of experimental botany*, 64:14, 4361-4374.
- Moose, S. P., and Mumm, R. H. 2008. Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiology* 147:969–977.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Baigorri, R., Zamarreño, M. A., and García-Mina, J. M. 2014. NO and IAA Key Regulators in the Shoot Growth Promoting Action of Humic Acid in *Cucumis sativus* L . 430–439.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A.-M., Elena, A., Garnica, M., Fuentes, M., and García-mina, J. M. 2010. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins , polyamines and mineral nutrients. 167:633–642.
- Morard, P., Eyheraguibel, B., Morard, M., Silvestre, J., Morard, P., Eyheraguibel, B., Morard, M., Silvestre, J., Morard, P., Eyheraguibel, B.... 2010. Direct effects of humic-like substance on growth , water , and mineral nutrition of various species direct effects of humic-like substance on growth , water , and mineral nutrition of various species. 4167.
- Morozova, O., and Marra, M. A. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 92:255–264. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.07.001>.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T. P., and Hakoshima, T. 2008. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456:459–463.
- Muscolo, a., Sidari, M., Francioso, O., Tugnoli, V., and Nardi, S. 2007. The Auxin-like Activity of Humic Substances is Related to Membrane Interactions in Carrot Cell Cultures. *Journal of Chemical Ecology* 33:115–129.
- Muscolo, A., Cutrupi, S., and Nardi, S. 1998. Short communication iaa detection in humic substances. 30:1199–1201.
- Muscolo, A., Sidari, M., and Nardi, S. 2013. Humic substance : Relationship between structure and activity . Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration* 129:57–63.
- Nagel, O. W., Konings, H., and Lambers, H. 1994. Growth rate, plant development

- and water relations of the ABA-deficient tomato mutant sitiens. *Physiologia Plantarum*, 92:1, 102-108.
- Nardi, S., Ertani, A., and Francioso, O. 2017. Soil–root cross-talking: The role of humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180:1, 5-13.
- Nardi, S., Ertani, A., and Francioso, O. 2017. Soil–root cross-talking: The role of humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180:1, 5-13.
- Nardi, S., Muscolo, A., Vaccaro, S., Baiano, S., Spaccini, R., Piccolo, A. 2007. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry*, 39:12, 3138-3146.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., and Vianello, A. 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:11, 1527-1536.
- Nemec, S., and Lee, O. 1992. Effects of preplant deep tillage of soil amendments on soil mineral analysis, citrus growth, production and tree health. *Soil and Tillage Research*, 23:4, 317-331.
- Nitsch, L., Kohlen, W., Oplaat, C., Charnikhova, T., Cristescu, S., Michieli, P., ... & Rieu, I. 2012. ABA-deficiency results in reduced plant and fruit size in tomato. *Journal of plant physiology*, 169:9, 878-883.
- Noubhani, A. M., Sakr, S. 1996. Transcriptional and post-translational control of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by mechanical treatments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1281:2, 213-219.
- Ogunola, O. F., Hawkins, L. K., Mylroie, E., Kolomiets, M. V., Borrego, E., Tang, J. D., Williams, W. P., and Warburton, M. L. 2017. Characterization of the maize lipoxygenase gene family in relation to aflatoxin accumulation resistance. *PLoS ONE* 12:1–19.
- Olaetxea, M., Mora, V., Bacaicoa, E., Garnica, M., Fuentes, M., Casanova, E., Zamarreño, A. M., Iriarte, J. C., Etayo, D., Ederra, I., et al. 2015. Abscisic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused by rhizosphere humic acids. *Plant Physiology* 169:2587–2596.
- de Oliveira, N. T., and de Sousa, S. M. T. 2016. Avaliação de Plântulas de Milho sob Efeito de Bioestimulantes em Solução Nutritiva. Boletim de Pesquisa 138. Embrapa Milho e Sorgo.
- Olk, D. C., Dinnes, D. L., Rene Scoresby, J., Callaway, C. R., and Darlington, J. W.

2018. Humic products in agriculture: potential benefits and research challenges— a review. *Journal of Soils and Sediments* 18:2881–2891.
- ONU 2019. World Population Prospects 2019: Highlights. *United Nations Publication - Population Division*:2–3. Available at: [www.unpopulation.org](http://www.unpopulation.org) Accessed 05 February 2020.
- Van Oosten, M. J., Pepe, O., Pascale, S. De, Silletti, S., and Maggio, A. 2017. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*:1–12.
- Oracz, K., and Karpiński, S. 2016. Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Frontiers in Plant Science* 7:1–6.
- Pareek, A., Khurana, A., K Sharma, A., and Kumar, R. 2017. An overview of signaling regulons during cold stress tolerance in plants. *Current genomics*, 18:6, 498-511.
- Pascale, S., Roupael, Y., and Colla, G. 2017. Plant biostimulants: innovative tool for enhancing plant nutrition in organic farming. *Eur. J. Hortic. Sci*, 82:6 277-285.
- Pearson, K. 1909. Determination of the Coefficient of Correlation. *Science* 30:23–25.
- Peña-Méndez, E. M., Havel, J., and Patočka, J. 2005. Humic substances— compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *J. Appl. Biomed*, 3:1, 13-24.
- Péret, B., Li, G., Zhao, J., Band, L. R., Voß, U., Postaire, O., Luu, D., Ines, O. Da, Casimiro, I., Lucas, M., ... 2012. Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nature Cell Biology* 14:991–998.
- Perrot-Rechenmann, C. 2010. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:1–16.
- Peuravuori, J. 2005. NMR spectroscopy study of freshwater humic material in light of supramolecular assembly. *Environmental science & technology*, 39:15, 5541-5549.
- Philippar, K., Fuchs, I., Lüthen, H., Hoth, S., Bauer, C. S., Haga, K., Thiel, G., Ljung, K., Sandberg, G., Böttger, M., et al. 1999. Auxin-induced K<sup>+</sup> channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:12186–12191.
- Piccolo, A. 2002. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in agronomy*, 75, 57-134.

- Piccolo, A., and Spiteller, M. 2003. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 377:6, 1047-1059.
- Pii, Y., Alessandrini, M., Dall'Osto, L., Guardini, K., Prinsi, B., Espen, L., Zamboni, A., and Varanini, Z. 2016. Time-resolved investigation of molecular components involved in the induction of NO<sub>3</sub> high affinity transport system in maize roots. *Frontiers in Plant Science* 7:1–13.
- Pizzeghello, D., Francioso, O., Ertani, A., Muscolo, A., and Nardi, S. 2013. Isopentenyladenosine and cytokinin-like activity of different humic substances. *Journal of Geochemical Exploration* 129:70–75.
- Pizzeghello, D., Nicolini, G., and Nardi, S. 2001. Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvaticae* forests. 647–657.
- Plett, D., Toubia, J., Garnett, T., Tester, M., Kaiser, B. N., and Baumann, U. 2010. Dichotomy in the NRT Gene Families of Dicots and Grass Species. *PloS one* 5:1–12.
- Prinsi, B., and Espen, L. 2015. Mineral nitrogen sources differently affect root glutamine synthetase isoforms and amino acid balance among organs in maize. *BMC plant biology*, 15:1, 96.
- Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., and Nardi, S. 2004. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 55:803–813.
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., and Gu, Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent , Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*.
- Rayle, D. L., and Cleland, R. E. 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99:1271–1274.
- Ren, H., Willige, B. C., Jaillais, Y., Geng, S., Park, M. Y., Gray, W. M., and Chory, J. 2019. BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 3, a plasma membrane-associated scaffold protein involved in early brassinosteroid signaling. *PLoS genetics*, 15:1, e1007904.
- Robinson, M. D., and Smyth, G. K. 2007. Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. *Bioinformatics* 23:2881–2887.
- Robinson, M. D., and Smyth, G. K. 2008. Small-sample estimation of negative

- binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics* 9:321–332.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. 2009. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140.
- Rodriguez, M. C., Petersen, M., and Mundy, J. 2010. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 61, 621-649.
- Rose, M. T., Patti, A. F., Little, K. R., Brown, A. L., Jackson, W. R., and Cavagnaro, T. R. 2014. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: Practical implications for agriculture, 1st ed. *Elsevier Inc.*
- Sáiz-Jiménez, C., Hermosin, B., Trubetskaya, O. E., Reznikova, O. I., Afanas' Eva, G. V., and Trubetskoj, O. A. 2006. Thermochemolysis of genetically different soil humic acids and their fractions obtained by tandem size exclusion chromatography–polyacrylamide gel electrophoresis. *Geoderma*, 131:1-2, 22-32.
- Samota, M. K., Bhatt, L., Garg, N., and Geat, N. 2017. Defense Induced by Jasmonic Acid: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6:2467–2474.
- Sampedro, J., and Cosgrove, D. J. 2005. The expansin superfamily. *Genome Biology* 6:1–11.
- Sanders, D. C., Ricotta, J. A., and Hodges, L. 1990. Improvement of carrot stands with plant biostimulants and fluid drilling. *HortScience*, 25:2, 181-183.
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., and Nardi, S. 2010. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology* 36:662–669.
- Schmidt, W., Santi, S., Pinton, R., and Varanini, Z. 2007. Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in *Arabidopsis*. 259–267.
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., ... and Minx, P. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *science*, 326:5956, 1112-1115.
- Serna-saldivar, S. O., and Carrillo, E. P. 2019. Food Uses of Whole Corn and Dry-Milled Fractions, 3rd ed. *Elsevier Inc.*
- Sharma, A., Kumar, V., Kumar, R., Shahzad, B., Thukral, A. K., and Bhardwaj, R. 2018. Brassinosteroid-mediated pesticide detoxification in plants: A mini-review. *Cogent Food & Agriculture* 4:1–15.
- Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H.

- J., and Nguyen, H. T. 2004. Root growth maintenance during water deficits: Physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* 55:2343–2351.
- Shendure, J. A., Porreca, G. J., Church, G. M., Andrew, F., Hendrickson, C. L., Kieleczawa, J., and Slatko, B. E. 2011. *Overview of DNA Sequencing Strategies*. 1–23.
- Simpson, A. J. 2002. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40:13, 72-82.
- Smékalová, V., Doskočilová, A., Komis, G., and Šamaj, J. 2014. Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology advances*, 32:1, 2-11.
- Smyth, G. K., and Verbyla, A. P. 1996. A Conditional Likelihood Approach to Residual Maximum Likelihood Estimation in Generalized Linear Models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 58:565–572.
- Sorgonà, A., Lupini, A., Mercati, F., Dio, L. D. I., Sunseri, F., Bio, A., and Studi, U. 2011. Nitrate uptake along the maize primary root : an integrated. 1:1127–1140.
- Soto-Burgos, J., and Bassham, D. C. 2017. SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 12:8.
- Sun, Q., Ding, W., Yang, Y., Sun, J., and Ding, Q. 2016. Humic Acids Derived from Leonardite-Affected Growth and Nutrient Uptake of Corn Seedlings. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 47:1275–1282.
- Sun, T. 2010. Gibberellin-GID1-DELLA: A Pivotal Regulatory Module for Plant Growth and Development 1. 154:567–570.
- Sutton, R., and Sposito, G. 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environmental science & technology*, 39:23, 9009-9015.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., et al. 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature cell biology* 10:946–54.
- Swarup, R., and Péret, B. 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview. *Frontiers in plant science* 3:225.
- Sze, H., Li, X., and Palmgren, M. G. 1999. Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11:677–689.
- La Torre, A., Battaglia, V., and Caradonia, F. 2016. An overview of the current plant biostimulant legislations in different European Member States. *Journal of the*

*Science of Food and Agriculture* 96:727–734.

- Tabuchi, M., Sugiyama, K., Ishiyama, K., Inoue, E., Sato, T., Takahashi, H., & Yamaya, T. 2005. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1; 1, a cytosolic glutamine synthetase1; 1. *The Plant Journal*, 42:5, 641-651.
- Tahiri, A., Delporte, F., Muhovski, Y., Ongena, M., Thonart, P., and Druart, P. 2016. Plant Physiology and Biochemistry Change in ATP-binding cassette B1 / 19 , glutamine synthetase and alcohol dehydrogenase gene expression during root elongation in *Betula pendula* Roth and *Alnus glutinosa* L . Gaertn in response to leachate and leonardite h. *Plant Physiology et Biochemistry* 98:25–38.
- Tang, R. J., Zhao, F. G., Garcia, V. J., Kleist, T. J., Yang, L., Zhang, H. X., and Luan, S. 2015. Tonoplast CBL–CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112:10, 3134-3139.
- Tao, J. J., Chen, H. W., Ma, B., Zhang, W. K., Chen, S. Y., and Zhang, J. S. 2015. The role of ethylene in plants under salinity stress. *Frontiers in Plant Science* 6:1–12.
- Teale, W. D., Paponov, I. A., and Palme, K. 2006. Auxin in action : signalling , transport and the control of plant growth and development. 7:847–859.
- Thimm, O., Bla, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Kru, P., Selbig, J., Mu, L. A., Rhee, S. Y., and Stitt, M. 2004. MAPMAN : a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. 914–939.
- Tomé, F., Nägele, T., Adamo, M., Garg, A., Marco-Illorca, C., Nukarinen, E., and Tomar, M. 2014. The low energy signaling network. *Frontiers in plant science*, 5, 353.
- Trevisan, S., Botton, A., Vaccaro, S., Vezzaro, A., Quaggiotti, S., and 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.
- Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., Nardi, S., Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., and Nardi, S. 2010. Humic substances biological activity at the plant- soil interface Humic substances biological activity at the plant-soil interface. 2324.
- Trevisan, S., Manoli, A., and Quaggiotti, S. 2019. A novel biostimulant, belonging to

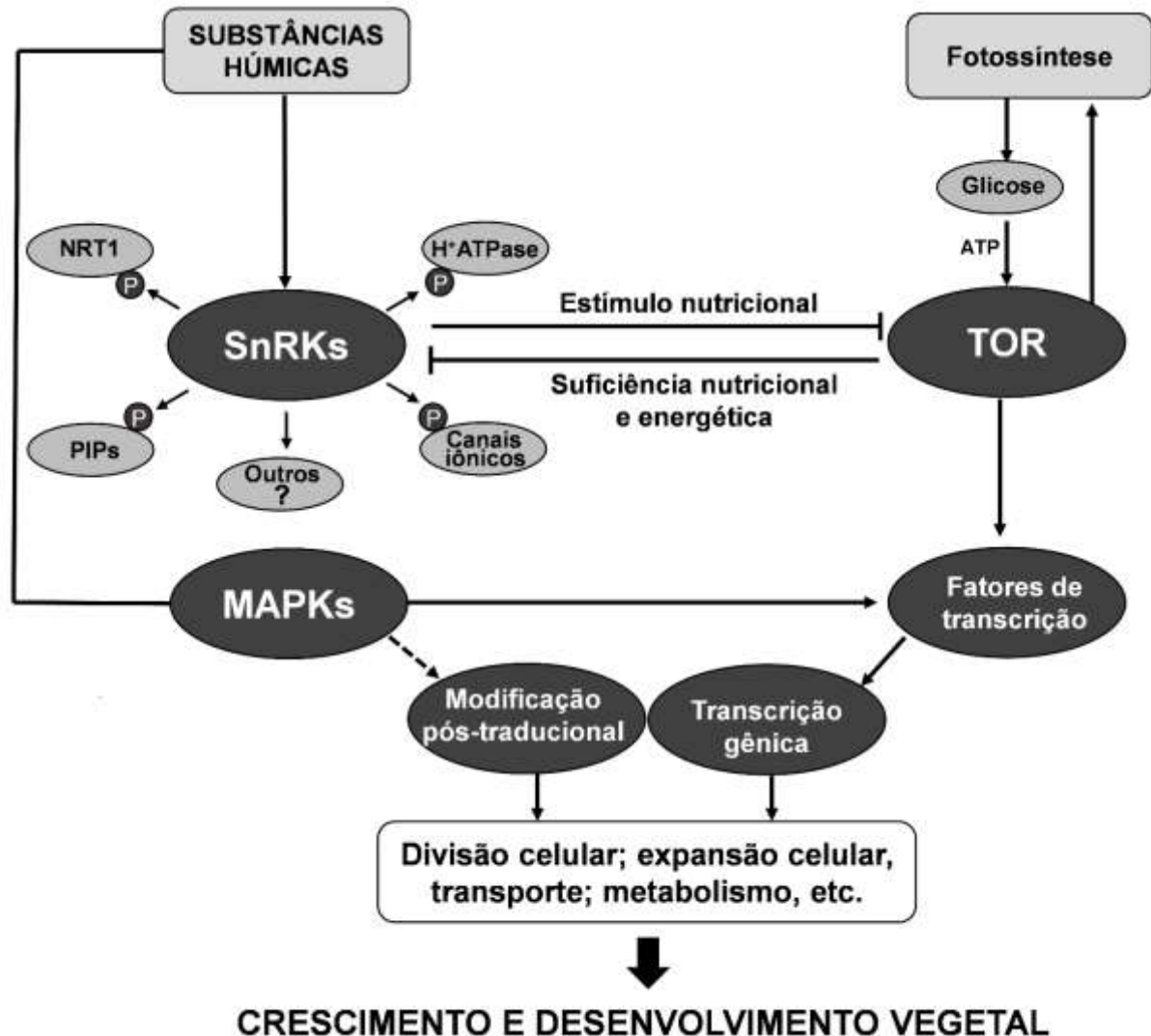


- protein hydrolysates, mitigates abiotic stress effects on maize seedlings grown in hydroponics. *Agronomy*, 9:1, 28.
- Trevisan, S., Manoli, A., Ravazzolo, L., Franceschi, C., and Quaggiotti, S. 2017. mRNA-sequencing analysis reveals transcriptional changes in root of maize seedlings treated with two increasing concentrations of a new biostimulant. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65:46, 9956-9969.
- Tripathi, V., Parasuraman, B., Laxmi, A., and Chattopadhyay, D. 2009. CIPK6, a CBL-interacting protein kinase is required for development and salt tolerance in plants. *The Plant Journal*, 58:5, 778-790.
- Tsay, Y., Chiu, C., Tsai, C., Ho, C., and Hsu, P. 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. 581:2290–2300.
- Van Tonder, J. T. 2008. Effect of Potassium Humate on Soil Properties and Growth of Wheat. *Master's Thesis, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa*.
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., and Guo, S. 2013. The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response. 7370–7390.
- Wang, R., and Estelle, M. 2014. ScienceDirect Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1 / AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology* 21:51–58.
- Wang, W. A., Wu, C. T., Lu, T. P., Tsai, M. H., Lai, L. C., and Chuang, E. Y. 2014. Comparisons and performance evaluations of RNA-seq alignment tools. *IEEE International Conference on Electrical Engineering and Computer Science* 00:215–218.
- Wang, Y., Deng, D., and Shi, Y. 2012. Diversification , phylogeny and evolution of auxin response factor ( ARF ) family : insights gained from analyzing maize ARF genes. 2401–2415.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.
- Weijers, D., Nemhauser, J., and Yang, Z. 2018. Auxin : small molecule , big impact. *eXtra Botany*:133–136.
- Weiste, C., Pedrotti, L., Selvanayagam, J., Muralidhara, P., Fröschel, C., Novák, O., ... and Dröge-Laser, W. 2017. The Arabidopsis *bZIP11* transcription factor links low-energy signalling to auxin-mediated control of primary root growth. *PLoS genetics*, 13:2.
- Wickham, H. 2016. ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis. *Springer* 174.

