

# MODULAÇÃO DOS GENES *OSNRT1.1*, *OSGS1.2*, *OSGS2* MEDIANTE APLICAÇÃO FOLIAR E RADICULAR DO EXTRATO AQUOSO DE *KAPPAPHYCUS ALVAREZII* E SEUS EFEITOS NOS TEORES DE NITRATO EM PLANTAS DE ARROZ

Data de aceite: 01/04/2024

### **Samuel de Abreu Lopes**

Estudante de graduação em Agronomia  
(UFRRJ)

### **Raphaella Esterque Cantarino**

Estudante de graduação em Agronomia  
(UFRRJ)

### **Ayheesa Cristina Santos de Lima**

Estudante de graduação em Agronomia  
(UFRRJ)

### **Erinaldo Gomes Pereira**

Pós-doutorando do Programa de Pós-graduação em Fitosanidade (UFRRJ)

### **Tadeu Augusto Van Tol de Castro**

Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo (UFRRJ)

### **Andrés Calderín García**

Professor do Departamento de Solos  
(UFRRJ)

como candidato a biofertilizantes devido sua riqueza biológica. O presente ensaio teve como objetivo a utilização do extrato aquoso via radicular à 2% e foliar à 2 e 10% da macroalga *Kappaphycus alvarezii*(K-sap) em diferentes concentrações a fim de avaliar a expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio e os teores de nitrato em plantas de arroz cultivadas em solução nutritiva. Os resultados foram substanciais e mostraram como a via de aplicação e suas dosagens influenciam na expressão desses genes e modulam os teores de nitrato em diferentes partes da planta de arroz. O tratamento radicular com K-sap à 2% diminui a expressão do transportador *OsNRT1.1* na raiz e aumentou a expressão de *OsGS1.2* indicando maior assimilação do nitrato, com destaque também para K-sap via foliar à 2 e 10% aumentou os teores de nitrato na raiz e na bainha conforme estimulou o transportador de nitrato, seja na parte aérea seja na radicular. Constatou-se que a aplicação em suas diferentes formas na planta, foliar e radicular, bem como suas doses modulam os genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio e refletem na composição das plantas de arroz submetidas a esses tratamentos.

**RESUMO:** O cenário global vem acentuando a busca por candidatos a bioestimulantes que sejam de produção sustentável e atendam as demandas da produção e da saúde dos ecossistemas. Dessa forma, as macroalgas que vêm sendo difundidas no território nacional e compõem uma lista de produtos naturais que atende essa demanda

**PALAVRAS-CHAVE:** bioestimulantes, expressão gênica, macroalga

## MODULATION OF *OSNRT1.1*, *OSGS1.2*, *OSGS2* GENES ON RICE PLANTS UNDER FOLIAR AND RADICULAR APPLICATION OF AQUEOUS EXTRACT OF *KAPPAPHYCUS ALVAREZII* AND THEIRS EFFECTS ON NITRATE LEVELS

**ABSTRACT:** The global situation worldwide has been intensifying the search for biostimulant sustainable candidates that serve for global production and ecosystem health. This way the seaweeds who were expanding the production on Brazilian territories and was on a list of natural products matching with this demand due their biological complexity. This assay aims at the use on nutrient solution under 2% dosage and foliar under 2 and 10% dosage way of aqueous extract of *Kappaphycus alvarezii*(K-sap) on different concentrations to understand the genetic expression of nitrogen metabolism genes and the nitrate levels on different parts of rice plants. The results show the difference between treatments and ways of application. The use on nutrient solution under 2% concentration decrease the expression of *OsNRT1.1* transporter on the roots and increase the expression of *OsGS1.2* generating more nitrate assimilation, with highlights to foliar application too under 2 and 10% concentration increase the nitrate levels on roots and stems and increase the activity of nitrate transporter *OsNRT1.1* on leaf and roots. The results show the application of K-sap on nutrient solution and foliar with different concentrations modulate the gene expression of nitrogen metabolism and reflect on the composition of rice plants under the treatments.

**KEYWORDS:** biostimulants, gene expression, seaweed

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com o crescimento desenfreado da população mundial e a escassez de recursos ao redor do mundo, devido a atividades exercidas de forma predatória, há uma tendência global para aumentar a eficiência dos recursos naturais ainda disponíveis e diminuir os impactos das atividades agrícolas nos ecossistemas e na saúde da população global. Além disso, o uso indiscriminado de fertilizantes químicos e agrotóxicos vem junto a essa tendência na medida em que saliniza e destrói a microbiota do solo, gerando um habitat desfavorável para produção vegetal e que favorece o surgimento de pragas e doenças. Visto essas mazelas e à proporção que elas vêm ganhando ao longo do tempo ao redor do mundo, os bioestimulantes aparecem como um aliado à produção vegetal e a garantia de uma produção sustentável que pode aprimorar a produtividade.

