

EXTRATO DE MORINGA ESTIMULA O METABOLISMO DE PLANTAS DE ARROZ CULTIVADAS COM BAIXO SUPRIMENTO DE NITROGÊNIO

Data de aceite: 03/07/2023

Maria Eduarda Pimentel de Melo

Estudante de graduação em Agronomia
(IA/UFRRJ)

Leandro Azevedo Santos

Professor do Departamento de Solos (DS/
IA/UFRRJ)

Argemiro Sanavria

Professor do Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva (IV/UFRRJ)

Erinaldo Gomes Pereira

Doutorando do Programa de Pós-
graduação em Agronomia - Ciências do
Solo (CPGA-CS /UFRRJ)

8 tratamentos: controle, MLEP0, MLEP20, MLEP50, MLEP60, MLEP80, MLEP90 e MLEP100. As sementes de arroz foram tratadas, germinadas em água e transferidas para solução nutritiva com 0,2 mM de N. Vinte dias após a germinação (DAG) foi realizada a coleta e posterior determinação dos metabólitos solúveis e expressão gênica, ambas no sistema radicular. Houve alteração nos teores de nitrato, aminoácidos totais e açúcares solúveis, sobretudo no tratamento MLEP100. As doses menos concentradas do extrato de moringa estimularam o aumento na expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo de N. Sendo assim, conclui-se que o extrato de moringa apresenta potencial como bioestimulante em plantas de arroz em situação de fornecimento reduzido de N, causando alterações metabólicas e na expressão gênica.

PALAVRAS-CHAVE: bioestimulante, moringa, arroz.

RESUMO: Visando atender as demandas agrícolas de aumento na produção surgem diversas tecnologias, dentre elas os bioestimulantes. São substâncias naturais ou sintéticas, que ao serem aplicados estimulam processos fisiológicos e rotas metabólicas. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial do extrato de folhas de moringa como bioestimulante em plantas de arroz submetidas a baixo suprimento de nitrogênio (N). Para isso, foram aplicados

MORINGA EXTRACT STIMULATES METABOLISM IN RICE PLANTS GROWN UNDER LOW NITROGEN SUPPLY

ABSTRACT: In order to meet the agricultural demands of increased production, several technologies have emerged, including biostimulants. They are natural or synthetic substances that, when applied, stimulate physiological processes and metabolic pathways. Therefore, the present work aimed to evaluate the potential of moringa leaf extract as a biostimulant in rice plants subjected to low nitrogen (N) supply. For this, 8 treatments were applied: control, MLEP0, MLEP20, MLEP50, MLEP60, MLEP80, MLEP90 and MLEP100. The rice seeds were treated, germinated in water and transferred to a nutrient solution with 0.2 mM of N. Twenty days after germination (DAG) the collection and subsequent determination of soluble metabolites and gene expression, both in the root system, were performed. There was a change in the levels of nitrate, total amino acids and soluble sugars, especially in the MLEP100 treatment. The less concentrated doses of moringa extract stimulated an increase in the relative expression of genes related to N metabolism. Therefore, it is concluded that the moringa extract has potential as a biostimulant in rice plants in a situation of reduced N supply, causing metabolic changes and gene expression.

KEYWORDS: biostimulant, moringa, rice.

INTRODUÇÃO

A população mundial cresce exponencialmente, com previsão de ultrapassar 9,7 bilhões de pessoas até 2050 (UN, 2020). Arelado a isso há uma degradação cada vez mais intensa dos solos agricultáveis em função de ações antrópicas e mudanças climáticas, levando a maior incidência de deficiência hídrica e de nutrientes para as plantas. Sendo assim, mostram-se necessárias novas tecnologias visando aumentar a produtividade das culturas de interesse agrônomo de forma eficiente, acessível e com menor impacto possível ao meio ambiente.

Os bioestimulantes surgem com o intuito de atender essa demanda. São substâncias naturais, sintéticas ou microrganismos que podem ser aplicados de diversas formas e em diferentes concentrações, trazendo benefícios a processos fisiológicos através do aumento da absorção e eficiência de uso dos nutrientes, estimulando rotas metabólicas (MELLO et al., 2022).