- Wilson, H. T., Xu, K., and Taylor, A. G. 2015. Transcriptome analysis of gelatin seed treatment as a biostimulant of cucumber plant growth. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Wimalanathan, K., Friedberg, I., Andorf, C. M., and Lawrence-Dill, C. J. 2018. Maize GO Annotation—Methods, Evaluation, and Review (maize-GAMER). *Plant Direct* 2:1–15.
- Wu, L., Zu, X., Zhang, H., Wu, L., Xi, Z., and Chen, Y. 2015. Overexpression of ZmMAPK1 enhances drought and heat stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 88:4-5, 429-443.
- Wybouw, B., and Rybel, B. De 2019. Cytokinin – A Developing Story. *Trends in Plant Science* 24:177–185.
- Xing, H., Pudake, R. N., Guo, G., Xing, G., Hu, Z., Zhang, Y., ... and Ni, Z. 2011. Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (ARF) gene family in maize. *BMC genomics*, 12:1, 178.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., and Sheen, J. 2013. Glucose–TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496:7444, 181-186.
- Xu, G., Fan, X., and Miller, A. J. 2012. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annu. Rev.* 63:153–82.
- Xu, L., and Geelen, D. 2018. Developing Biostimulants From Agro-Food and Industrial. 9:1–13.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., and Brown, P. H. 2017. Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant science*, 7, 2049.
- Yu, P., Eggert, K., von Wirén, N., Li, C., and Hochholdinger, F. 2015. Cell Type-Specific Gene Expression Analyses by RNA Sequencing Reveal Local High Nitrate-Triggered Lateral Root Initiation in Shoot-Borne Roots of Maize by Modulating Auxin-Related Cell Cycle Regulation. *Plant physiology* 169:690–704.
- Yu, Q., An, L., and Li, W. 2014. The CBL–CIPK network mediates different signaling pathways in plants. *Plant cell reports*, 33:2, 203-214.
- Yue, R., Tie, S., Sun, T., Zhang, L., Yang, Y., Qi, J., Yan, S., Han, X., Wang, H., and Shen, C. 2015. Genome-wide identification and expression profiling analysis of ZmPIN, ZmPILS, ZmLAX and ZmABCB auxin transporter gene families in maize (*Zea mays* L.) under various abiotic stresses. *PloS one* 10:e0118751.
- Zalabák, D., Pospíšilová, H., Šmehilová, M., Mrázová, K., Frébort, I., and Galuszka, P. 2013. Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to

- improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnology Advances* 31:97–117.
- Zandonadi, D. B., Canellas, L. P., and Façanha, A. R. 2007. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta* 225:1583–95.
- Zandonadi, D. B., Matos, C. R. R., Castro, R. N., Spaccini, R., Olivares, F. L., and Canellas, L. P. 2019. Alkamides: a new class of plant growth regulators linked to humic acid bioactivity. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6:1, 1-12.
- Zandonadi, D. B., Santos, M. P., Dobbss, L. B., Olivares, F. L., Canellas, L. P., Binzel, M. L., Okorokova-Façanha, A. L., and Façanha, A. R. 2010. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activation. *Planta* 231:1025–1036.
- Zanin, L., Tomasi, N., Zamboni, A., Segal, D., Varanini, Z., and Pinton, R. 2018. Water-extractable humic substances speed up transcriptional response of maize roots to nitrate. *Environmental and Experimental Botany* 147:167–178.
- Zhang, M., Smith, J. A. C., Harberd, N. P., and Jiang, C. 2016. The regulatory roles of ethylene and reactive oxygen species (ROS) in plant salt stress responses. *Plant Molecular Biology* 91:651–659.
- Zhang, Y., Paschold, A., Marcon, C., Liu, S., Tai, H., Nestler, J., -Ting Yeh, C., Opitz, N., Lanz, C., Schnable, P. S., et al. 2014. The Aux/IAA gene rum1 involved in seminal and lateral root formation controls vascular patterning in maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Journal of Experimental Botany* 65:4919–4930.
- Zhao, L., Zhang, W., Yang, Y., Li, Z., Li, N., Qi, S., Crawford, N. M., and Wang, Y. 2018. The Arabidopsis NLP7 gene regulates nitrate signaling via NRT1.1-dependent pathway in the presence of ammonium. *Scientific Reports* 8:1–13.
- Zhao, Y. 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:49–64.
- Zheng, J., He, C., Qin, Y., Lin, G., Park, W. D., Sun, M., Li, J., Lu, X., Zhang, C., Yeh, C. T., et al. 2019. Co-expression analysis aids in the identification of genes in the cuticular wax pathway in maize. *Plant Journal* 97:530–542.
- Zörb, C., Stracke, B., Tramnitz, B., Denter, D., Sümer, A., Mühling, K. H., Yan, F., and Schubert, S. 2005. Does H<sup>+</sup> pumping by plasmalemma ATPase limit leaf growth of maize (*Zea mays*) during the first phase of salt stress? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168:550–557.

ANEXOS



**Figura S1** - Proteínas quinases *SnRKs-TOR-MAPKs* como principais reguladoras do metabolismo e crescimento das plantas moduladas por bioestimulante de SH. A ativação da *SnRKs* pelo bioestimulante, fosforilam proteínas essenciais para aquisição de nutrientes e água, como os canais iônicos, o transportador de nitrogênio *NRT1*, as aquaporinas do tipo *PIPs*, fatores de transcrição (TFs) e ATPase de membrana plasmática e reprimir a atividade da quinase *TOR*. Em condições nutricionais suficientes, *TOR* é ativada, e torna-se um repressor das *SnRKs*. A atividade de *TOR* permite o controle de processos fotossintético, assim como, a síntese de açúcares de a produção de ATP. Em resposta a suficiência energética e nutricional, *TOR* promove a ativação TFs ligado a processos metabólicos, transportes, diferenciação, divisão e expansão celular, assim acelera o crescimento e desenvolvimento vegetal. As *MAPKs* moduladas pelo bioestimulante, atua a jusante na via da quinase *TOR*, principalmente na ativação de TFs, além de participar de cascatas de sinalizações que envolvem modificações pós-traducionais contribuindo na regulação de vias relacionadas a mecanismos de aclimatação à ambiental.

**Tabela S1** – Proteínas quinases associadas a via da quinase TOR (KEGG) diferencialmente expressas na raiz e parte aérea das plântulas de milho tratadas com o bioestimulante.

<b>Tissue</b>	<b>Acession</b>	<b>Decription</b>	<b>log2FC</b>
<b>Root</b>	Zm00001d047758	MAP kinase1	0.6848
	Zm00001d041422	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 4	1.2293
	Zm00001d035588	Serine/threonine-protein kinase	1.2304
	Zm00001d018182	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase	0.8925
	Zm00001d020703	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase	0.9665
<b>Shoot</b>	Zm00001d011625	Putative WAK receptor-like protein kinase family protein	0.5371
	Zm00001d020496	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 5	1.1723
	Zm00001d020497	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 6	0.6090
	Zm00001d024762	Putative CBL-interacting protein kinase family protein	0.3950
	Zm00001d028711	MAP kinase3	1.0445
	Zm00001d032155	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 15	1.1288
	Zm00001d033316	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 4	0.8486
Zm00001d036771	Protein kinase superfamily protein	0.7202	

**Tabela S2** - Genes diferencialmente expressos (DEGs) na raiz de plântula de milho tratadas com bioestimulante de SH.

Gene	Function	logFC	logCPM	PValue	FDR
Zm00001d020350	Alpha-amylase 1	2.779	0.625	0.000	0.000
Zm00001d044864	Protein EXORDIUM	2.518	1.361	0.000	0.001
Zm00001d008730	seed gene 3	2.454	0.506	0.000	0.000
Zm00001d007464	KDEL-tailed cysteine endopeptidase CEP1	2.337	0.662	0.000	0.001
Zm00001d004387	Probable flavin-containing monooxygenase 1	2.287	1.955	0.000	0.000
Zm00001d049217	Senescence-specific cysteine protease SAG12	2.282	2.752	0.000	0.023
Zm00001d007924	cytochrome P450 family 93 subfamily D polypeptide 1	2.099	1.927	0.000	0.000
Zm00001d032839	-	2.066	0.956	0.000	0.010
Zm00001d029776	Serine carboxypeptidase-like 34	1.913	3.137	0.000	0.006
Zm00001d020351	Alpha-amylase 1	1.855	5.073	0.000	0.000
Zm00001d049219	Senescence-specific cysteine protease SAG12	1.806	2.905	0.000	0.029
Zm00001d004671	-	1.800	2.960	0.000	0.013
Zm00001d034097	cytochrome P450 family 81 subfamily D polypeptide 8	1.791	4.259	0.000	0.008
Zm00001d012782	UDP-glycosyltransferase 88A1	1.755	1.658	0.000	0.011
Zm00001d022277	tolB protein-related	1.737	3.246	0.000	0.019
Zm00001d050635	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1.735	2.632	0.000	0.008
Zm00001d034763	Harpin-induced protein	1.680	0.649	0.000	0.027
Zm00001d036221	-	1.678	0.643	0.001	0.041
Zm00001d025699	Nucleotide binding protein	1.649	0.153	0.000	0.031
Zm00001d054067	Probable inactive linolenate hydroperoxide lyase	1.628	0.830	0.000	0.024
Zm00001d052963	-	1.610	1.458	0.000	0.032
Zm00001d035756	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	1.602	4.804	0.001	0.040
Zm00001d048723	Tropinone reductase homolog	1.590	0.312	0.000	0.026
Zm00001d002042	Peroxidase 52	1.590	1.173	0.000	0.002
Zm00001d011649	UDP-glycosyltransferase 88A1	1.580	4.140	0.001	0.040
Zm00001d016584	LITAF-domain-containing protein	1.564	1.417	0.000	0.003

[continua]

[continuação]

Zm00001d028389	-	1.558	4.935	0.000	0.000
Zm00001d018159	Alpha-amylase 1	1.558	0.890	0.000	0.024
Zm00001d039408	Enoyl-CoA delta isomerase 2 peroxisomal	1.556	0.002	0.000	0.026
Zm00001d003190	Endochitinase A	1.539	6.930	0.000	0.029
Zm00001d016947	-	1.528	0.466	0.000	0.026
Zm00001d048690	Serine carboxypeptidase-like 50	1.528	1.935	0.000	0.025
Zm00001d052322	Prenylated Rab receptor 2	1.516	1.974	0.001	0.047
Zm00001d021666	isocitrate lyase1	1.515	4.585	0.000	0.000
Zm00001d025703	ABC transporter B family member 15	1.505	1.842	0.000	0.001
Zm00001d041685	RALF	1.493	1.451	0.000	0.017
Zm00001d008210	Germin-like protein subfamily 2 member 1	1.482	2.930	0.000	0.006
Zm00001d050967	Isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit 3 mitochondrial	1.482	2.683	0.000	0.011
Zm00001d011932	Putative cytochrome P450 superfamily protein	1.481	1.204	0.000	0.039
Zm00001d036671	-	1.466	0.135	0.000	0.025
Zm00001d018847	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein	1.462	1.049	0.000	0.028
Zm00001d009022	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	1.461	3.290	0.000	0.026
Zm00001d034461	Tryptophan synthase alpha chain chloroplastic	1.456	1.028	0.001	0.045
Zm00001d009247	Rapid alkalization factor 1	1.456	0.399	0.000	0.029
Zm00001d051149	myb transcription factor39	1.450	0.981	0.000	0.031
Zm00001d039146	Serine carboxypeptidase-like 50	1.450	2.831	0.000	0.024
Zm00001d012088	-	1.441	5.759	0.000	0.003
Zm00001d030214	(Z)-3-hexen-1-ol acetyltransferase glycosyl hydrolase family 10 protein / carbohydrate-binding domain- containing protein	1.433	0.069	0.001	0.042
Zm00001d039958		1.432	2.111	0.000	0.002
Zm00001d007753	Eukaryotic aspartyl protease family protein	1.429	6.787	0.000	0.017
Zm00001d010385	Protein UPSTREAM OF FLC	1.427	0.183	0.000	0.036
Zm00001d032850	phosphate transporter protein2	1.426	4.969	0.000	0.006
Zm00001d043442	carotenoid cleavage dioxygenase8	1.422	1.633	0.001	0.041

[continua]



[continuação]

Zm00001d018358	Protein TIC 55 chloroplastic	1.411	1.059	0.001	0.040
Zm00001d005819	Copper transporter 5	1.407	4.585	0.000	0.002
Zm00001d019933	-	1.397	3.227	0.000	0.018
Zm00001d021329	Agmatine coumaroyltransferase	1.396	2.397	0.000	0.000
Zm00001d013610	Osmotin-like protein OSM34	1.389	0.605	0.000	0.036
Zm00001d032438	AAA-ATPase	1.368	1.642	0.000	0.010
Zm00001d030267	-	1.366	2.498	0.000	0.010
Zm00001d041571	Eukaryotic aspartyl protease family protein	1.364	4.453	0.000	0.008
Zm00001d017366	Ethylene-responsive transcription factor ERF053	1.362	3.109	0.000	0.018
Zm00001d045063	Cytochrome P450 709B2	1.361	1.868	0.000	0.034
Zm00001d018619	Peroxidase 1	1.356	6.948	0.000	0.002
Zm00001d008853	Putative HLH DNA-binding domain superfamily protein	1.351	1.676	0.000	0.011
Zm00001d006775	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	1.349	3.652	0.001	0.045
Zm00001d023529	abscisic acid stress ripening1	1.348	4.606	0.000	0.000
Zm00001d012900	Cell number regulator 10	1.345	4.499	0.001	0.044
Zm00001d026576	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	1.344	4.227	0.001	0.050
Zm00001d027345	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM23-3	1.344	0.805	0.000	0.026
Zm00001d023856	RALF	1.337	2.259	0.001	0.048
Zm00001d031562	Ras-related protein RABA6a	1.334	2.013	0.001	0.044
Zm00001d014121	Ent-cassadiene C2-hydroxylase	1.329	5.194	0.000	0.015
Zm00001d042581	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	1.328	2.088	0.000	0.026
Zm00001d042022	Peroxidase 12	1.320	4.114	0.000	0.003
Zm00001d039256	DUF1685 family protein	1.316	1.576	0.001	0.048
Zm00001d029202	Electron transporter	1.311	2.173	0.000	0.013
Zm00001d035657	Putative E3 ubiquitin-protein ligase XBAT31	1.310	4.430	0.001	0.043
Zm00001d033496	nicotianamine synthase 3	1.300	1.745	0.000	0.028
Zm00001d036608	Glycosyl hydrolases family 31 protein	1.289	0.745	0.000	0.034
Zm00001d028282	Cytochrome P450 CYP74A19	1.285	4.266	0.000	0.035