As macroalgas que vem se expandindo nos litorais do Brasil, com a maricultura mostrando aumento de mais de 50% nos últimos anos, são candidatas ideais a compor bioestimulantes de alto valor, devido a sua disponibilidade e alta capacidade de produção nacional (YUNUS et al., 2023). A macroalga *Kappaphycus alvarezii* possui potencial para os vegetais como bioestimulantes ao promover melhores colheitas, seja substituindo ou complementando os fertilizantes convencionais, devido sua riqueza e complexidade

biológica. Sua fabricação é tida como sustentável pela baixa emissão de carbono no processo (GHOSH et al., 2015), o que garante a geração de um produto adequado para o cenário atual. Os extratos de *K.alvarezii* e seus mecanismos de ação em plantas acontece de formas já conhecidas pela literatura; uma delas é a aplicação do puro extrato via foliar ou radicular, pureza essa que garante a integridade dos componentes bioativos da macroalga; a segunda forma é relacionada a pequenas concentrações aplicadas nos vegetais, o que promove potencial para o uso em diferentes culturas (VAGHELA et al., 2023).

Visto as potencialidade do uso de *K.alvarezii* e a necessidade de bioestimulantes no cenário mundial, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do uso radicular e foliar do extrato aquoso de *K.alvarezii* na modulação de plantas de *Oryza sativa* var. Nipponbare e seus respectivos genes de interesse, influenciando nos teores da biomassa modulados pela expressão dos mesmos após aplicação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Uma biomassa de 20 Kg de *Kappaphycus alvarezii* fresca, crescida em condições naturais de atividades de algicultura na baía de Ilha Grande, Paraty-RJ, foi processada no Laboratório de Química Biológica do Solo do Departamento de Solos no Instituto de Agronomia. A alga fresca foi obtida em parceria com o Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia Bioquímica - Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As amostras da macroalga foram congeladas em -20°C durante três dias, em seguida foram descongeladas, havendo extravasamento do conteúdo intracelular, que em seguida foi filtrado em papel de filtro Whatman No.2. Este processo produziu o sobrenadante, que consiste na seiva de *Kappaphycus alvarezii* (K-sap).

A espécie utilizada no estudo foi o arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade Nipponbare. O experimento foi realizado em uma casa de vegetação climatizada na condição de: 70% de UR e temperatura de 26 °C. As sementes de arroz foram desinfestadas antes da germinação com hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, as sementes foram colocadas em potes com gaze que continham água destilada. Dois dias após a germinação (DAG) das sementes, as plântulas receberam uma solução de Hoagland modificada a 1/8 da força iônica (F.I) total. Após quatro dias foi trocada a solução de Hoagland para 1/4 da F.I total. Três dias após a última troca de solução, as plantas foram transplantadas para potes de 0,7L contendo solução de Hoagland a 1/4 F.I total. Três dias após o transplântio houve a troca de solução para 1/2 F.I total, sendo renovada a cada três dias até o momento da coleta. Todas as soluções preparadas tinham como fonte de nitrogênio  $N-NO_3^-$  a 2mM e pH ajustado a 5,6.

A aplicação dos tratamentos contendo K-sap por diferentes vias e doses ocorreu aos 21 e 24 DAG. As doses utilizadas foram selecionadas de acordo com resultados obtidos previamente de acordo com o interesse do estudo. Foram adotados quatro tratamentos:

controle, K-sapR2% (aplicação via radicular na dose de 2% preparada em solução nutritiva), K-sapF2% (aplicação via foliar na dose de 2%) e K-sapF10% (aplicação via foliar na dose de 10%). Para a pulverização foliar, foi aplicado um volume diretamente nas folhas até atingir o ponto de gotejo, sendo de 8 mL (primeira aplicação) e 10 mL (segunda aplicação) por unidade experimental. A coleta ocorreu aos 27 DAG, às 144 horas após o início dos tratamentos. Os delineamentos experimentais adotados foram inteiramente casualizados. As análises estatísticas serão realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5. Os testes de médias serão feitos por tukey ( $p < 0,05$ ), e os gráficos serão elaborados no programa Sigmaplot 12.0.

Com a finalidade de obter a fração N-nitrato foi realizada a extração alcoólica e partição com clorofórmio de 1 grama de material vegetal de acordo com (FERNANDES, 1984). A determinação dos teores de N-nitrato foi realizada segundo (MIRANDA et al., 2001).