A moringa (*Moringa oleífera* Lam.) é uma espécie arbórea que têm se destacado tendo em vista sua implementação em diversos setores, dentre eles o agrícola. Seu uso tem por base os diversos elementos presentes em seu extrato, que pode ser preparado a partir das diferentes partes da planta, se destacando a presença de flavonóides, taninos, vitaminas, minerais, precursores de fitormônios e ácidos fenólicos (TSHABALALA et al., 2019).

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial do extrato de folhas de moringa como bioestimulante em plantas de arroz submetidas ao estresse pelo baixo suprimento de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

O preparo do extrato se deu a partir da coleta de folhas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) na Fazendinha Agroecológica Km 47, Seropédica, RJ – Brasil. As folhas foram cortadas e maceradas em nitrogênio líquido, sendo homogeneizadas com etanol 80% numa proporção de 1:10 (m/v). A partição da solução com clorofórmio foi feita de acordo com Fernandes (1984). Foram aplicados 8 tratamentos, sendo: controle (sementes não tratadas), MLEP0 (apenas água destilada), MLEP20 (1 mL de extrato + 19 mL de água destilada), MLEP50 (1 mL de extrato + 49 mL de água destilada), MLEP60 (1 mL de extrato + 59 mL de água destilada), MLEP80 (1 mL de extrato + 79 mL de água destilada), MLEP90 (1 mL de extrato + 89 mL de água destilada) e MLEP100 (1 mL de extrato + 99 mL de água destilada).

Foram obtidas sementes de arroz, variedade manteiga, do banco de germoplasma do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (LNMP), Seropédica, RJ – Brasil. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2%. O condicionamento consistiu em manter 40 sementes ($\pm 1,2g$) em 6mL de solução dos tratamentos por um período de 16h a 25°C, sendo então lavadas com água destilada e secagem em ventilação natural até atingir a umidade inicial.

As sementes foram transferidas para potes de plástico (1L) com gaze, contendo água destilada até 10 DAG (dias após a germinação), sendo arranjadas em 10 sementes por vasos e 4 repetições. Aos 11 DAG foi disponibilizada solução nutritiva com 1/4 de força iônica e 0,2 mM de N-NO₃⁻. Aos 14 DAG a solução foi repostada por uma de 1/2 Fi contendo 0,2 mM de N-NO₃⁻, repostada a cada três dias. Aos 20 DAG foi realizada a última troca de solução e a coleta das plantas, seccionadas em raiz e parte aérea. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com luz natural e temperatura de 30°C \pm 2°C.

Para a determinação dos metabólitos solúveis foram reservados 0,1g de material fresco, que passou por processo de trituração, filtragem e partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984). Os conteúdos de nitrato (NO₃⁻), amônio (NH₄⁺), aminoácidos livres e açúcares solúveis presentes nas amostras foram determinados de acordo com Miranda et al. (2001), Felker (1977), Yemm e Cocking (1955) e Yemm e Willis (1957), respectivamente.

O RNA total foi extraído de acordo com Gao et al. (2001) e quantificado utilizando o “NanoDrop One”. As amostras foram tratadas com DNase I utilizando o Kit “DNase I Amplification Grade” e o cDNA foi obtido utilizando o Kit “High Capacity RNA-to-cDNA Kit”. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no “StepOne Plus Real-Time PCR System” utilizando o kit “5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) Kit”, seguindo as recomendações dos fabricantes. A expressão relativa dos genes foi feita de acordo com Livak e Schmittgen (2001) e o gene de referência utilizado foi a ubiquitina 5 (*OsUBQ5*). A construção dos gráficos foi realizada utilizando o programa *SigmaPlot* 14.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificado aumento significativo no teor de NO_3^- no tratamento MLEP100, o que indica maior estímulo para a absorção desse nutriente. Os teores de aminoácidos totais apresentaram aumento nos tratamentos MLEP90 e MLEP100 (Figura 1). Além disso, houve um aumento nos teores de açúcares solúveis nos tratamentos MLEP50, MLEP60, MLEP80, MLEP90 e MLEP100. A alteração observada nos teores dos metabólitos, sobretudo nos tratamentos mais diluídos, indica que houve aumento na absorção de N, que pode ter sido acompanhado por um estímulo nas rotas metabólicas das plantas de arroz.