[continua]

[continuação]

Zm00001d031158	pathogenesis related protein5	1.280	7.271	0.000	0.003
Zm00001d032620	NDR1/HIN1-like 25	1.277	1.818	0.000	0.018
Zm00001d042633	Dirigent protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B6U4J7]	1.273	3.845	0.000	0.004
Zm00001d020780	glutathione transferase23	1.263	3.767	0.001	0.044
Zm00001d008377	Putative alcohol dehydrogenase superfamily protein	1.256	4.082	0.000	0.034
Zm00001d021732	Cellulose synthase-like protein D3	1.255	3.440	0.000	0.002
Zm00001d042095	glutathione transferase29	1.247	2.076	0.000	0.012
Zm00001d022480	Pentatricopeptide repeat-containing protein mitochondrial	1.237	0.538	0.001	0.040
Zm00001d052104	Putative subtilase family protein	1.235	5.289	0.000	0.034
Zm00001d016948	-	1.235	2.184	0.000	0.020
Zm00001d014060	Protein NRT1/ PTR FAMILY 5.2	1.231	2.510	0.000	0.031
Zm00001d035588	Serine/threonine-protein kinase	1.230	1.456	0.000	0.033
Zm00001d018682	Os07g0120600 protein	1.230	1.058	0.000	0.017
Zm00001d041422	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 4	1.229	3.993	0.000	0.000
Zm00001d013231	cytochrome P450 family 81 subfamily D polypeptide 8	1.229	3.984	0.000	0.013
Zm00001d018965	Xylanase inhibitor protein 1	1.226	2.496	0.001	0.044
Zm00001d027305	Silicon transporter	1.214	6.299	0.000	0.006
Zm00001d047944	-	1.213	4.143	0.000	0.000
Zm00001d038645	GDSL esterase/lipase	1.202	3.208	0.000	0.026
Zm00001d051896	Protein DOWNY MILDEW RESISTANCE 6	1.201	3.884	0.000	0.017
Zm00001d019089	HIPL1 protein	1.195	4.729	0.000	0.020
Zm00001d018738	pathogenesis related protein4	1.189	6.068	0.000	0.026
Zm00001d025949	Vacuolar iron transporter homolog 1	1.184	2.389	0.000	0.002
Zm00001d025807	UPF0481 protein	1.181	1.438	0.000	0.036
Zm00001d029397	phospholipase D7	1.180	4.338	0.000	0.034
Zm00001d011650	VIP1 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B4FRS6]	1.175	4.156	0.000	0.011
Zm00001d048887	-	1.172	2.678	0.000	0.003

[continua]

[continuação]

Zm00001d011739	Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	1.169	1.032	0.000	0.028
Zm00001d027925	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3	1.166	5.806	0.000	0.008
Zm00001d029474	Scarecrow-like protein 29	1.166	0.891	0.001	0.040
Zm00001d046626	Putative leucine-rich repeat protein kinase family protein	1.163	2.015	0.001	0.040
Zm00001d008329	Zinc inducible protein	1.147	2.743	0.000	0.031
Zm00001d019060	deoxy xylulose synthase 2	1.144	4.938	0.000	0.000
Zm00001d020707	Probable carboxylesterase 2	1.143	1.244	0.000	0.036
Zm00001d028888	nicotianamine synthase2	1.138	6.258	0.000	0.007
Zm00001d049189	DC2 protein	1.134	2.821	0.000	0.036
Zm00001d048230	E3 ubiquitin-protein ligase ATL6	1.132	2.053	0.001	0.041
Zm00001d037751	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	1.131	2.477	0.000	0.022
Zm00001d052139	Nitrate reductase	1.131	2.598	0.000	0.022
Zm00001d048021	allene oxide synthase1	1.123	5.956	0.000	0.019
Zm00001d030759	Lectin-like receptor kinase 7	1.115	2.605	0.001	0.040
Zm00001d046491	Putative alcohol dehydrogenase superfamily protein	1.111	2.768	0.000	0.006
Zm00001d036441	zinc finger (C2H2 type) family protein	1.107	4.947	0.000	0.033
Zm00001d042114	-	1.105	3.691	0.000	0.019
Zm00001d003414	NAC domain-containing protein 79	1.105	3.383	0.000	0.002
Zm00001d026042	Probable purine permease 11	1.104	1.977	0.000	0.028
Zm00001d052776	VAMP protein SEC22	1.100	2.949	0.000	0.019
Zm00001d017840	Delta(12)-fatty-acid desaturase	1.099	6.103	0.000	0.028
Zm00001d032870	L-type lectin-domain containing receptor kinase V.9	1.097	1.245	0.001	0.044
Zm00001d017613	Protein LYK2	1.096	4.248	0.000	0.023
Zm00001d015377	Pentatricopeptide repeat-containing protein	1.087	2.133	0.000	0.018
Zm00001d047736	asparagine synthetase4	1.086	6.029	0.000	0.014
Zm00001d024752	Peroxidase 64	1.086	3.834	0.001	0.048
Zm00001d003245	Inactive LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase BIR2	1.081	2.704	0.000	0.026

[continua]

[continuação]

Zm00001d024759	Peptide chain release factor 1	1.081	6.658	0.000	0.001
Zm00001d011275	DUF538 family protein	1.080	3.685	0.000	0.007
Zm00001d041800	BTB/POZ domain-containing protein	1.077	3.360	0.000	0.001
Zm00001d039947	Spermidine hydroxycinnamoyl transferase	1.066	5.228	0.000	0.033
Zm00001d044230	DUF538 family protein	1.064	2.919	0.000	0.031
Zm00001d020947	DNA-binding bromodomain-containing protein	1.064	3.677	0.000	0.026
Zm00001d029842	Divalent ion symporter	1.064	5.124	0.001	0.042
Zm00001d038873	plant/F18B13-26 protein	1.063	2.157	0.000	0.036
Zm00001d015468	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 5	1.060	2.942	0.000	0.020
Zm00001d027700	phosphate transporter protein9	1.057	8.851	0.000	0.000
Zm00001d006936	Peroxidase 64	1.054	2.266	0.000	0.026
Zm00001d009936	Basic endochitinase A	1.052	3.744	0.000	0.027
Zm00001d012091	Pro-resilin [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:C0P7I7]	1.052	6.668	0.000	0.006
Zm00001d007705	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	1.048	2.141	0.001	0.040
Zm00001d014116	phosphate transporter protein1	1.048	4.784	0.000	0.037
Zm00001d026163	extensin-like protein	1.046	5.849	0.000	0.013
Zm00001d021286	Protein kinase superfamily protein	1.038	2.615	0.001	0.044
Zm00001d008595	Pirin-like protein 2	1.036	3.125	0.000	0.016
Zm00001d005315	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	1.034	4.458	0.000	0.031
Zm00001d032459	cytochrome P450 family 87 subfamily A polypeptide 6	1.031	3.102	0.000	0.019
Zm00001d028230	Sugar transport protein 13	1.029	4.977	0.000	0.014
Zm00001d048411	Metal ion binding protein	1.028	2.300	0.000	0.036
Zm00001d005823	Flavonoid 3-monooxygenase	1.020	5.386	0.000	0.024
Zm00001d051478	Histone H4	1.020	5.029	0.000	0.031
Zm00001d005945	-	1.017	4.209	0.000	0.006
Zm00001d025437	Amino acid permease	1.013	3.211	0.001	0.044
Zm00001d017333	Serine carboxypeptidase-like 34	1.012	3.448	0.001	0.044

[continua]

[continuação]

Zm00001d047639	nicotianamine synthase6	1.005	8.553	0.000	0.001
Zm00001d010494	-	1.000	1.584	0.001	0.041
Zm00001d020740	Probable carboxylesterase 2	0.994	2.479	0.001	0.040
Zm00001d046142	E3 ubiquitin-protein ligase ATL41	0.993	1.387	0.001	0.042
Zm00001d036835	Peroxidase 67	0.993	4.143	0.000	0.023
Zm00001d008604	Protein NRT1/ PTR FAMILY 8.1	0.991	3.745	0.000	0.004
Zm00001d037849	Trans-cinnamate 4-monooxygenase	0.990	6.093	0.000	0.026
Zm00001d019750	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	0.990	4.535	0.000	0.019
Zm00001d044153	cytochrome P450 10	0.989	2.708	0.001	0.044
Zm00001d023918	Purple acid phosphatase 10	0.987	3.561	0.000	0.009
Zm00001d052744	Lipopolysaccharide-modifying protein	0.984	3.807	0.000	0.014
Zm00001d048356	24-methylenesterol C-methyltransferase 2	0.983	3.351	0.001	0.040
Zm00001d047830	kaurenoic acid oxidase2	0.981	5.477	0.000	0.005
Zm00001d009224	Putative HLH DNA-binding domain superfamily protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B4FNT9]	0.979	2.287	0.001	0.042
Zm00001d002897	peroxidase14	0.977	5.794	0.001	0.045
Zm00001d027454	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	0.972	4.600	0.000	0.030
Zm00001d046263	Amino acid permease 6	0.968	4.066	0.000	0.002
Zm00001d028816	Pathogenesis-related protein 10	0.967	5.680	0.000	0.032
Zm00001d020703	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase	0.967	3.104	0.001	0.048
Zm00001d039487	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase1	0.964	1.640	0.001	0.042
Zm00001d012090	-	0.961	8.518	0.000	0.030
Zm00001d026649	opaque endosperm7	0.960	4.804	0.001	0.041
Zm00001d018529	-	0.957	4.829	0.001	0.044
Zm00001d044120	Sterol 14-demethylase	0.955	3.993	0.000	0.025
Zm00001d007830	Leucine-rich repeat extensin-like protein 6	0.954	3.604	0.001	0.040
Zm00001d048191	Membrane protein	0.953	5.582	0.000	0.009
Zm00001d034745	Cell number regulator 7	0.952	3.630	0.000	0.033

[continua]

[continuação]

Zm00001d020400	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 6	0.951	4.854	0.000	0.002
Zm00001d047705	Cyclase/dehydrase family protein	0.950	2.874	0.000	0.024
Zm00001d027996	Alcohol dehydrogenase-like 2	0.950	5.528	0.000	0.000
Zm00001d032570	soluble epoxide hydrolase	0.949	4.999	0.000	0.012
Zm00001d039698	cytochrome P450 family 706 subfamily A polypeptide 5	0.949	4.956	0.000	0.003
Zm00001d007316	Oligosaccharyltransferase complex/magnesium transporter family protein	0.942	3.487	0.000	0.028
Zm00001d007604	Patatin-like protein 2	0.940	2.957	0.000	0.026
Zm00001d014555	Tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1	0.938	5.104	0.000	0.009
Zm00001d016919	Sugar transport protein 5	0.936	4.214	0.000	0.026
Zm00001d042540	Linoleate 9S-lipoxygenase 1	0.934	8.114	0.000	0.023
Zm00001d005594	Sugar transport protein 14	0.933	4.366	0.000	0.019
Zm00001d052137	Probable tyrosine-protein phosphatase	0.932	3.928	0.000	0.011
Zm00001d028360	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	0.932	7.088	0.000	0.011
Zm00001d011645	Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	0.929	1.983	0.001	0.041
Zm00001d012909	soluble epoxide hydrolase	0.929	3.553	0.001	0.043
Zm00001d020556	WAT1-related protein	0.927	3.300	0.000	0.034
Zm00001d040581	Peroxidase 2	0.925	6.126	0.000	0.019
Zm00001d014134	Ent-cassadiene C2-hydroxylase	0.922	6.202	0.000	0.003
Zm00001d046357	Beta-galactosidase	0.921	6.193	0.000	0.025
Zm00001d012228	4%2C5-DOPA dioxygenase extradiol	0.921	4.463	0.000	0.036
Zm00001d047441	NADPH:quinone oxidoreductase	0.919	4.739	0.001	0.044
Zm00001d002939	C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family protein	0.919	4.229	0.000	0.035
Zm00001d020938	bZIP transcription factor family protein	0.917	3.538	0.000	0.011
Zm00001d033286	Phenylalanine ammonia-lyase 1	0.912	5.703	0.001	0.044
Zm00001d020595	Ethylene response factor	0.911	6.872	0.000	0.034
Zm00001d034365	Syntaxin 121	0.906	2.932	0.001	0.045
Zm00001d041726	Protein DOWNY MILDEW RESISTANCE 6	0.904	5.700	0.000	0.001

[continua]

[continuação]

Zm00001d032858	kaurene synthase1	0.901	4.999	0.000	0.011
Zm00001d010380	Zinc finger CCCH domain-containing protein 23	0.899	4.445	0.000	0.036
Zm00001d045519	Oligopeptide transporter 7	0.899	3.198	0.000	0.026
Zm00001d038642	Protein SULFUR DEFICIENCY-INDUCED 1	0.895	2.766	0.000	0.022
Zm00001d031510	-	0.894	3.797	0.000	0.007
Zm00001d016696	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0.893	3.791	0.001	0.040
Zm00001d018182	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase	0.893	2.827	0.000	0.028
Zm00001d023216	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0.890	6.201	0.001	0.042
Zm00001d053394	-	0.888	8.819	0.001	0.040
Zm00001d044920	NAD(P)H dehydrogenase C1	0.887	4.587	0.000	0.028
Zm00001d017249	ammonium transporter2	0.886	3.058	0.000	0.034
Zm00001d020585	Histone H4	0.881	4.725	0.000	0.033
Zm00001d040248	Laccase-7	0.876	4.768	0.000	0.002
Zm00001d011879	-	0.873	5.032	0.000	0.008
Zm00001d044604	Putative serine/threonine-protein kinase-like protein CCR3	0.870	4.812	0.000	0.028
Zm00001d024853	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase15	0.868	2.337	0.001	0.050
Zm00001d031677	MtN19-like protein	0.867	4.929	0.001	0.049
Zm00001d020184	protein kinase-related	0.867	4.440	0.000	0.008
Zm00001d017714	Protein NRT1/ PTR FAMILY 8.3	0.864	3.438	0.001	0.043
Zm00001d002901	Peroxidase 12	0.862	6.327	0.001	0.040
Zm00001d035111	Expansin-A11	0.860	2.537	0.001	0.041
Zm00001d028887	nicotianamine synthase9	0.854	6.806	0.000	0.002
Zm00001d043650	Tryptophan aminotransferase-related protein 4	0.851	4.042	0.000	0.012
Zm00001d042740	UDP-glycosyltransferase 91A1	0.850	3.080	0.001	0.048
Zm00001d042541	lipxygenase2	0.849	8.716	0.000	0.003
Zm00001d010149	-	0.847	2.717	0.001	0.044
Zm00001d052651	Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 5	0.846	4.505	0.001	0.040

[continua]

[continuação]

Zm00001d002820	Vacuolar iron transporter homolog 1	0.846	4.144	0.001	0.040
Zm00001d018734	Pathogenesis-related protein 1	0.845	5.677	0.000	0.006
Zm00001d033152	Cytochrome P450 CYP71W7	0.842	4.100	0.001	0.048
Zm00001d040067	Glycosyltransferase family 61 protein	0.836	4.772	0.001	0.044
Zm00001d050011	Alpha carbonic anhydrase 7	0.835	4.602	0.000	0.024
Zm00001d038262	Patellin-1	0.835	6.551	0.000	0.034
Zm00001d052335	Peroxidase 67	0.830	4.532	0.000	0.005
Zm00001d040519	Germin-like protein subfamily 2 member 1	0.829	6.976	0.001	0.040
Zm00001d003760	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0.829	3.686	0.000	0.023
Zm00001d031209	benzoxazinone synthesis9	0.827	6.862	0.000	0.038
Zm00001d028260	glutamine synthetase6	0.821	9.337	0.000	0.000
Zm00001d020977	-	0.817	5.814	0.000	0.012
Zm00001d020569	Transcription factor MYB36	0.813	4.351	0.001	0.048
Zm00001d052978	ADP-ribosylation factor C1	0.810	5.152	0.000	0.030
Zm00001d032318	-	0.805	4.063	0.000	0.036
Zm00001d007700	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0.803	3.539	0.000	0.023
Zm00001d004843	abscisic acid stress ripening2	0.800	7.898	0.000	0.022
Zm00001d003800	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0.800	5.173	0.000	0.012
Zm00001d009296	Pathogenesis-related protein PRMS	0.798	6.536	0.000	0.018
Zm00001d015862	-	0.797	2.910	0.000	0.034
Zm00001d033446	Zinc transporter 7	0.796	5.440	0.000	0.028
Zm00001d052768	BTB/POZ domain-containing protein	0.792	4.670	0.000	0.020
Zm00001d021410	Phytoene synthase chloroplastic	0.791	3.957	0.000	0.039
Zm00001d019358	B12D protein	0.791	5.778	0.001	0.050
Zm00001d014971	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PXL1	0.788	3.804	0.000	0.033
Zm00001d022569	senescence associated gene 20	0.786	5.253	0.000	0.018
Zm00001d027892	root-specific kinase 1	0.783	3.465	0.000	0.028