A extração de RNA total foi feita usando o tampão NTES (0.2 mM Tris-HCl pH 8.0; 25 mM EDTA pH 8.0; 0.3 mM NaCl; 2% SDS). A quantificação do RNA total foi realizada com o Nanodrop (Thermo Scientific) e a qualidade foi verificada por meio da razão A260/230 e A260/A280 e visualização em gel de agarose a 1%. Em seguida, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Life Technologies) e o cDNA foi sintetizado com TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Inc.) e oligo dT primer de acordo com as recomendações dos fabricantes. qRT-PCR foi realizada no StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) usando o SYBR Green PCR Master Mix™ kit (Applied Biosystems, Inc.). *OseEf* foi utilizado como controle endógeno.

Tabela 1: Sequências de nucleotídeos (5' a 3') usadas para amplificar os scripts de cDNA na análise quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Par de Primer	Sequências de nucleotídeos (5' a 3')	Forward / Reverse
OsNRT 1.1	AGGGGGTACGTCTACAAGGA	Forward
OsNRT 1.1	AGCTTGCGTATGTCATGCTG	Reverse
OsGS 1.2	TCCTCGAGAGGGTCCACAGAG	Forward
OsGS 1.2	GAGCTTGTCGATCGCCTTCT	Reverse
OsGS 2	AGGCGAAGGGAAAAGGCTAC	Forward
OsGS 2	GAGGGTTGGCTCCCAAAGAA	Reverse

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a expressão relativa de genes que codificam para transportadores relacionadas ao metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz após aplicação dos diferentes tratamentos com K-sap via foliar e radicular. A expressão do gene que codifica para o transportador *OsNRT1.1*, que está relacionado a um transportador de  $\text{NO}_3^-$  de baixa

afinidade, foi estimulada, embora não significativamente, nas raízes quando aplicado o  $K_{Alv}$ -sap via foliar em relação ao controle. A aplicação radicular de  $K_{Alv}$ -sap ocasionou supressão significativa da expressão do transportador *OsNRT1.1* em raízes quando comparado ao controle. Nas folhas, a aplicação foliar de  $K_{Alv}$ -sap em ambas as concentrações (2% e 10%) aumentou significativamente a expressão de *OsNRT1.1* quando comparado ao controle (Figura 1A).

A expressão do gene da glutamina sintetase citosólica *OsGS1.2* mostrou uma superexpressão quando aplicado o  $K_{Alv}$ -sap tanto foliar como radicular. Especialmente, o tratamento via radicular a 2% estimulou significativamente a expressão do *OsGS1.2* em até 4 vezes quando comparado ao controle (Figura 1B), por outro lado, a expressão dos genes *OsGS2* mostrou supressão tanto para as aplicações foliares quanto radiculares, especialmente para as aplicações foliares, a resposta na diminuição da expressão foi estatisticamente diferente ao controle (Figura 1C). Ambos os genes codificam para isoformas de glutamina sintetase, estando envolvidos na assimilação de  $NH_4^+$ , porém o *OsGS1.2* é expresso exclusivamente nas raízes enquanto o *OsGS2* é expresso exclusivamente nas folhas.

Os resultados obtidos aqui mostram um envolvimento do metabolismo do N na ação de  $K_{Alv}$ -sap nas plantas de arroz, principalmente quando aplicados via radicular a 2%. A influência da aplicação de  $K_{Alv}$ -sap no metabolismo do N se confirma pela expressão nas raízes dos genes *OsGS1.2*, isto porque tais genes são chaves para a assimilação de íons  $NH_4^+$  absorvidos pelas raízes, assim como participa no balanço adequado do metabolismo do N e do C (BAO et al., 2014).

A Figura 1D mostra os valores de concentração de  $N-NO_3^-$  em raízes, bainhas e folhas de plantas de arroz após aplicação dos diferentes tratamentos com K-sap via foliar e radicular. Nas raízes e nas bainhas das plantas, a aplicação radicular de  $K_{Alv}$ -sap 2%, promoveu uma redução significativa de  $N-NO_3^-$  enquanto a aplicação de  $K_{Alv}$ -sap via foliar aumentou significativamente a concentração de  $NO_3^-$ . Nas folhas, os teores de  $N-NO_3^-$  não mostraram diferenças estatísticas entre os tratamentos e com relação ao controle.

Estes resultados indicam que a aplicação de  $K_{Alv}$ -sap regula o metabolismo do N nas plantas. Aos 27 dias, as aplicações de  $K_{Alv}$ -sap estimulam a absorção de  $N-NO_3^-$  via transportador *OsNRT1.1*, um transportador de baixa afinidade (FAN et al., 2015). Este resultado é importante porque há relatos sobre o transportador *OsNRT1.1* como centro de processo de sinalização nas plantas, regulador do crescimento radicular e como transportador de auxinas. A regulação no metabolismo de N ainda se confirma pelo aumento da expressão de *OsGS1.2*, gene que codifica para GS citosólica, envolvida na assimilação primária de  $NH_4^+$  na raiz, e isto coincidiu com o aumento de N-amino formado nos tecidos das raízes e folhas, principalmente para o tratamento de aplicação foliar de 2%.