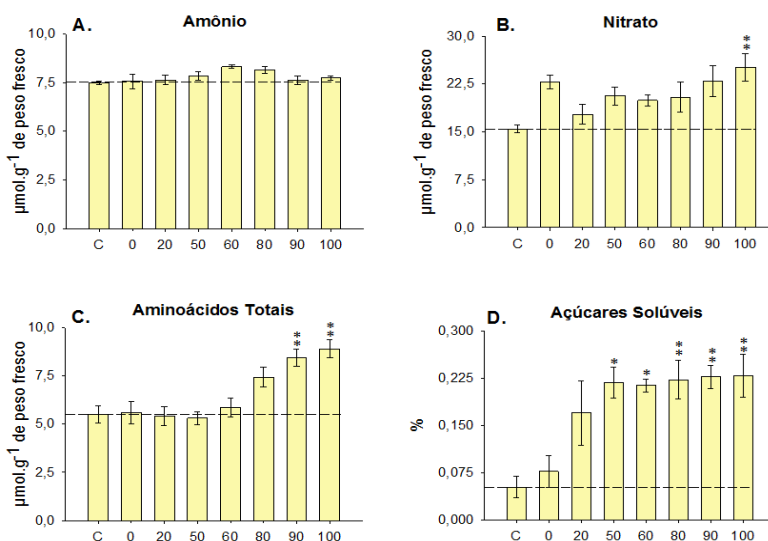


Figura 1. Teores das frações solúveis presentes no sistema radicular de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em situação de baixo fornecimento de nitrogênio submetidas a tratamento pré-germinativo com extrato particionado de folhas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.). A = Teor de amônio (NH_4^+)^a; B = Teor de nitrato (NO_3^-)^b; C = Teor de aminoácidos totais c; D = Teor de açúcares solúveis d. Barras verticais são os erros padrões das médias. *, **, *** símbolos mostram diferença estatística significativa a 0,05, 0,01 e 0,001%, respectivamente (Teste de Dunnett, $\alpha = 0,05$).

Buscando elucidar as alterações nos teores dos metabólitos solúveis foi realizada a expressão relativa de genes no sistema radicular das plantas. Foram selecionados oito genes, sendo três relacionados a absorção de nitrogênio (*OsNRT1.1*, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.4*), três envolvidos com a redução e assimilação de nitrogênio (*OsNIA1*; *OsGS1.2*; *OsNADH-GOGAT*), e dois transportadores de aminoácidos (*OsAAP1* e *OsAAP3*) (Figura 2).

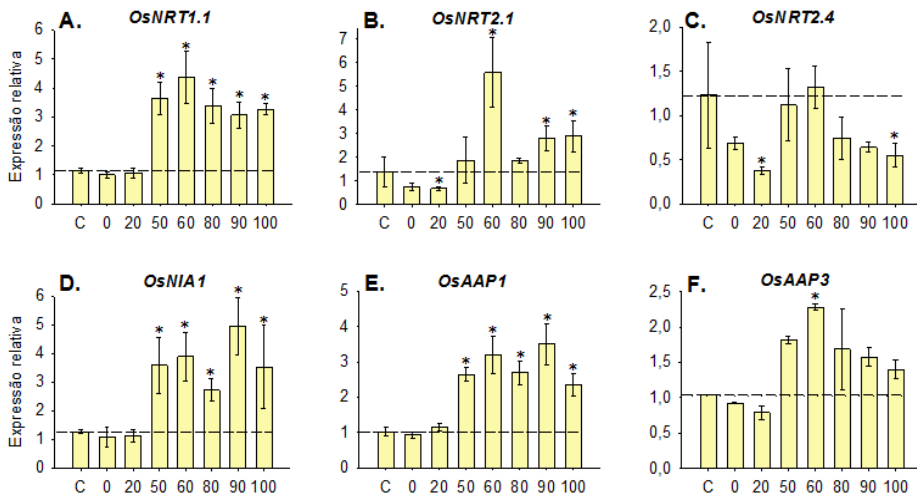


Figura 2. Expressão relativa dos genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio no sistema radicular de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em situação de baixo fornecimento de nitrogênio submetidas a tratamento pré-germinativo com extrato particionado de folhas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.). A = Expressão relativa do gene *OsNRT1.1*^a; B = Expressão relativa do gene *OsNRT2.1*^b; C = Expressão relativa do gene *OsNRT2.4*^c; D = Expressão relativa do gene *OsNIA1*^d; E = Expressão relativa do gene *OsAAP1*^e; F = Expressão relativa do gene *OsAAP3*^f. Asteriscos (*) indicam uma alteração média significativa de mais de 2 entre o controle e os tratamentos.