[continua]



[continuação]

Zm00001d045888	Pollen-specific arabinogalacta protein BAN102	0.778	3.795	0.000	0.033
Zm00001d027645	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PXL1	0.777	3.949	0.001	0.045
Zm00001d018383	ribosomal protein L39	0.773	5.324	0.000	0.033
Zm00001d027489	Nucleotide-diphospho-sugar transferase family protein	0.768	2.999	0.000	0.034
Zm00001d040705	Peroxidase 64	0.765	3.978	0.000	0.036
Zm00001d032946	Chitinase 1	0.763	5.818	0.000	0.018
Zm00001d020974	Chitinase-like protein 1	0.763	5.827	0.000	0.024
Zm00001d018037	NOD26-like membrane intrinsic protein2 sodium/calcium exchanger family protein / calcium-binding EF hand family protein	0.762	8.056	0.001	0.040
Zm00001d008911		0.757	6.795	0.000	0.033
Zm00001d046378	-	0.751	6.108	0.000	0.007
Zm00001d037164	Peptidase M20/M25/M40 family protein	0.747	5.824	0.001	0.044
Zm00001d029706	glutathione transferase39	0.746	5.090	0.000	0.034
Zm00001d013934	soluble epoxide hydrolase	0.743	5.638	0.000	0.022
Zm00001d039695	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	0.727	4.932	0.000	0.004
Zm00001d006027	bZIP transcription factor family protein	0.725	4.588	0.000	0.014
Zm00001d024587	Protein NRT1/ PTR FAMILY 6.3	0.724	6.023	0.000	0.026
Zm00001d038618	Cyclic nucleotide-gated ion channel 4	0.724	5.358	0.000	0.001
Zm00001d021596	adenosine 5'-phosphosulfate reductase-like1	0.723	6.319	0.000	0.002
Zm00001d043171	WAT1-related protein	0.722	7.324	0.001	0.045
Zm00001d037384	Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase	0.721	4.484	0.000	0.028
Zm00001d013612	Tubulin beta-4 chain	0.721	5.962	0.000	0.036
Zm00001d017125	Ankyrin repeat family protein	0.716	3.869	0.001	0.040
Zm00001d003209	AAA-ATPase ASD mitochondrial	0.716	5.215	0.001	0.046
Zm00001d008925	GDSL esterase/lipase	0.712	5.070	0.001	0.045
Zm00001d039697	Cytochrome P450 monooxygenase	0.711	5.198	0.000	0.024
Zm00001d046004	HGA4	0.709	6.199	0.001	0.043
Zm00001d018744	Putative cyclotide family protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q4KWL5]	0.702	5.069	0.000	0.019

[continua]

[continuação]

Zm00001d025977	Metal-nicotianamine transporter YSL2	0.699	5.825	0.000	0.013
Zm00001d020623	Copper transporter 5	0.698	6.408	0.001	0.041
Zm00001d020069	Carotenoid cleavage dioxygenase	0.697	5.586	0.001	0.044
Zm00001d052673	Chalcone synthase C2	0.695	5.428	0.000	0.028
Zm00001d010451	GDSL esterase/lipase	0.695	5.054	0.001	0.041
Zm00001d015618	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase	0.691	6.837	0.000	0.036
Zm00001d037410	Peroxidase 1	0.691	3.384	0.001	0.048
Zm00001d028814	Pathogenesis-related protein 10 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q29SB6]	0.690	5.915	0.001	0.041
Zm00001d028228	multidrug and toxic compound extrusion3	0.689	5.340	0.000	0.014
Zm00001d013529	Protein NRT1/ PTR FAMILY 2.9	0.688	4.842	0.000	0.035
Zm00001d047758	MAP kinase1	0.685	6.068	0.001	0.042
Zm00001d017429	Iron-phytosiderophore transporter yellow stripe 1	0.683	6.975	0.000	0.001
Zm00001d013109	calcium-dependent protein kinase 10	0.677	4.169	0.001	0.046
Zm00001d032883	Expansin-A11	0.676	3.881	0.000	0.024
Zm00001d037680	Vegetative storage protein 2	0.674	4.516	0.001	0.048
Zm00001d026695	Protein NRT1/ PTR FAMILY 5.10	0.671	4.308	0.001	0.045
Zm00001d018748	Ustilago maydis induced11	0.670	4.933	0.000	0.006
Zm00001d032873	Metal ion binding protein	0.669	5.763	0.000	0.035
Zm00001d033279	Leucine-rich repeat extensin-like protein 6	0.667	6.303	0.000	0.015
Zm00001d022228	Ribonuclease 1	0.656	6.679	0.000	0.019
Zm00001d041082	kaurene synthase4	0.655	6.880	0.000	0.032
Zm00001d032618	Secretory protein	0.654	5.342	0.000	0.014
Zm00001d052261	Aquaporin NIP1-2	0.654	5.773	0.000	0.034
Zm00001d002035	Endonuclease 2	0.653	6.826	0.000	0.019
Zm00001d036756	-	0.652	4.770	0.000	0.015
Zm00001d043988	chitinase chem5	0.646	8.158	0.001	0.044
Zm00001d036541	maize insect resistance2	0.645	6.649	0.000	0.026
Zm00001d014062	Leucine Rich Repeat family protein expressed; protein	0.639	4.008	0.000	0.033

[continua]

[continuação]

Zm00001d017958	Glutamine synthetase root isozyme 3	0.637	7.780	0.000	0.011
Zm00001d013914	Membrane steroid-binding protein 1	0.632	5.365	0.001	0.048
Zm00001d030532	Homeobox-leucine zipper protein ATHB-6	0.625	4.263	0.000	0.025
Zm00001d032036	Probable carboxylesterase 8	0.621	4.665	0.000	0.012
Zm00001d019560	beta expansin4	0.616	4.357	0.000	0.037
Zm00001d028948	Calmodulin-7	0.613	7.652	0.001	0.044
Zm00001d021757	UDP-glycosyltransferase 88A1	0.610	4.270	0.001	0.044
Zm00001d019327	Metal transporter Nramp6	0.604	5.293	0.000	0.021
Zm00001d040697	S-adenosylmethionine synthase 1	0.601	8.089	0.000	0.034
Zm00001d049028	Chitinase 2	0.580	6.642	0.000	0.024
Zm00001d042027	-	0.562	5.071	0.001	0.042
Zm00001d029141	E3 ubiquitin-protein ligase MIEL1	0.561	6.002	0.001	0.043
Zm00001d050310	Homeodomain leucine zipper protein CPHB-5%3B Putative homeobox DNA-binding and leucine zipper domain family protein	0.560	5.543	0.000	0.037
Zm00001d033531	F1N21.17	0.525	5.488	0.000	0.034
Zm00001d044495	senescence enhanced2b	0.523	8.402	0.001	0.041
Zm00001d027995	Alcohol dehydrogenase-like 2	0.463	5.710	0.001	0.049
Zm00001d038382	-	-0.486	6.795	0.001	0.045
Zm00001d002447	Wall-associated receptor kinase 2	-0.494	4.701	0.001	0.048
Zm00001d054093	Senescence-associated protein DIN1	-0.510	6.777	0.000	0.034
Zm00001d043653	Type I inositol polyphosphate 5-phosphatase 1	-0.515	5.717	0.000	0.033
Zm00001d004729	Aluminum-induced protein	-0.529	7.066	0.001	0.045
Zm00001d012257	-	-0.531	5.196	0.001	0.044
Zm00001d046937	Basic leucine zipper 9	-0.550	7.046	0.000	0.027
Zm00001d032517	Copper transport protein family	-0.559	6.528	0.000	0.034
Zm00001d047204	Protein LNK1	-0.577	8.156	0.000	0.022
Zm00001d004728	glycine rich protein4	-0.581	6.188	0.000	0.033
Zm00001d033551	Phosphoglycerate mutase-like family protein	-0.587	4.940	0.000	0.027

[continua]

[continuação]

Zm00001d048693	ATA15 protein	-0.682	5.703	0.000	0.014
Zm00001d038460	Putative aminotransferase class III superfamily protein Whole genome shotgun sequence of line PN40024	-0.720	6.405	0.000	0.024
Zm00001d047779	scaffold_36.assembly12x (Fragment)	-0.721	3.341	0.000	0.030
Zm00001d025707	BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 2	-0.777	4.902	0.000	0.012
Zm00001d024546	circadian clock associated2	-0.786	7.996	0.000	0.002
Zm00001d042880	regulator of chromosome condensation1	-0.854	4.501	0.000	0.013
Zm00001d024547	Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	-0.872	4.964	0.000	0.005
Zm00001d052532	Major facilitator superfamily protein	-0.910	6.325	0.000	0.026
Zm00001d049543	circadian clock associated1	-0.924	9.303	0.000	0.000
Zm00001d038527	Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	-0.949	3.296	0.000	0.006
Zm00001d039631	glossy13	-0.955	2.997	0.000	0.032
Zm00001d010634	Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	-1.081	3.371	0.000	0.001
Zm00001d046453	-	-1.167	2.410	0.000	0.025
Zm00001d017134	ZCN16	-1.348	2.094	0.000	0.030
Zm00001d007637	-	-1.355	3.173	0.000	0.033
Zm00001d009599	Putative homeodomain-like transcription factor superfamily protein%3B SANT/MYB protein	-1.411	0.304	0.001	0.046
Zm00001d029596	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	-1.416	-0.014	0.000	0.034
Zm00001d021135	phosphatidylethanolamine-binding protein24	-2.089	0.317	0.000	0.000

[conclusão]

**Tabela S3** - Genes diferencialmente expressos (DEGs) na parte aérea de plântula de milho tratadas com bioestimulante de SH.

Gene	Function	logFC	logCPM	PValue	FDR
Zm00001d036366	Basic endochitinase B	2.202	-0.261	0.000	0.000
Zm00001d011183	thiamine biosynthesis1	2.085	5.486	0.000	0.000
Zm00001d021634	Hsp20/alpha crystallin family protein	1.890	0.923	0.000	0.000
Zm00001d044228	thiamine biosynthesis2	1.840	2.338	0.000	0.000
Zm00001d048178	Polyol transporter protein 4	1.648	0.166	0.000	0.000
Zm00001d024522	Putative HLH DNA-binding domain superfamily protein	1.570	2.218	0.000	0.013
Zm00001d032850	phosphate transporter protein2	1.500	0.066	0.000	0.002
Zm00001d053845	-	1.496	4.895	0.000	0.000
Zm00001d012292	Glucan endo-13-beta-glucosidase 14	1.489	0.800	0.000	0.000
Zm00001d013781	Chloroplast post-illumination chlorophyll fluorescence increase protein	1.424	3.917	0.000	0.000
Zm00001d037779	tonoplast intrinsic protein4	1.419	3.611	0.000	0.000
Zm00001d050082	Pectinesterase	1.398	0.368	0.000	0.016
Zm00001d022597	NEP1-interacting protein-like 1	1.397	1.101	0.000	0.021
Zm00001d021216	Protein DETOXIFICATION 50	1.392	0.066	0.000	0.002
Zm00001d053042	-	1.386	0.834	0.000	0.000
Zm00001d024798	-	1.370	0.658	0.000	0.007
Zm00001d048711	Hydroquinone glucosyltransferase	1.359	0.272	0.000	0.007
Zm00001d042113	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	1.337	1.655	0.002	0.049
Zm00001d045221	Thiol protease SEN102	1.289	1.174	0.000	0.000
Zm00001d051802	Nudix hydrolase 17 mitochondrial	1.283	1.785	0.001	0.037
Zm00001d007445	Adagio protein 3	1.276	2.655	0.000	0.000
Zm00001d035412	-	1.258	0.480	0.001	0.024
Zm00001d010204	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	1.258	3.570	0.000	0.000
Zm00001d043318	Protein LURP-one-related 5	1.246	0.056	0.001	0.034
Zm00001d020358	Ubiquitin-protein ligase	1.243	0.174	0.000	0.007
Zm00001d043121	Osmotin-like protein OSM34	1.242	1.731	0.000	0.000
Zm00001d038274	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	1.238	2.865	0.000	0.000

[continua]

[continuação]

Zm00001d044230	DUF538 family protein	1.238	0.402	0.000	0.007
Zm00001d045458	Protein EXORDIUM-like 3	1.235	0.500	0.000	0.001
Zm00001d041784	CCR-like	1.234	0.653	0.000	0.002
Zm00001d033455	Protein P21	1.233	2.059	0.000	0.000
Zm00001d017225	-	1.224	0.024	0.000	0.007
Zm00001d004698	Serine/threonine-protein kinase-like protein CCR4	1.212	0.417	0.000	0.012
Zm00001d046975	-	1.212	0.500	0.000	0.015
Zm00001d036348	Putative RING zinc finger domain superfamily protein	1.205	0.649	0.000	0.008
Zm00001d038203	-	1.189	1.184	0.000	0.012
Zm00001d040028	-	1.182	4.402	0.000	0.000
Zm00001d054067	Probable inactive linolenate hydroperoxide lyase	1.181	4.893	0.000	0.000
Zm00001d045589	Scarecrow-like protein 6	1.174	0.678	0.001	0.038
Zm00001d020496	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 5	1.172	2.107	0.000	0.015
Zm00001d011649	UDP-glycosyltransferase 88A1	1.171	3.758	0.000	0.005
Zm00001d037383	UDP-glycosyltransferase 72B1	1.165	0.124	0.000	0.015
Zm00001d031934	Chlorophyllase-1	1.161	1.397	0.000	0.003
Zm00001d053554	Peroxidase 52	1.158	1.183	0.000	0.000
Zm00001d053091	Adagio protein 3	1.153	1.382	0.000	0.012
Zm00001d011079	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor-2A	1.153	3.090	0.000	0.000
Zm00001d018619	Peroxidase 1	1.150	0.786	0.000	0.003
Zm00001d015720	-	1.146	1.029	0.000	0.001
Zm00001d052118	Zinc finger protein	1.140	1.988	0.000	0.000
Zm00001d048342	Probable serine/threonine-protein kinase Cx32 chloroplastic	1.134	1.335	0.000	0.009
Zm00001d032155	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 15	1.129	3.508	0.000	0.021
Zm00001d047709	Mitochondrial substrate carrier family protein	1.124	0.839	0.000	0.009
Zm00001d017907	Protein TIC 20-v chloroplastic	1.122	3.604	0.000	0.000
Zm00001d018738	pathogenesis related protein4	1.114	0.088	0.000	0.021
Zm00001d041763	Cytokinin-O-glucosyltransferase 2	1.109	1.877	0.000	0.000
Zm00001d026259	-	1.104	0.153	0.001	0.037

[continua]

[continuação]

Zm00001d015799	Putative uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B6SPK8]	1.100	2.896	0.001	0.036
Zm00001d022277	tolB protein-related	1.095	0.078	0.001	0.037
Zm00001d031158	pathogenesis related protein5	1.094	4.191	0.000	0.000
Zm00001d027499	Acyl-activating enzyme 11	1.090	1.346	0.000	0.010
Zm00001d014149	HSP20-like chaperones superfamily protein	1.087	-0.059	0.002	0.047
Zm00001d050224	4-coumarate--CoA ligase 1	1.086	1.150	0.000	0.008
Zm00001d010201	Transcription repressor MYB6	1.085	0.333	0.000	0.020
Zm00001d028776	Thioredoxin superfamily protein	1.079	1.760	0.000	0.001
Zm00001d029923	extensin-like protein	1.079	0.171	0.002	0.046
Zm00001d017241	Two-component response regulator-like APRR1	1.075	2.090	0.000	0.002
Zm00001d007935	Disease resistance response protein 206	1.073	1.547	0.000	0.002
Zm00001d022241	DUF1997 family protein	1.066	2.017	0.000	0.016
Zm00001d032495	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	1.061	5.436	0.000	0.018
Zm00001d032409	Sugar transport protein 1	1.058	0.411	0.000	0.019
Zm00001d018652	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein	1.054	3.698	0.000	0.000
Zm00001d014820	GDSL esterase/lipase	1.053	0.989	0.000	0.002
Zm00001d013551	glycine-rich protein	1.052	1.971	0.001	0.024
Zm00001d022099	Nuclear transcription factor Y subunit B-3	1.051	2.476	0.000	0.002
Zm00001d014790	Chaperone protein dnaJ 11	1.050	2.230	0.000	0.004
Zm00001d013844	Methionine gamma-lyase	1.050	0.588	0.000	0.012
Zm00001d028711	MAP kinase3	1.044	1.143	0.000	0.004
Zm00001d035646	Putative DUF26 domain family protein	1.034	0.962	0.001	0.037
Zm00001d033098	post-illumination chlorophyll fluorescence increase	1.033	5.426	0.000	0.000
Zm00001d041246	Glycine-rich RNA-binding protein 7	1.026	6.298	0.000	0.000
Zm00001d020780	glutathione transferase23	1.022	1.965	0.000	0.002
Zm00001d017766	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase8	1.021	4.094	0.000	0.000
Zm00001d019228	ZIP zinc/iron transport family protein	1.015	1.021	0.000	0.010
Zm00001d035684	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B%3B Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B isoform 1%3B Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B isoform 2	1.009	2.766	0.000	0.020