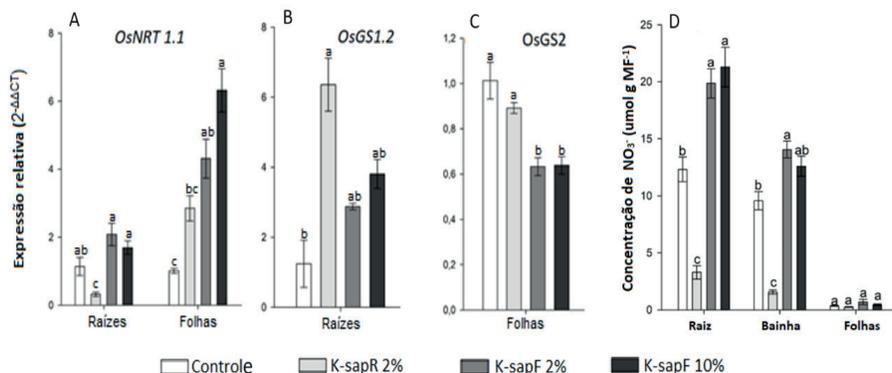


Figura 1: Expressão dos genes após aplicação dos respectivos tratamentos A- *OsNRT 1.1* radicular e foliar, B- *OsGS1.2* radicular, C- *OsGS2* foliar. D- Teores de Nitrato na bainha, folha e raiz após os respectivos tratamentos.

## CONCLUSÕES

Os resultados foram à contento ao objetivo do estudo e evidenciaram a modulação de 3 diferentes genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio. Os respectivos teores de nitrato variaram em diferentes regiões da planta, conforme os tratamentos de K-sap seja radicular ou foliar indicando a modulação pela expressão gênica. A aplicação radicular de K-sap reduziu os teores de  $\text{N-NO}_3^-$  radicular e na expressão do transportador de nitrato *OsNRT1.1* além de estimular a expressão de *OsGS1.2* que é responsável pela assimilação do mesmo. Por outro lado, a aplicação foliar estimulou positivamente o transportador *OsNRT1.1* e direcionando o nitrato para raízes e bainhas. Os resultados abrem horizontes para novos estudos e compreensão do funcionamento de bioestimulantes de *K.alvarezzi*, que pode ser um grande aliado para incremento na produção agrícola a nível global.

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Química Biológica do Solo e o Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, ao Departamento de Solos, ao PPGA-CS, ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos - Departamento de Engenharia Bioquímica da UFRJ e às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPERJ.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAO, A.; ZHAO, Z.; DING, G.; SHI, L.; XU, F.; CAI, H. Accumulated expression level of cytosolic glutamine synthetase 1 gene (*OsGS1;1* or *OsGS1;2*) alter plant development and the carbon-nitrogen metabolic status in rice. **PLoS One**, v. 9, e95581, 2014.

FAN, X.; FENG, H.; TAN, Y.; XU, Y.; MIAO, Q.; XU, G. A. putative 6-transmembrane nitrate transporter *OsNRT1.1b* plays a key role in rice under low nitrogen. **J. Integr. Plant Biol.**, v. 58, p. 590–599, 2015.

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

GHOSH, A.; ANAND, K. G. V.; SETH, A. Life cycle impact assessment of seaweed based biostimulant production from onshore cultivated *Kappaphycus alvarezii* (Doty) doty ex silva—Is it environmentally sustainable? **Algal Res.**, v. 12, p. 513–521, 2015.

MIRANDA, K.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric oxide: biology and chemistry. **Official journal of the Nitric Oxide Society** v. 5, p. 62–71, 2001.

VAGHELA, P.; TRIVEDI, K.; ANAND, K. G. V.; BRAHMBHATT, H.; NAYAK, J.; KHANDHEDIYA, K.; PRASAD, K.; MORADIYA, K.; KUBAVAT, D.; KONWAR, L.J.; VEERAGURUNATHAN, V.; GRACE, P. G.; GHOSH, A. **Scientific basis for the use of minimally processed homogenates of *Kappaphycus alvarezii* (red) and *Sargassum wightii* (brown) seaweed**, 2023.

YUNUS, M. U., SILAS, K., YAUMI, A. L. , & KWAJI, B. H. . (2023). Development of Biofertilizer from Locally Sourced Materials. **Indonesian Journal of Innovation and Applied Sciences (IJIAS)**, 3(1),51-60.<https://doi.org/10.47540/ijias>. v. 3, n1, 2023.