Foi verificado aumento na expressão relativa do gene *OsNRT1.1* nos tratamentos MLEP50, MLEP60, MLEP80, MLEP90 e MLEP100. Esse aumento pode ter relação com a função do gene, um transportador de dupla afinidade, no reconhecimento e importação de NO₃⁻; além do mecanismo de tolerância em situações adversas (HO et al., 2009; ARAÚJO et al., 2015; FANG et al., 2021). O gene *OsNRT2.1* apresentou aumento nos tratamentos MLEP60, MLEP90 e MLEP100. Já o gene *OsNRT2.4*, diminuiu a expressão nos tratamentos MLEP20 e MLEP100 quando comparados ao controle. Ambos os genes são de alta afinidade, sendo expressos em baixas concentrações de N. O silenciamento do gene *OsNRT2.4* tem relação com aumento da absorção de NO₃⁻ e melhora na reposta de expressão em situação de baixo N (SOUZA et al., 2022).

O gene *OsNIA1*, que codifica a enzima nitrato redutase, apresentou aumento de expressão nos tratamentos MLEP50, MLEP60, MLEP80, MLEP90 e MLEP100. Esse aumento indica que o processo de absorção, redução e assimilação pode estar ocorrendo preferencialmente nas raízes, como uma estratégia para poupar gastos energéticos com transporte para parte aérea.

O gene *OsAAP1* apresentou aumento de expressão nos tratamentos MLEP50, MLEP60, MLEP80, MLEP90 e MLEP100, enquanto o gene *OsAAP3* só teve aumento de expressão no tratamento MLEP60. O aumento em ambos os genes pode estar relacionado com um estímulo ao transporte dos aminoácidos produzidos nas raízes para os demais órgãos drenos da planta.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos nesse estudo, conclui-se que o extrato de folhas de moringa apresenta potencial como bioestimulante em plantas de arroz, melhorando o desempenho dessa planta em situação de estresse por fornecimento reduzido de N.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARAÚJO, O.J. et al. **Expression of the genes OsNRT1. 1, OsNRT2. 1, OsNRT2. 2, and kinetics of nitrate uptake in genetically contrasting rice varieties.** American Journal of Plant Sciences, v. 6, n. 02, p. 306, 2015.

DE MELLO F.L.L. et al. **Bioestimulantes no crescimento vegetal e desempenho agrônômico do feijão-comum de ciclo superprecoce.** Agrarian, v. 13, n. 47, p. 27- 41, 2020.

FANG, X.Z. et al. **NRT1. 1 dual-affinity nitrate transport/signalling and its roles in plant abiotic stress resistance.** Frontiers in plant science, p. 1817, 2021.

FELKER, P. **Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate-dichloroisocyanurate color reaction.** Analytical Chemistry, v. 49, n. 7, p. 1080-1080, 1977.

FERNANDES, M.S. **N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice.** Turrialba, v.34, n.1, p. 9–18, 1984.

GAO, J. et al. **Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids.** Plant Molecular Biology Reporter, v. 19, n. 2, p. 185-186, 2001.

HO, C.H. et al. **CHL1 functions as a nitrate sensor in plants.** Cell, v. 138, n. 6, p. 1184- 1194, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$ Method.** Methods, v. 25, p. 402-408, 2001.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. **A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite.** Nitric oxide, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

PROSPECTS, U.N. Highlights (ST/ESA/SER. A/423): United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World Population; 2019. 2019.

SOUZA, A.F.F.et al. **Knockdown of OsNRT2. 4 modulates root morphology and alters nitrogen metabolism in response to low nitrate availability in rice.** Molecular Breeding, v. 42, n. 1, p. 1-15, 2022.

TSHABALALA, T. et al. **Scribbling the cat: a case of the “miracle” plant, Moringa oleifera.** Plants, v. 8, n. 11, p. 510, 2019.

YEMM, E.W.; COCKING, E.C.; RICKETTS, R.E. **The determination of amino-acids with ninhydrin.** Analyst, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. **The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone.** Biochemical journal, v. 57, n. 3, p. 508, 1954.