[continua]

[continuação]

Zm00001d034564	Probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 2	1.008	3.077	0.000	0.001
Zm00001d040674	-	1.007	1.301	0.000	0.021
Zm00001d021358	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase	1.006	1.890	0.000	0.006
Zm00001d039301	Vegetative storage protein PNI288	1.005	1.484	0.000	0.001
Zm00001d021746	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein	1.003	1.301	0.001	0.031
Zm00001d020195	-	1.002	1.095	0.000	0.018
Zm00001d039833	Spermidine hydroxycinnamoyl transferase	1.001	1.596	0.000	0.003
Zm00001d031601	Receptor-like kinase-like	1.000	0.949	0.000	0.005
Zm00001d042096	Glutathione S-transferase U16	0.999	0.324	0.000	0.021
Zm00001d010854	-	0.998	0.353	0.001	0.038
Zm00001d038403	-	0.997	1.648	0.000	0.001
Zm00001d050635	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0.997	3.587	0.000	0.000
Zm00001d031449	Lipoxygenase 2 chloroplastic	0.995	1.264	0.000	0.011
Zm00001d034634	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	0.995	3.652	0.000	0.001
Zm00001d044671	Protein LURP-one-related 8	0.995	0.421	0.001	0.024
Zm00001d042812	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0.990	4.505	0.000	0.000
Zm00001d004437	THAUMATIN-LIKE PROTEIN 1	0.989	0.268	0.001	0.041
Zm00001d014804	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0.989	1.086	0.000	0.003
Zm00001d050320	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0.980	1.053	0.001	0.043
Zm00001d011422	Putative cytochrome P450 superfamily protein	0.974	1.385	0.000	0.017
Zm00001d004389	Probable flavin-containing monooxygenase 1	0.974	0.760	0.000	0.009
Zm00001d034677	ribosomal protein L30 family protein	0.970	0.781	0.001	0.041
Zm00001d030969	Probable WRKY transcription factor 74	0.969	0.865	0.000	0.007
Zm00001d050436	DUF868 family protein	0.969	0.890	0.001	0.034
Zm00001d012325	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0.966	2.161	0.000	0.001
Zm00001d028465	-	0.965	1.261	0.000	0.003
Zm00001d050323	Putative cytochrome P450 superfamily protein	0.964	1.293	0.002	0.047
Zm00001d018620	Peroxidase 1	0.962	1.098	0.001	0.034
Zm00001d003311	Probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase AOP1	0.961	2.060	0.001	0.024

[continua]



[continuação]

Zm00001d038280	U-box domain-containing protein 29	0.958	1.631	0.001	0.028
Zm00001d033479	Signal peptidase complex subunit 1	0.957	1.384	0.002	0.046
Zm00001d028820	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	0.957	3.381	0.000	0.000
Zm00001d011056	Phospholipase A1-IIgamma	0.955	1.793	0.000	0.013
Zm00001d011679	High affinity nitrate transporter 2.5	0.954	1.201	0.002	0.048
Zm00001d019269	Pentatricopeptide repeat-containing protein	0.952	0.868	0.000	0.017
Zm00001d036014	E3 ubiquitin-protein ligase XBAT33	0.951	3.515	0.000	0.000
Zm00001d051867	Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 32	0.950	1.949	0.001	0.032
Zm00001d008397	Nodulin-related protein 1	0.948	3.917	0.000	0.000
Zm00001d012415	Putative aspartic protease family protein	0.945	1.086	0.001	0.026
Zm00001d031421	Thylakoid lumenal 19 kDa protein	0.943	4.089	0.002	0.043
Zm00001d044861	-	0.933	1.112	0.000	0.018
Zm00001d003865	Expressed protein; protein	0.932	0.808	0.000	0.018
Zm00001d016182	Peroxidase 52	0.932	1.970	0.000	0.007
Zm00001d038191	Homeodomain-like superfamily protein	0.932	1.141	0.001	0.032
Zm00001d046188	AT5g56980/MHM17_10	0.930	2.719	0.000	0.014
Zm00001d043650	Tryptophan aminotransferase-related protein 4	0.930	2.889	0.000	0.000
Zm00001d048451	Pentatricopeptide repeat-containing protein	0.926	1.966	0.000	0.007
Zm00001d034017	Exhydrolase II	0.924	6.384	0.000	0.000
Zm00001d032084	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	0.922	4.553	0.000	0.015
Zm00001d004664	Cytochrome P450 94B3	0.920	1.699	0.000	0.010
Zm00001d029892	Metalloendoproteinase 1-MMP	0.916	2.330	0.000	0.000
Zm00001d031562	Ras-related protein RABA6a	0.914	2.879	0.001	0.030
Zm00001d002066	Protein IRX15-LIKE	0.913	1.116	0.001	0.036
Zm00001d004387	Probable flavin-containing monooxygenase 1	0.911	1.847	0.000	0.004
Zm00001d033469	Ferredoxin%3B Putative ferredoxin	0.911	2.597	0.001	0.038
Zm00001d005312	Phenolic glucoside malonyltransferase 1	0.911	2.794	0.001	0.024
Zm00001d001961	SAUR-like auxin-responsive protein family	0.911	0.462	0.001	0.039
Zm00001d032576	Protochlorophyllide reductase C chloroplastic	0.910	4.825	0.000	0.018

[continua]

[continuação]

Zm00001d052171	Cell number regulator 1	0.909	1.627	0.000	0.016
Zm00001d039607	UDP-glycosyltransferase 75B1	0.907	1.899	0.001	0.031
Zm00001d033623	Lipoxygenase	0.905	2.657	0.000	0.001
Zm00001d028616	Putative E3 ubiquitin-protein ligase XBAT31	0.894	2.396	0.000	0.021
Zm00001d024403	OSJNBa0041A02.21 protein; protein	0.893	0.761	0.000	0.021
Zm00001d049407	Polyphenol oxidase chloroplastic	0.890	2.628	0.000	0.001
Zm00001d028416	ACR8	0.888	1.252	0.000	0.009
Zm00001d037242	Urea-proton symporter DUR3	0.888	1.046	0.000	0.014
Zm00001d051745	Probable ubiquitin conjugation factor E4	0.886	5.395	0.000	0.004
Zm00001d038860	AT5g56980/MHM17_10	0.885	2.738	0.001	0.037
Zm00001d018225	Homeodomain leucine zipper family IV protein	0.884	1.995	0.000	0.006
Zm00001d012322	cytochrome P450 family 81 subfamily D polypeptide 8	0.883	2.285	0.000	0.001
Zm00001d024014	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	0.882	2.362	0.000	0.000
Zm00001d016952	DNA binding protein	0.879	1.968	0.000	0.007
Zm00001d020867	Subtilisin-like protease SBT5.3	0.879	2.263	0.000	0.001
Zm00001d015817	40S ribosomal protein S4-3	0.878	3.080	0.000	0.007
Zm00001d008377	Putative alcohol dehydrogenase superfamily protein	0.878	3.917	0.000	0.010
Zm00001d036539	Blight-associated protein p12	0.877	1.906	0.001	0.024
Zm00001d004440	Root phototropism protein 3	0.877	1.139	0.001	0.029
Zm00001d014193	-	0.876	0.857	0.002	0.050
Zm00001d028391	Subtilisin-like protease SBT1.6	0.871	2.064	0.000	0.012
Zm00001d018220	glutathione transferase24	0.869	2.523	0.000	0.002
Zm00001d040202	SNF7 family protein	0.868	7.456	0.000	0.001
Zm00001d002000	lipoxygenase6	0.865	6.538	0.000	0.000
Zm00001d035657	Putative E3 ubiquitin-protein ligase XBAT31	0.865	4.728	0.000	0.000
Zm00001d028957	F-box protein	0.865	0.965	0.001	0.037
Zm00001d005693	-	0.864	3.135	0.000	0.005
Zm00001d040066	Glycosyltransferase family 61 protein	0.860	1.232	0.001	0.023
Zm00001d048356	24-methylenesterol C-methyltransferase 2	0.860	3.669	0.000	0.000

[continua]

[continuação]

Zm00001d037828	GDSL esterase/lipase	0.859	2.678	0.002	0.044
Zm00001d046682	Peroxiredoxin-5	0.858	5.813	0.000	0.021
Zm00001d032849	RING/U-box superfamily protein	0.858	1.961	0.000	0.002
Zm00001d024204	LHT1	0.856	1.749	0.000	0.007
Zm00001d047687	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	0.856	2.589	0.000	0.012
Zm00001d045203	Auxin-responsive protein IAA29	0.855	1.215	0.000	0.020
Zm00001d051556	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase6	0.854	7.240	0.000	0.000
Zm00001d047685	Probable galacturonosyltransferase-like 7	0.853	0.861	0.001	0.026
Zm00001d029997	chloroplast chaperonin 10	0.851	4.767	0.000	0.000
Zm00001d027946	hydroxycinnamoyltransferase1	0.850	0.589	0.001	0.039
Zm00001d033316	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 4	0.849	4.369	0.000	0.000
Zm00001d003190	Endochitinase A	0.848	3.929	0.000	0.002
Zm00001d039444	UNE1	0.847	1.124	0.002	0.046
Zm00001d030762	-	0.844	4.402	0.001	0.038
Zm00001d033152	Cytochrome P450 CYP71W7	0.842	2.368	0.000	0.001
Zm00001d008340	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0.840	0.880	0.001	0.037
Zm00001d002004	Peroxidase 16	0.839	2.994	0.001	0.028
Zm00001d016708	Beta-fructofuranosidase%2C cell wall isozyme	0.837	4.472	0.000	0.001
Zm00001d012477	Laccase-13	0.836	1.794	0.001	0.043
Zm00001d022326	Probable carboxylesterase 18	0.835	1.827	0.000	0.003
Zm00001d040027	Bowman-Birk type wound-induced proteinase inhibitor WIP1 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B4FYK1]	0.827	4.344	0.000	0.000
Zm00001d023856	RALF	0.826	2.976	0.000	0.016
Zm00001d011650	VIP1 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B4FRS6]	0.823	3.576	0.000	0.021
Zm00001d029801	glutathione transferase14	0.823	2.886	0.000	0.005
Zm00001d008987	Putative cytochrome P450 superfamily protein	0.819	1.603	0.001	0.033
Zm00001d042216	Glutathione S-transferase 3	0.819	6.027	0.000	0.007
Zm00001d018065	mTERF family protein	0.816	2.652	0.002	0.044
Zm00001d034301	-	0.814	2.077	0.001	0.037

[continua]

[continuação]

Zm00001d016674	Heat shock factor protein 2	0.814	1.748	0.001	0.037
Zm00001d029497	Zinc transporter 2	0.813	4.784	0.000	0.000
Zm00001d013598	Lipid binding protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B4G0Q2]	0.813	2.359	0.001	0.023
Zm00001d042134	Amino-acid permease BAT1	0.812	1.087	0.001	0.033
Zm00001d039790	Histone H3.2	0.810	3.885	0.001	0.038
Zm00001d020958	Dihydroflavonol-4-reductase	0.810	3.362	0.000	0.001
Zm00001d023707	Thioredoxin M-type%2C chloroplastic	0.809	7.160	0.000	0.006
Zm00001d007132	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1	0.806	1.302	0.001	0.023
Zm00001d013230	bentazon resistance1	0.805	1.878	0.000	0.013
Zm00001d031403	Serine--glyoxylate aminotransferase	0.804	3.062	0.000	0.011
Zm00001d051463	lipase class 3 family protein	0.803	1.705	0.000	0.009
Zm00001d012849	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0.802	1.691	0.000	0.010
Zm00001d039908	Ribosomal protein L26	0.801	4.345	0.000	0.011
Zm00001d018631	Dirigent protein 11	0.801	5.225	0.002	0.048
Zm00001d031639	ACR4	0.799	1.332	0.001	0.034
Zm00001d043380	Protein CHLORORESPIRATORY REDUCTION 7 chloroplastic	0.798	4.139	0.001	0.030
Zm00001d035003	ferredoxin2	0.797	7.537	0.000	0.005
Zm00001d045340	Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme family protein	0.795	3.323	0.000	0.000
Zm00001d027511	Catalase isozyme 2	0.794	6.535	0.000	0.000
Zm00001d039542	Phospholipase A1-Igama1 chloroplastic	0.794	7.586	0.000	0.000
Zm00001d048634	DIBOA-glucoside dioxygenase BX6	0.791	6.340	0.000	0.000
Zm00001d028548	maternal effect embryo arrest 59	0.788	3.992	0.000	0.000
Zm00001d022057	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	0.787	2.548	0.001	0.039
Zm00001d018623	Photosynthetic NDH subunit of lumenal location 3 chloroplastic	0.784	5.517	0.000	0.013
Zm00001d021813	-	0.783	4.393	0.000	0.010
Zm00001d012088	-	0.783	8.132	0.000	0.004
Zm00001d015377	Pentatricopeptide repeat-containing protein	0.777	5.075	0.000	0.000
Zm00001d054044	Catalase isozyme 3	0.777	8.627	0.000	0.000

[continua]

[continuação]

Zm00001d020670	Homeobox-leucine zipper protein HAT3	0.775	1.903	0.001	0.029
	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B%3B Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B isoform 1%3B Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B isoform 2%3B				
Zm00001d035683	Subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1B isoform 3	0.771	3.089	0.000	0.013
Zm00001d020589	DUF581 family protein	0.771	2.818	0.001	0.024
Zm00001d036370	Chitinase2	0.769	2.626	0.001	0.028
Zm00001d042473	Peptide transporter PTR2	0.768	2.737	0.000	0.001
Zm00001d042090	UMP synthase	0.767	1.749	0.001	0.032
Zm00001d020402	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 6	0.766	7.574	0.000	0.000
Zm00001d016016	Dynein light chain LC6%2C flagellar outer arm	0.766	1.317	0.001	0.039
Zm00001d052224	Wound/stress protein	0.765	5.952	0.002	0.046
Zm00001d004875	Two-component response regulator-like APRR9	0.765	4.275	0.000	0.001
Zm00001d051554	abscisic acid 8'-hydroxylase2	0.762	2.747	0.000	0.002
Zm00001d008210	Germin-like protein subfamily 2 member 1	0.762	3.469	0.002	0.046
Zm00001d034884	Putative gamma-glutamylcyclotransferase	0.759	2.667	0.000	0.016
Zm00001d009446	VIP1 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B4FAQ5]	0.758	2.628	0.000	0.015
Zm00001d013937	Protochlorophyllide reductase C chloroplastic	0.758	6.907	0.000	0.003
Zm00001d045843	Aspartyl protease AED1	0.757	1.742	0.001	0.028
Zm00001d013746	-	0.754	2.296	0.000	0.016
Zm00001d037118	Anthocyanin biosynthesis regulatory protein PI1_B73%3B Purple plant1	0.750	1.805	0.001	0.031
	Whole genome shotgun sequence of line PN40024				
Zm00001d025711	scaffold_66.assembly12x (Fragment)	0.747	4.324	0.000	0.000
Zm00001d020808	Peroxidase 17	0.747	3.552	0.000	0.000
Zm00001d052409	DUF309 domain protein	0.745	4.174	0.000	0.014
Zm00001d043167	PsbP domain-containing protein 6 chloroplastic	0.743	4.746	0.000	0.000
Zm00001d037318	Putative AMP-dependent synthetase and ligase superfamily protein	0.743	1.774	0.002	0.047
Zm00001d051206	Serine carboxypeptidase-like 34	0.742	4.698	0.000	0.001
Zm00001d041365	Bifunctional nuclease 1	0.741	1.701	0.000	0.010
Zm00001d022437	Probable WRKY transcription factor 30	0.737	1.454	0.002	0.046

[continua]

[continuação]

Zm00001d018734	Pathogenesis-related protein 1	0.736	2.054	0.000	0.014
Zm00001d049545	RING/U-box superfamily protein	0.736	2.674	0.002	0.047
Zm00001d005750	Transcription factor bHLH69	0.735	2.087	0.002	0.046
Zm00001d023216	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0.734	2.980	0.000	0.003
Zm00001d018214	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0.734	4.751	0.000	0.015
Zm00001d006511	Glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2 chloroplastic	0.734	5.711	0.000	0.000
Zm00001d027593	proteasome component3	0.733	4.641	0.000	0.000
Zm00001d002758	DeSI-like protein	0.733	3.023	0.000	0.000
Zm00001d044504	High affinity nitrate transporter 2.7	0.732	2.775	0.000	0.002
Zm00001d026414	2-Sep	0.731	2.743	0.000	0.017
Zm00001d021403	indeterminate1 domain7	0.731	3.949	0.000	0.002
Zm00001d031273	RING/U-box superfamily protein	0.730	1.754	0.001	0.024
Zm00001d045145	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	0.730	3.956	0.000	0.000
Zm00001d045519	Oligopeptide transporter 7	0.727	4.689	0.000	0.000
Zm00001d039432	Protodermal factor 1	0.726	3.758	0.001	0.023
Zm00001d041951	Ring zinc finger protein	0.726	2.728	0.000	0.011
Zm00001d033044	GDSL esterase/lipase	0.726	4.353	0.000	0.000
Zm00001d018530	Transcription factor TCP21	0.726	1.938	0.001	0.043
Zm00001d042341	-	0.725	4.077	0.000	0.000
Zm00001d039880	Lecithin-cholesterol acyltransferase-like 1	0.720	1.085	0.001	0.041
Zm00001d023529	abscisic acid stress ripening1	0.720	6.422	0.000	0.000
Zm00001d036771	Protein kinase superfamily protein	0.720	2.551	0.000	0.006
Zm00001d028331	Glucan endo-13-beta-glucosidase 7	0.720	4.248	0.000	0.013
Zm00001d018247	Zinc finger protein	0.720	2.554	0.000	0.017
Zm00001d031556	AIR12	0.719	2.454	0.001	0.034
Zm00001d029438	RING-H2 finger protein ATL3	0.718	1.894	0.000	0.015
Zm00001d027405	heavy metal associated1	0.718	2.375	0.000	0.016
Zm00001d019177	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa a chloroplastic	0.715	4.089	0.000	0.009
Zm00001d006612	-	0.715	3.485	0.002	0.044

[continua]

[continuação]

Zm00001d010039	Cellulase containing protein	0.710	5.096	0.000	0.000
Zm00001d024030	-	0.710	1.766	0.001	0.036
Zm00001d045661	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 16	0.709	2.795	0.000	0.013
Zm00001d038250	HSP40/DnaJ peptide-binding protein	0.709	3.730	0.000	0.001
Zm00001d016170	Peroxisome biogenesis protein 7	0.707	1.672	0.002	0.046
Zm00001d025900	Putative GEM-like protein 8	0.706	2.031	0.001	0.037
Zm00001d045475	Histone H3	0.706	6.728	0.001	0.040
Zm00001d010798	oxidative stress 3	0.703	2.612	0.000	0.019
Zm00001d017333	Serine carboxypeptidase-like 34	0.702	5.384	0.000	0.002
Zm00001d029502	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0.700	2.944	0.000	0.001
Zm00001d030995	Basic leucine zipper 25	0.700	4.988	0.000	0.000
Zm00001d044839	Transcription factor PRE3	0.700	1.991	0.001	0.032
Zm00001d020732	Probable carboxylesterase 2	0.699	3.769	0.001	0.040
Zm00001d003035	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0.699	2.198	0.002	0.047
Zm00001d047017	Putative HLH DNA-binding domain superfamily protein	0.698	2.316	0.000	0.020
Zm00001d027599	cytochrome P450 family 96 subfamily A polypeptide 1	0.698	2.768	0.000	0.021
Zm00001d012312	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase	0.697	3.950	0.000	0.000
Zm00001d043174	Cytochrome P450 98A3	0.696	3.860	0.000	0.019
Zm00001d010373	Stem glycoprotein	0.696	3.181	0.000	0.015
Zm00001d047340	Allene oxide cyclase 3 chloroplastic	0.695	3.162	0.000	0.001
Zm00001d007311	BHLH transcription factor	0.692	1.695	0.002	0.044
Zm00001d018206	Nitrate reductase [NADH] 2	0.687	3.522	0.002	0.050
Zm00001d005457	-	0.687	4.669	0.000	0.002
Zm00001d021965	Peroxidase 52	0.685	3.327	0.000	0.004
Zm00001d016134	iron-sulfur protein1	0.683	8.979	0.000	0.000
Zm00001d035815	-	0.678	3.345	0.000	0.010
Zm00001d038718	hemoglobin2	0.676	5.068	0.000	0.000
Zm00001d022420	Stress responsive protein	0.675	5.082	0.000	0.003
Zm00001d050697	Histone H3.2	0.675	4.721	0.001	0.042

[continua]

[continuação]

Zm00001d018358	Protein TIC 55 chloroplastic	0.674	3.841	0.000	0.021
Zm00001d029932	Protein NRT1/ PTR FAMILY 6.3	0.673	5.077	0.000	0.001
Zm00001d013568	Glycine-rich RNA-binding%2C abscisic acid-inducible protein	0.671	8.497	0.000	0.000
Zm00001d011985	Transcription factor TCP11	0.671	3.012	0.000	0.004
Zm00001d013955	Plant basic secretory protein (BSP) family protein	0.670	1.729	0.001	0.028
Zm00001d003472	-	0.669	1.880	0.001	0.030
Zm00001d040666	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0.668	3.318	0.001	0.029
Zm00001d051799	Nudix hydrolase 17 mitochondrial	0.668	2.890	0.001	0.043
Zm00001d052357	Probable WRKY transcription factor 30	0.666	1.764	0.001	0.038
Zm00001d029736	Bell-like homeodomain protein 3	0.666	3.960	0.000	0.001
Zm00001d031727	Sorbitol dehydrogenase	0.665	4.287	0.000	0.002
Zm00001d014733	zinc finger (C2H2 type) family protein	0.665	3.766	0.001	0.031
Zm00001d041800	BTB/POZ domain-containing protein	0.665	2.763	0.001	0.036
Zm00001d043232	Early nodulin-like protein 3	0.664	2.432	0.001	0.031
Zm00001d010308	Gibberellin receptor GID1A	0.660	1.799	0.001	0.043
Zm00001d039786	-	0.658	4.676	0.000	0.000
Zm00001d020658	-	0.657	2.422	0.000	0.017
Zm00001d053138	Lipase-like PAD4	0.656	4.269	0.000	0.000
Zm00001d049995	Nitrate reductase	0.655	6.989	0.000	0.002
Zm00001d018037	NOD26-like membrane intrinsic protein2	0.655	5.540	0.000	0.000
Zm00001d016590	sugars will eventually be exported transporter15b	0.653	2.078	0.001	0.027
Zm00001d039188	Putative leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein	0.651	2.437	0.001	0.024
Zm00001d046925	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 5	0.649	7.269	0.001	0.041
Zm00001d029720	ABC-type Co2+ transport system%2C permease component	0.648	4.427	0.000	0.007
Zm00001d016826	proline-rich family protein	0.646	5.988	0.000	0.000
Zm00001d038925	-	0.645	2.305	0.000	0.020
Zm00001d028282	Cytochrome P450 CYP74A19	0.644	4.138	0.000	0.002
Zm00001d044104	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0.643	3.363	0.000	0.002

[continua]



[continuação]

Zm00001d004843	abscisic acid stress ripening2	0.643	9.527	0.000	0.000
	Putative RING zinc finger domain superfamily protein isoform 1%3B				
Zm00001d045625	Putative RING zinc finger domain superfamily protein isoform 2	0.639	2.560	0.001	0.024
Zm00001d011513	Polynucleotidyl transferase ribonuclease H-like superfamily protein	0.638	5.750	0.000	0.003
	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein				
Zm00001d034415		0.638	2.359	0.000	0.015
Zm00001d035662	Metallothionein-like protein 2C	0.633	4.145	0.001	0.030
Zm00001d011461	Putative uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B6SMQ8]	0.633	4.565	0.000	0.002
Zm00001d051803	Erwinia induced protein 2	0.632	3.454	0.001	0.036
Zm00001d011241	Hsp20/alpha crystallin 121amily protein	0.632	2.188	0.001	0.036
Zm00001d044431	Amino-acid 121amily121se BAT1	0.632	4.061	0.000	0.017
Zm00001d001820	protochlorophyllide reductase1	0.630	9.112	0.000	0.008
Zm00001d051018	B-box zinc finger protein 24	0.629	3.952	0.002	0.044
Zm00001d036035	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 121amily protein	0.625	2.264	0.001	0.033
Zm00001d012837	Histone H2A	0.625	4.187	0.001	0.030
Zm00001d022053	hydroxyproline-rich glycoprotein 121amily protein	0.624	4.933	0.000	0.018
Zm00001d014606	Peroxidase 45	0.622	3.315	0.000	0.006
Zm00001d001784	AT-hook motif nuclear-localized protein 5	0.621	3.958	0.000	0.013
Zm00001d048075	Expressed protein; protein	0.621	3.177	0.000	0.006
Zm00001d026651	Expressed protein; protein	0.620	3.483	0.000	0.021
Zm00001d042371	-	0.619	4.257	0.000	0.000
Zm00001d052397	glossy3	0.618	2.416	0.001	0.023
Zm00001d030314	Proline-rich protein	0.618	6.909	0.000	0.016
Zm00001d049632	F-box/kelch-repeat protein	0.617	4.117	0.000	0.002
Zm00001d038270	Duplicated homeodomain-like superfamily protein	0.617	3.668	0.000	0.003
Zm00001d051923	GDSL esterase/lipase LTL1	0.616	4.782	0.000	0.010
Zm00001d042140	Beta-1%2C3-gluconase	0.615	3.846	0.001	0.026
Zm00001d002353	Orf protein	0.615	6.033	0.001	0.029
Zm00001d029495	-	0.613	3.109	0.000	0.013

[continua]

[continuação]

Zm00001d038984	photosystem I H subunit1	0.612	9.525	0.001	0.032
Zm00001d007382	Transcription factor ICE1	0.612	2.794	0.001	0.032
Zm00001d048515	Stress responsive alpha-beta barrel domain protein	0.612	6.172	0.000	0.000
Zm00001d020497	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 6	0.609	4.282	0.001	0.025
Zm00001d042594	Anthocyanidin reductase	0.608	3.197	0.000	0.021
Zm00001d021450	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase LOG5	0.606	3.487	0.000	0.005
Zm00001d051110	GDSL esterase/lipase LTL1	0.606	3.639	0.001	0.033
Zm00001d042027	-	0.605	4.866	0.000	0.000
Zm00001d016342	-	0.604	4.338	0.000	0.001
Zm00001d028348	Peroxidase 53	0.604	4.002	0.000	0.004
Zm00001d011144	DCD (Development and Cell Death) domain protein	0.603	5.382	0.001	0.039
Zm00001d018200	SAUR12-auxin-responsive SAUR family member	0.603	3.479	0.000	0.021
Zm00001d032618	Secretory protein	0.603	3.200	0.001	0.037
Zm00001d039387	SOUL heme-binding family protein	0.601	5.919	0.000	0.003
Zm00001d011060	Putative E3 ubiquitin-protein ligase XBAT31	0.601	2.604	0.001	0.025
Zm00001d025953	Putative GATA transcription factor family protein	0.601	3.739	0.001	0.037
Zm00001d014734	Arogenate dehydrogenase 1 chloroplastic	0.600	3.460	0.000	0.011
Zm00001d024885	Putative WD40-like beta propeller repeat family protein	0.600	4.317	0.000	0.019
Zm00001d016947	-	0.600	2.653	0.002	0.044
Zm00001d011813	bundle sheath strands specific1	0.599	8.363	0.000	0.001
Zm00001d024886	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	0.599	4.479	0.000	0.001
Zm00001d052384	Glutathione S-transferase U10	0.597	3.089	0.001	0.040
Zm00001d022421	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	0.597	7.478	0.000	0.008
Zm00001d017840	Delta(12)-fatty-acid desaturase	0.596	6.901	0.000	0.017
Zm00001d012664	Putative RING zinc finger domain superfamily protein	0.595	2.557	0.001	0.023
Zm00001d048709	benzoxazinless1	0.595	2.885	0.001	0.043
Zm00001d028964	-	0.594	3.141	0.000	0.005
Zm00001d047436	AAA-ATPase ASD mitochondrial	0.594	4.682	0.000	0.001
Zm00001d010451	GDSL esterase/lipase	0.592	4.747	0.000	0.017

[continua]

[continuação]

Zm00001d016446	Cysteine proteinase 1	0.592	8.348	0.000	0.000
Zm00001d021839	Remorin family protein	0.591	3.522	0.002	0.047
Zm00001d008628	Gamma-glutamyltranspeptidase 3	0.591	3.397	0.000	0.019
Zm00001d018161	Ferredoxin--nitrite reductase chloroplastic	0.590	3.604	0.001	0.031
Zm00001d049242	-	0.589	3.130	0.000	0.020
Zm00001d013561	glycosyl hydrolase family 10 protein / carbohydrate-binding domain-containing protein	0.588	3.882	0.001	0.024
Zm00001d030028	myc transcription factor7	0.588	3.817	0.001	0.029
Zm00001d034969	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	0.587	3.112	0.001	0.034
Zm00001d045468	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0.586	2.809	0.001	0.038
Zm00001d007896	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein	0.585	3.876	0.002	0.046
Zm00001d042540	Linoleate 9S-lipoxygenase 1	0.584	8.325	0.001	0.030
Zm00001d036036	Histone H3	0.583	6.602	0.000	0.012
Zm00001d021141	Ferredoxin	0.580	4.427	0.000	0.014
Zm00001d048021	allene oxide synthase1	0.580	4.679	0.000	0.015
Zm00001d033292	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	0.579	4.222	0.000	0.001
Zm00001d027613	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0.579	3.159	0.002	0.047
Zm00001d039589	gigantea2	0.578	6.331	0.000	0.002
Zm00001d048366	Expressed protein; protein	0.578	3.790	0.001	0.038
Zm00001d020623	Copper transporter 5	0.577	6.261	0.000	0.001
Zm00001d013934	soluble epoxide hydrolase	0.577	4.543	0.000	0.000
Zm00001d018238	Thioredoxin-like 3-1 chloroplastic	0.577	2.551	0.000	0.017
Zm00001d034007	Protein NDH-DEPENDENT CYCLIC ELECTRON FLOW 5	0.576	5.446	0.000	0.003
Zm00001d032810	CHY-type/CTCHY-type/RING-type Zinc finger protein	0.575	5.203	0.000	0.000
Zm00001d005895	EF hand family protein	0.575	6.248	0.001	0.030
Zm00001d011787	Cysteine protease XCP1	0.574	5.081	0.001	0.039
Zm00001d033150	-	0.573	5.911	0.000	0.000
Zm00001d003833	-	0.572	3.418	0.000	0.004
Zm00001d029913	Expansin-B4	0.571	3.526	0.001	0.039

[continua]

[continuação]

Zm00001d016723	Histone H3	0.570	5.418	0.001	0.031
Zm00001d044033	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 20	0.570	4.587	0.001	0.039
Zm00001d007517	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	0.569	3.991	0.000	0.002
Zm00001d049375	Zinc transporter 3	0.569	3.040	0.000	0.013
Zm00001d043178	Probable sugar phosphate/phosphate translocator	0.569	4.574	0.001	0.039
Zm00001d037550	peroxidase 5	0.568	6.850	0.000	0.000
Zm00001d019358	B12D protein	0.567	4.883	0.000	0.007
Zm00001d020030	Probable NAD(P)H dehydrogenase subunit CRR3 chloroplastic	0.564	3.033	0.002	0.046
Zm00001d007687	Tropinone reductase homolog	0.563	4.539	0.000	0.016
Zm00001d048561	p-protein	0.562	3.084	0.001	0.029
Zm00001d035659	Metallothionein-like protein 2C	0.562	5.610	0.000	0.006
Zm00001d029353	benzoxazinone synthesis12	0.561	4.276	0.001	0.030
Zm00001d039687	Photosystem I reaction center subunit XI chloroplastic	0.560	8.504	0.000	0.010
Zm00001d043168	MAR-binding filament-like protein 1-1 isoform 2	0.559	6.722	0.000	0.000
Zm00001d014796	NEP1-interacting protein-like 1	0.557	4.525	0.000	0.009
Zm00001d008305	TRAM LAG1 and CLN8 (TLC) lipid-sensing domain containing protein	0.557	5.631	0.001	0.031
Zm00001d045685	-	0.557	4.607	0.000	0.002
Zm00001d023699	glycine cleavage system protein H1	0.556	6.147	0.001	0.023
Zm00001d027548	sterol methyl transferase2	0.556	3.838	0.001	0.031
Zm00001d027477	-	0.556	3.421	0.001	0.039
Zm00001d026652	DNA binding protein	0.555	4.779	0.001	0.040
Zm00001d031662	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 15	0.554	3.678	0.000	0.004
Zm00001d022457	peroxidase3	0.554	4.798	0.000	0.014
Zm00001d048368	60S ribosomal protein L23	0.553	6.357	0.000	0.014
Zm00001d015477	Protein ECERIFERUM 3	0.551	4.714	0.000	0.000
Zm00001d005822	cytochrome P450 12	0.551	2.632	0.001	0.043
Zm00001d020636	Cysteine proteinase 2	0.551	8.312	0.000	0.021
Zm00001d036541	maize insect resistance2	0.551	4.612	0.000	0.004
Zm00001d033344	BTB/POZ domain-containing protein NPY2	0.550	6.268	0.000	0.001

[continua]

[continuação]

Zm00001d027749	Sulfate transporter 3.1	0.549	4.744	0.000	0.003
Zm00001d048707	benzoxazinone synthesis8	0.549	3.693	0.000	0.013
Zm00001d014315	Lipid binding protein	0.548	3.011	0.001	0.024
Zm00001d020614	ZIM-transcription factor 28	0.546	6.240	0.000	0.001
Zm00001d027539	glutathione transferase11	0.546	5.239	0.000	0.002
Zm00001d026695	Protein NRT1/ PTR FAMILY 5.10	0.546	4.945	0.000	0.003
Zm00001d018383	ribosomal protein L39	0.545	5.590	0.002	0.047
Zm00001d020008	Indole-3-glycerol phosphate synthase chloroplastic	0.544	3.656	0.000	0.013
Zm00001d036175	GDSL esterase/lipase APG	0.544	5.564	0.000	0.000
Zm00001d048802	Glycine-rich domain-containing protein 1	0.544	8.184	0.000	0.000
Zm00001d047492	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	0.544	5.325	0.000	0.005
Zm00001d003751	NDR1/HIN1-like 1	0.543	5.185	0.000	0.007
Zm00001d006159	Ycf49-like protein	0.543	3.629	0.000	0.005
Zm00001d046261	Putative thaumatin domain family protein	0.542	4.363	0.000	0.005
Zm00001d022449	Potassium transporter 2	0.540	4.140	0.000	0.002
Zm00001d046357	Beta-galactosidase	0.540	6.766	0.001	0.024
Zm00001d025977	Metal-nicotianamine transporter YSL2	0.540	6.181	0.000	0.001
Zm00001d028931	galactinol synthase1	0.540	4.338	0.000	0.001
Zm00001d045302	Zea nodulation homolog1	0.539	6.982	0.001	0.024
Zm00001d039956	hydroxycinnamoyltransferase8	0.538	3.417	0.000	0.017
Zm00001d031168	Glycine-rich RNA-binding protein 2	0.537	10.213	0.000	0.001
Zm00001d011625	Putative WAK receptor-like protein kinase family protein	0.537	4.012	0.000	0.006
Zm00001d018082	trehalose-6-phosphate phosphatase7	0.537	3.102	0.000	0.011
Zm00001d034897	Plastid-specific 30S ribosomal protein 1	0.537	6.359	0.000	0.000
Zm00001d051174	Aquaporin PIP2-3	0.536	6.088	0.000	0.001
Zm00001d022456	Peroxidase 42	0.535	6.846	0.000	0.020
Zm00001d048705	benzoxazinone synthesis5	0.534	5.880	0.000	0.000
Zm00001d032601	ABC transporter G family member 11	0.532	2.981	0.001	0.034
Zm00001d035409	Abscisic stress-ripening protein 2	0.532	4.625	0.000	0.000

[continua]

[continuação]

Zm00001d033543	Integral membrane HPP family protein	0.529	3.435	0.001	0.033
Zm00001d001883	-	0.527	7.311	0.000	0.000
Zm00001d008929	GDSL esterase/lipase	0.526	4.710	0.000	0.021
Zm00001d053675	lipoxygenase10	0.519	11.217	0.000	0.008
Zm00001d051194	Arginine decarboxylase	0.519	6.836	0.000	0.021
Zm00001d053394	-	0.519	7.421	0.001	0.037
Zm00001d050182	Fiber protein Fb34	0.518	3.503	0.000	0.020
Zm00001d045649	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain	0.517	4.640	0.001	0.043
Zm00001d029257	-	0.515	4.219	0.000	0.001
Zm00001d044335	OHP2	0.515	5.332	0.001	0.023
Zm00001d020371	Endoglucanase 11	0.513	3.647	0.000	0.013
Zm00001d033633	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	0.513	3.432	0.001	0.028
Zm00001d035308	Protein DOWNY MILDEW RESISTANCE 6	0.513	4.196	0.001	0.023
Zm00001d027291	extensin-like protein	0.512	5.799	0.001	0.042
Zm00001d035002	ferredoxin5	0.512	5.739	0.000	0.006
Zm00001d034977	VAMP protein SEC22	0.512	5.109	0.000	0.017
Zm00001d024963	Glutathione S-transferase GSTU6	0.512	4.886	0.000	0.017
Zm00001d005804	Auxin-repressed protein	0.511	4.541	0.000	0.002
Zm00001d023901	Histone H2A	0.511	5.506	0.001	0.043
Zm00001d044604	Putative serine/threonine-protein kinase-like protein CCR3	0.510	4.007	0.001	0.034
Zm00001d021906	Chlorophyll a-b binding protein	0.510	10.083	0.002	0.043
Zm00001d017079	BTB/POZ domain-containing protein	0.510	4.571	0.000	0.002
Zm00001d016691	Copper transport protein CCH	0.504	9.806	0.000	0.000
Zm00001d014200	Expressed protein; protein	0.503	3.638	0.000	0.010
Zm00001d049267	Acyl carrier protein	0.503	6.100	0.002	0.048
Zm00001d022059	PLASMODESMATA CALLOSE-BINDING PROTEIN 2	0.503	5.432	0.000	0.005
Zm00001d002966	Serine carboxypeptidase-like 35	0.502	3.463	0.001	0.027
Zm00001d012672	protein; Pentatricopeptide (PPR) repeat protein-like	0.499	5.394	0.000	0.021
Zm00001d037778	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	0.499	2.948	0.001	0.037

[continua]

[continuação]

Zm00001d031738	photosysteml2	0.499	5.782	0.000	0.000
Zm00001d034890	Outer envelope pore protein 24A chloroplastic	0.498	4.507	0.002	0.047
Zm00001d047090	Expansin-B4	0.497	5.076	0.000	0.010
Zm00001d012981	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0.497	4.645	0.000	0.001
Zm00001d038003	-	0.497	5.397	0.000	0.017
Zm00001d052595	Ribulose biphosphate carboxylase small chain%2C chloroplastic	0.497	10.562	0.002	0.047
Zm00001d053432	iron-sulfur protein2	0.496	6.661	0.000	0.014
Zm00001d035981	Aspartyl protease AED1	0.496	4.293	0.000	0.001
Zm00001d003931	ACR4	0.495	3.612	0.001	0.042
Zm00001d024294	Equilibrative nucleotide transporter 1	0.491	4.579	0.000	0.017
Zm00001d030346	Hsp20/alpha crystallin family protein	0.491	5.396	0.001	0.039
Zm00001d029898	Transcription factor UNE10	0.491	3.785	0.001	0.025
Zm00001d017951	Nudix hydrolase 17 mitochondrial	0.491	3.220	0.002	0.048
Zm00001d050214	ATPase 2 plasma membrane-type	0.488	3.181	0.001	0.022
Zm00001d040034	Multicopper oxidase LPR2	0.488	3.375	0.002	0.049
Zm00001d011510	Phosphoglycerate mutase family protein	0.487	3.844	0.000	0.015
Zm00001d028775	Thioredoxin superfamily protein	0.486	4.071	0.001	0.038
Zm00001d035907	Homeobox protein BEL1 homolog	0.485	3.892	0.002	0.046
Zm00001d043047	Expansin-A2	0.485	4.286	0.000	0.020
Zm00001d005114	Cytochrome b-c1 complex subunit 7-2	0.483	3.297	0.001	0.033
Zm00001d028505	Phospholipase A2-alpha	0.482	3.496	0.001	0.023
Zm00001d003712	abscisic acid stress ripening3	0.482	4.990	0.000	0.017
Zm00001d048703	benzoxazinone synthesis4	0.480	6.153	0.000	0.000
Zm00001d018388	Alginate regulatory protein AlgP	0.480	4.886	0.001	0.025
Zm00001d024926	-	0.479	3.335	0.002	0.047
Zm00001d010825	GDSL esterase/lipase LIP-4	0.477	3.163	0.001	0.023
Zm00001d006236	MYB31 transcription factor31	0.477	3.082	0.002	0.045
Zm00001d018282	Subtilisin-like protease SBT1.4	0.476	4.920	0.001	0.031
Zm00001d004052	60S ribosomal protein L35	0.475	6.136	0.002	0.046

[continua]

[continuação]

Zm00001d008826	gigantea1	0.475	8.052	0.000	0.011
Zm00001d030103	Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 30	0.474	4.123	0.001	0.024
Zm00001d044666	SMAD/FHA domain-containing protein	0.473	5.090	0.002	0.046
Zm00001d046184	Peroxidase 52	0.472	4.406	0.001	0.042
Zm00001d016185	Peroxidase 52	0.472	5.096	0.001	0.028
Zm00001d048499	UDP-galactose/UDP-glucose transporter 4	0.472	3.958	0.000	0.017
Zm00001d004768	Glycosyl hydrolase superfamily protein	0.472	4.692	0.001	0.031
Zm00001d038186	Protein NRT1/ PTR FAMILY 3.1	0.470	4.048	0.000	0.008
Zm00001d019855	Anther-specific proline-rich protein APG	0.470	4.624	0.000	0.007
Zm00001d016800	-	0.469	4.190	0.000	0.004
Zm00001d013741	BTB/POZ domain-containing protein NPY2	0.468	6.066	0.000	0.001
Zm00001d011349	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0.467	3.823	0.000	0.016
Zm00001d018825	Protein kinase superfamily protein	0.467	3.840	0.001	0.039
Zm00001d003800	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0.467	5.012	0.000	0.005
Zm00001d019059	-	0.466	4.946	0.002	0.049
Zm00001d018791	Anther-specific proline-rich protein APG	0.465	3.538	0.000	0.017
Zm00001d018781	Seed maturation protein	0.463	6.148	0.001	0.030
Zm00001d048569	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	0.462	6.123	0.000	0.001
Zm00001d045972	Glycosyltransferase family 61 protein	0.462	4.239	0.000	0.001
Zm00001d025103	amine oxidase1	0.458	4.060	0.001	0.039
Zm00001d040519	Germin-like protein subfamily 2 member 1	0.455	3.687	0.001	0.037
Zm00001d026522	Oligouridylate-binding protein 1C	0.454	4.416	0.000	0.002
Zm00001d029203	TRAF-like superfamily protein	0.452	3.664	0.001	0.031
Zm00001d038357	Transcription factor bHLH104	0.451	4.918	0.001	0.034
Zm00001d044970	Probable tyrosine-protein phosphatase	0.450	6.463	0.000	0.001
Zm00001d007073	Serine carboxypeptidase-like 40	0.450	5.669	0.000	0.006
Zm00001d005813	Protein TIFY 10B	0.449	5.177	0.000	0.016
Zm00001d047814	Catalytic/ hydrolase	0.449	4.613	0.001	0.040
Zm00001d024291	Putative leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein	0.449	5.277	0.000	0.020

[continua]



[continuação]

Zm00001d014811	DNL zinc finger family protein	0.448	4.763	0.000	0.014
Zm00001d031484	PsbP domain-containing protein 3 chloroplastic	0.447	5.396	0.001	0.027
Zm00001d031657	Probable inactive purple acid phosphatase 27	0.445	4.674	0.000	0.003
Zm00001d017785	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0.445	3.802	0.001	0.037
Zm00001d003304	Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor	0.444	6.699	0.000	0.020
Zm00001d029388	Metacaspase-3	0.444	6.813	0.000	0.006
Zm00001d029254	Solute carrier family 2%2C facilitated glucose transporter member 8	0.442	4.286	0.000	0.017
Zm00001d027996	Alcohol dehydrogenase-like 2	0.442	4.551	0.001	0.030
Zm00001d016943	Photosynthetic NDH subunit of lumenal location 2 chloroplastic	0.440	4.223	0.002	0.044
Zm00001d047554	GRAB2 protein%3B Putative NAC domain transcription factor superfamily protein	0.437	3.949	0.002	0.048
Zm00001d023593	Amino acid permease 2	0.437	4.833	0.000	0.018
Zm00001d027982	Protein DETOXIFICATION 27	0.434	3.915	0.002	0.047
Zm00001d007718	benzoxazinone synthesis13	0.434	4.767	0.001	0.032
Zm00001d013914	Membrane steroid-binding protein 1	0.434	5.582	0.000	0.001
Zm00001d024763	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0.433	4.031	0.001	0.038
Zm00001d038618	Cyclic nucleotide-gated ion channel 4	0.433	4.726	0.000	0.002
Zm00001d032808	-	0.432	4.630	0.000	0.008
Zm00001d028745	Rhodanese-like family protein	0.429	4.273	0.002	0.046
Zm00001d034022	Tubulin beta-4 chain	0.428	5.130	0.001	0.032
Zm00001d039859	Metallothionein-like protein type 2	0.427	5.438	0.000	0.001
Zm00001d005094	Bifunctional monothiol glutaredoxin-S16 chloroplastic	0.425	4.230	0.001	0.039
Zm00001d046718	bZIP transcription factor 60	0.423	4.649	0.000	0.001
Zm00001d036521	photosystem11	0.422	4.551	0.002	0.049
Zm00001d034852	F3H9.20 protein	0.419	5.893	0.000	0.010
Zm00001d037164	Peptidase M20/M25/M40 family protein	0.418	5.025	0.000	0.015
Zm00001d046354	GATA transcription factor 20	0.417	5.397	0.000	0.001
Zm00001d020717	abscisic acid 8'-hydroxylase4	0.415	5.734	0.000	0.001
Zm00001d039706	Zinc finger%2C C3HC4 type family protein	0.413	3.826	0.001	0.026

[continua]

[continuação]

Zm00001d040842	12-oxo-phytodienoic acid reductase6	0.412	4.226	0.002	0.043
Zm00001d028172	-	0.411	6.475	0.000	0.006
Zm00001d018826	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein / ML domain-containing protein	0.409	4.608	0.000	0.013
Zm00001d036098	Putative DUF26-domain receptor-like protein kinase family protein	0.408	5.267	0.002	0.046
Zm00001d028432	Nuclear transcription factor Y subunit C-1	0.407	4.563	0.001	0.030
Zm00001d020438	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	0.404	6.065	0.000	0.004
Zm00001d011036	Legumin-like protein%3B Putative rmlC-like cupins superfamily protein	0.403	4.488	0.000	0.019
Zm00001d052475	Cytochrome P450 90A1	0.403	6.780	0.001	0.041
Zm00001d023277	Protein DETOXIFICATION 21	0.402	4.658	0.000	0.010
Zm00001d019534	Serine carboxypeptidase-like 19	0.401	4.741	0.000	0.007
Zm00001d022032	ribosome-inactivating protein2	0.397	5.013	0.001	0.039
Zm00001d047396	Dual specificity phosphatase Cdc25	0.396	5.209	0.000	0.002
Zm00001d024762	Putative CBL-interacting protein kinase family protein	0.395	4.454	0.000	0.020
Zm00001d029290	Cytochrome P450 CYP709H1	0.394	6.621	0.000	0.009
Zm00001d042025	Ubiquitin-fold modifier 1	0.394	5.697	0.000	0.012
Zm00001d007417	ATP-dependent DNA helicase chloroplastic	0.394	4.589	0.001	0.034
Zm00001d031227	Protein yippee-like	0.392	4.284	0.001	0.036
Zm00001d017746	vitamin E synthesis4	0.392	6.054	0.000	0.007
Zm00001d044951	WAT1-related protein	0.384	4.226	0.001	0.038
Zm00001d020727	ARP protein (REF)	0.383	6.613	0.001	0.036
Zm00001d025924	(+)-neomenthol dehydrogenase	0.382	4.033	0.001	0.038
Zm00001d043984	Integral membrane protein-like	0.382	4.364	0.001	0.036
Zm00001d028867	cAMP-regulated phosphoprotein 19-related protein	0.379	4.616	0.002	0.045
Zm00001d031494	Putative L-ascorbate peroxidase 6	0.378	6.206	0.001	0.027
Zm00001d012067	Transcription factor bHLH62	0.378	5.550	0.000	0.014
Zm00001d050457	Protein DETOXIFICATION 27	0.377	4.602	0.002	0.047
Zm00001d008911	sodium/calcium exchanger family protein / calcium-binding EF hand family protein	0.374	6.268	0.000	0.013

[continua]

[continuação]

Zm00001d008367	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein	0.373	5.996	0.000	0.021
Zm00001d002156	Silencing group B protein	0.373	4.964	0.001	0.026
Zm00001d034932	Rhodanese-like domain-containing protein 8 chloroplastic	0.371	6.447	0.000	0.003
Zm00001d046900	Grx_C4-glutaredoxin subgroup I	0.370	4.930	0.001	0.040
Zm00001d051883	Divalent ion symporter	0.369	6.704	0.000	0.011
Zm00001d039173	hypersensitive induced reaction3	0.368	7.714	0.000	0.013
Zm00001d010445	Abscisic acid receptor PYL9	0.366	4.736	0.001	0.025
Zm00001d021291	Two-component response regulator-like APRR9	0.365	6.125	0.001	0.035
Zm00001d045478	Histone H1%3B Putative histone H1/H5 domain family protein	0.362	5.793	0.000	0.020
Zm00001d008591	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein	0.361	5.353	0.000	0.017
Zm00001d025401	abscisic acid stress ripening5	0.359	6.145	0.001	0.024
Zm00001d019976	phosphoglucosamine mutase family protein	0.355	5.156	0.000	0.014
Zm00001d035157	Lysine histidine transporter 2	0.354	6.272	0.000	0.021
Zm00001d011569	ATP synthase protein I -related	0.343	6.836	0.000	0.006
Zm00001d030109	Probable inactive shikimate kinase like 2 chloroplastic	0.343	6.967	0.000	0.014
Zm00001d034533	NEP-interacting protein 1	0.342	5.285	0.001	0.022
Zm00001d019312	beta glucosidase aggregating factor1	0.340	7.498	0.001	0.036
Zm00001d039181	RNA polymerase sigma factor sigC	0.337	4.632	0.002	0.046
Zm00001d019899	Rhodanese-like domain-containing protein 9 chloroplastic	0.337	6.646	0.000	0.021
Zm00001d005359	ATP-dependent protease Clp ATPase subunit	0.336	7.141	0.000	0.014
Zm00001d044208	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	0.336	5.531	0.000	0.017
Zm00001d016941	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein	0.334	5.166	0.000	0.018
Zm00001d021177	-	0.333	5.690	0.001	0.033
Zm00001d013300	Histone H2A	0.331	6.142	0.001	0.031
Zm00001d045497	-	0.329	5.163	0.000	0.019
Zm00001d002759	Nudix hydrolase 8	0.326	5.747	0.000	0.018
Zm00001d005726	Protein TIFY 6B	0.325	5.743	0.001	0.039
Zm00001d028409	Chaperonin 60 subunit beta 4 chloroplastic	0.313	4.852	0.001	0.036
Zm00001d006340	Molybdenum cofactor sulfurase family protein	0.311	6.421	0.002	0.045

[continua]

[continuação]

Zm00001d022274	pyruvate orthophosphate dikinase4	0.308	8.007	0.001	0.039
Zm00001d026243	Multiple organellar RNA editing factor 2 chloroplastic	0.301	5.685	0.002	0.045
Zm00001d045706	Restorer of fertility2	0.299	7.386	0.002	0.047
Zm00001d033559	Costars family protein	0.294	5.295	0.001	0.038
Zm00001d011929	Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	0.292	5.796	0.001	0.030
Zm00001d047203	-	0.290	5.745	0.001	0.036
Zm00001d026586	Lysine-specific histone demethylase 1	0.290	5.641	0.001	0.033
Zm00001d011362	PsbP domain-containing protein 5 chloroplastic	0.284	5.558	0.001	0.042
Zm00001d038021	ARM repeat superfamily protein	-0.287	5.577	0.001	0.032
Zm00001d048129	Metal transporter Nramp3	-0.293	5.566	0.002	0.044
Zm00001d028531	glycine-rich protein	-0.294	5.106	0.001	0.039
Zm00001d033172	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	-0.296	5.769	0.002	0.050
Zm00001d003857	calnexin homolog1	-0.296	8.392	0.001	0.043
Zm00001d037700	Heat shock protein 4	-0.298	7.554	0.001	0.036
Zm00001d051306	Hsp70-Hsp90 organizing protein 3	-0.300	7.039	0.001	0.031
Zm00001d002256	Starch synthase 3 chloroplastic/amyloplastic	-0.300	6.207	0.002	0.046
Zm00001d003401	14-3-3-like protein GF14-6	-0.302	8.679	0.002	0.044
Zm00001d005638	Retinol dehydrogenase 13	-0.306	5.935	0.001	0.040
Zm00001d025617	general regulatory factor2	-0.308	8.697	0.001	0.039
Zm00001d032945	-	-0.310	4.734	0.001	0.043
Zm00001d029378	Protein LNK1	-0.311	8.666	0.001	0.039
Zm00001d045336	-	-0.312	5.668	0.000	0.020
Zm00001d032460	Protein BPS1 chloroplastic	-0.314	5.844	0.001	0.039
Zm00001d019283	Calreticulin	-0.315	8.976	0.000	0.020
Zm00001d036989	RPGR ORF15 isoform	-0.315	5.895	0.001	0.030
Zm00001d043757	Nuclear pore complex protein NUP50A	-0.319	7.161	0.001	0.024
Zm00001d039966	Octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein / tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	-0.319	4.957	0.001	0.040
Zm00001d005966	Phosphatidylinositol 4-kinase gamma 7	-0.320	4.969	0.002	0.043

[continua]

[continuação]

Zm00001d015378	Glycine cleavage system H protein 2 mitochondrial	-0.320	5.198	0.001	0.036
Zm00001d018043	Cullin-3B	-0.326	5.204	0.001	0.036
Zm00001d010927	Putative RNA polymerase II subunit B1 CTD phosphatase RPAP2 homolog	-0.326	4.646	0.001	0.032
Zm00001d020602	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	-0.326	4.450	0.001	0.041
Zm00001d033707	Microsomal glutathione s-transferase	-0.327	6.578	0.002	0.043
Zm00001d002396	Calcium-transporting ATPase 9 plasma membrane-type	-0.328	6.523	0.000	0.014
Zm00001d043845	Glutamate synthase 1 [NADH] chloroplastic	-0.329	7.742	0.001	0.024
Zm00001d047469	Putative nucleolar-protein-domain family protein	-0.329	5.647	0.001	0.028
Zm00001d020170	Sulfite exporter TauE/SafE family protein	-0.329	7.346	0.001	0.035
Zm00001d001785	C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family protein	-0.331	5.745	0.001	0.030
Zm00001d019173	Golgin subfamily A member 4	-0.331	5.040	0.000	0.018
Zm00001d016512	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP65	-0.331	5.381	0.000	0.021
Zm00001d031569	Peptidyl-prolyl isomerase	-0.333	8.783	0.000	0.010
Zm00001d035139	MA3 domain-containing protein	-0.334	6.342	0.000	0.016
Zm00001d044838	HVA22-like protein a	-0.336	4.403	0.002	0.046
Zm00001d052855	HSP protein%3B Putative heat shock protein 90 family protein	-0.338	9.202	0.001	0.022
Zm00001d040981	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	-0.339	5.907	0.000	0.017
Zm00001d009597	FtsJ-like methyltransferase family protein	-0.339	4.788	0.001	0.024
Zm00001d047808	initiator binding protein1	-0.339	4.948	0.001	0.029
Zm00001d006008	Heat shock protein 90-2	-0.341	9.130	0.000	0.013
Zm00001d032546	Monothiol glutaredoxin-S17	-0.342	4.804	0.000	0.018
Zm00001d011805	Putative regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	-0.342	5.001	0.001	0.037
Zm00001d014957	Translationally-controlled tumor protein homolog	-0.345	8.550	0.000	0.007
Zm00001d017448	Vesicle-associated protein 2-1	-0.345	5.101	0.001	0.034
Zm00001d047813	-	-0.346	4.585	0.001	0.033
Zm00001d014863	Protein REVEILLE 7	-0.349	4.843	0.002	0.045
Zm00001d008820	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-0.349	4.285	0.002	0.049

[continua]

[continuação]

Zm00001d048890	Acyl-coenzyme A oxidase	-0.353	5.060	0.000	0.012
Zm00001d003157	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme S-adenosylmethionine decarboxylase alpha chain S-adenosylmethionine decarboxylase beta chain	-0.354	11.128	0.000	0.014
Zm00001d015520	Chaperone protein ClpB4 mitochondrial	-0.355	4.714	0.000	0.021
Zm00001d042596	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	-0.356	5.394	0.000	0.015
Zm00001d030500	-	-0.357	5.088	0.001	0.025
Zm00001d001959	GTP cyclohydrolase I 1	-0.360	5.740	0.000	0.007
Zm00001d006192	Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein	-0.360	4.513	0.001	0.038
Zm00001d016081	Extra-large G-protein-like; protein	-0.363	4.523	0.001	0.031
Zm00001d002611	Copper chaperone for superoxide dismutase	-0.365	4.226	0.001	0.032
Zm00001d048693	ATA15 protein	-0.365	7.702	0.000	0.020
Zm00001d017846	Zinc finger BED domain-containing protein DAYSLEEPER	-0.368	5.299	0.000	0.007
Zm00001d023629	Putative DUF827 domain containing family protein	-0.369	4.114	0.001	0.031
Zm00001d033903	Zinc finger BED domain-containing protein DAYSLEEPER	-0.369	4.027	0.001	0.032
Zm00001d033273	Organic cation/carnitine transporter 7	-0.371	5.927	0.001	0.032
Zm00001d017882	KH domain-containing protein	-0.372	5.616	0.000	0.002
Zm00001d006790	Mitogen-activated protein kinase 16	-0.379	6.773	0.000	0.003
Zm00001d043023	Protein RETICULATA-RELATED 6 chloroplastic	-0.380	6.345	0.000	0.006
Zm00001d002823	Hsp70-Hsp90 organizing protein 3	-0.381	5.233	0.000	0.003
Zm00001d043335	Branched-chain-amino-acid aminotransferase 5 chloroplastic Regulator of chromosome condensation (RCC1) family with FYVE zinc	-0.381	6.838	0.000	0.002
Zm00001d042074	finger domain	-0.381	5.471	0.001	0.039
Zm00001d005460	Calreticulin-2	-0.381	7.138	0.000	0.007
Zm00001d037052	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 11	-0.381	6.091	0.000	0.010
Zm00001d047726	DnaJ protein ERDJ3A	-0.382	4.935	0.000	0.015
Zm00001d043295	Myosin-binding protein 1	-0.385	5.496	0.000	0.007
Zm00001d039158	-	-0.386	4.242	0.001	0.029
Zm00001d028603	GRAS transcription factor (Fragment) [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A0A060D1U6]	-0.389	4.818	0.000	0.007

[continua]

[continuação]

Zm00001d006361	Probable rRNA-processing protein EBP2 homolog	-0.391	5.320	0.000	0.001
Zm00001d003265	Topoisomerase-like protein	-0.393	7.486	0.000	0.006
Zm00001d025948	Putative translation elongation factor family protein	-0.396	7.444	0.000	0.012
Zm00001d033797	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	-0.398	4.931	0.001	0.041
Zm00001d049192	chaperone protein dnaJ-related	-0.399	5.388	0.002	0.044
Zm00001d026445	E3 ubiquitin-protein ligase MBR2	-0.399	5.699	0.001	0.032
Zm00001d038049	Lichenase-2%3B Putative O-Glycosyl hydrolase superfamily protein	-0.400	6.544	0.000	0.017
Zm00001d029611	Arabinosyltransferase RRA3	-0.404	3.826	0.001	0.023
Zm00001d047847	Serine/arginine-rich splicing factor SR45a	-0.404	7.705	0.000	0.005
Zm00001d020898	Heat shock protein 90-2	-0.408	7.675	0.000	0.002
Zm00001d004513	Bifunctional 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate synthetase 2	-0.410	6.103	0.000	0.009
Zm00001d026573	Methylthioribose kinase	-0.410	6.788	0.001	0.039
Zm00001d015138	-	-0.411	9.132	0.000	0.003
Zm00001d026334	-	-0.412	5.387	0.000	0.017
Zm00001d032933	Protein NETWORKED 1A	-0.415	7.344	0.000	0.001
Zm00001d053726	Myosin heavy chain-related protein	-0.418	5.388	0.000	0.002
Zm00001d017401	Hsp70-Hsp90 organizing protein 3	-0.421	7.238	0.000	0.001
Zm00001d038806	Chaperone protein ClpB1	-0.421	5.029	0.001	0.043
Zm00001d039259	DNAJ heat shock family protein	-0.422	4.015	0.000	0.011
Zm00001d023735	Nitrilase-associated protein	-0.432	6.998	0.000	0.001
Zm00001d042043	RNA-binding CRS1 / YhbY (CRM) domain protein	-0.432	5.123	0.000	0.003
Zm00001d040263	Glycogen synthase kinase-3 MsK-3	-0.437	7.131	0.000	0.016
Zm00001d013402	phytochromeA2	-0.441	4.792	0.000	0.020
Zm00001d019479	granule-bound starch synthase1b	-0.443	8.009	0.001	0.023
Zm00001d021278	B-box zinc finger protein 19	-0.456	5.261	0.000	0.002
Zm00001d010478	Peroxisomal adenine nucleotide carrier 1	-0.457	5.347	0.000	0.003
Zm00001d012420	Heat shock 70 kDa protein	-0.459	6.953	0.000	0.010
Zm00001d037604	Ethylene response sensor 1	-0.460	3.958	0.001	0.024
Zm00001d013927	Monothiol glutaredoxin-S17	-0.464	5.395	0.000	0.000

[continua]

[continuação]

Zm00001d003750	Digalactosyldiacylglycerol synthase 1 chloroplastic	-0.468	4.808	0.000	0.001
Zm00001d022243	Serine/arginine-rich SC35-like splicing factor SCL33	-0.469	5.843	0.000	0.002
Zm00001d037717	Heat shock 70 kDa protein 14	-0.471	4.461	0.000	0.000
Zm00001d011890	cytokinin oxidase 3	-0.479	4.212	0.002	0.046
Zm00001d047204	Protein LNK1	-0.485	8.066	0.000	0.002
Zm00001d053642	EIN3-binding F-box protein 1	-0.493	5.531	0.000	0.002
Zm00001d017932	Agamous-like MADS-box protein AGL16	-0.497	5.835	0.000	0.000
Zm00001d053799	transglycosylase SLT domain containing protein expressed	-0.505	3.317	0.001	0.038
Zm00001d046661	Amino acid transporter-like protein%3B Amino acid transporter-like protein isoform 1%3B Amino acid transporter-like protein isoform 2	-0.505	8.094	0.000	0.001
Zm00001d002325	-	-0.506	8.383	0.000	0.001
Zm00001d038891	Phosphoethanolamine N-methyltransferase 3	-0.506	7.822	0.000	0.004
Zm00001d048201	Inositol-3-phosphate synthase isozyme 1	-0.508	7.453	0.000	0.011
Zm00001d021915	Major facilitator superfamily protein	-0.512	2.769	0.001	0.029
Zm00001d041491	Nuclear transcription factor Y subunit A-7	-0.520	4.002	0.000	0.002
Zm00001d007716	Galactolipid galactosyltransferase SFR2 chloroplastic	-0.525	5.053	0.000	0.003
Zm00001d047479	Superoxide dismutase	-0.526	6.009	0.000	0.000
Zm00001d048692	Magnesium/proton exchanger	-0.536	3.240	0.002	0.048
Zm00001d047779	Whole genome shotgun sequence of line PN40024 scaffold_36.assembly12x (Fragment)	-0.537	3.986	0.000	0.004
Zm00001d015362	O-fucosyltransferase family protein	-0.562	3.687	0.001	0.031
Zm00001d045455	Inositol-3-phosphate synthase isozyme 1	-0.565	3.156	0.001	0.029
Zm00001d009811	Protein NETWORKED 4A	-0.572	4.220	0.000	0.003
Zm00001d031332	Heat shock protein 90-2	-0.591	9.958	0.000	0.000
Zm00001d048460	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 9	-0.598	7.856	0.000	0.000
Zm00001d018470	Carboxyl-terminal-processing peptidase 2 chloroplastic	-0.600	4.632	0.000	0.008
Zm00001d047187	HSP20-like chaperones superfamily protein	-0.636	5.915	0.000	0.000
Zm00001d042245	-	-0.690	5.413	0.000	0.001
Zm00001d013647	Dehydrin 13	-0.694	4.143	0.000	0.000

[continua]



[continuação]

Zm00001d022576	SNF2 domain-containing protein CLASSY 1	-0.699	1.806	0.001	0.030
Zm00001d012110	DUF936 family protein	-0.703	2.092	0.000	0.018
Zm00001d034726	Cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein	-0.709	2.433	0.000	0.010
Zm00001d008399	Putative NAC domain transcription factor superfamily protein	-0.750	2.592	0.000	0.013
Zm00001d011428	uroporphyrin methylase 1	-0.750	1.532	0.001	0.032
Zm00001d025202	Protein kinase superfamily protein	-0.752	1.450	0.001	0.032
Zm00001d037608	-	-0.754	1.992	0.001	0.036
Zm00001d024546	circadian clock associated2	-0.758	8.160	0.000	0.000
Zm00001d012398	Putative regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	-0.759	4.443	0.000	0.000
Zm00001d049543	circadian clock associated1	-0.831	8.867	0.000	0.000
Zm00001d042880	regulator of chromosome condensation1	-0.854	4.535	0.000	0.000
Zm00001d004057	cytochrome oxidase 2	-0.879	1.901	0.000	0.002
Zm00001d024547	Putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	-0.899	5.260	0.000	0.000
Zm00001d041684	-	-0.901	2.697	0.000	0.008
Zm00001d040362	Dof-type zinc finger DNA-binding family protein	-0.913	1.564	0.000	0.002
Zm00001d038164	methyl binding domain	-0.920	2.654	0.000	0.003
Zm00001d028180	low phytic acid1	-1.064	7.524	0.000	0.001
Zm00001d021698	Receptor-like protein kinase RK20-1	-1.201	4.860	0.000	0.000
Zm00001d041794	-	-1.531	2.897	0.000	0.000
Zm00001d002159	Wound induced protein	-2.350	-0.275	0.000	0.000

[conclusão]