

# DANOS CELULARES EM PLANTAS DE ARROZ EM FUNÇÃO DA COMPETIÇÃO COM ARROZ-VERMELHO

Marcos André Nohatto<sup>1</sup>, Ana Claudia Langaro<sup>2</sup>, Dirceu Agostinetto<sup>3</sup>, Willian Borges Domingues<sup>4</sup>, Camila Tarouco<sup>1</sup>, Luis Antonio de Avila<sup>3</sup>

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., estresse, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, habilidade competitiva.

## INTRODUÇÃO

O arroz-vermelho (*Oryza sativa* L.) é considerado a principal planta daninha do arroz irrigado (AGOSTINETTO et al., 2001). A competição individual dessas plantas causou reduções na produtividade do arroz entre 100 e 755 kg ha<sup>-1</sup> (OTTIS et al., 2005), sendo que os danos decorrentes da competição variam com o nível de infestação, condições edafoclimáticas, características da cultivar, período de convivência com a cultura e biótipo encontrado na área (AGOSTINETTO et al., 2001; FLECK et al., 2008). Além disso, podem ocorrer prejuízos variáveis e de difícil quantificação como acamamento (MARCHEZAN, 1994), elevação do custo de produção, depreciação do valor comercial das áreas de cultivo (MENEZES & SILVA, 1998) e cruzamento com o arroz cultivado (SHIVRAIN et al., 2008), inviabilizando o uso da tecnologia Clearfield™.

Apesar dessas evidências, poucos estudos têm avaliado a resposta celular ao estresse decorrente da competição. Recentemente, verificou-se que a presença de plantas daninhas causou acúmulo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na primeira folha e tecidos radiculares em plantas de milho (AFIFI & SWANTON, 2012). Além disso, também há relato da baixa expressão de genes envolvidos na remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em competição com *Brassica napus* L. e *Abutilon theophrasti* Medik. (MORILES et al., 2012). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode atuar como molécula altamente reativa e tóxica capaz de levar a destruição oxidativa das células e/ou como sinalizador na regulação do crescimento e desenvolvimento de células, proliferação celular, resposta ao estresse celular e a transdução de sinal (MITTLER et al., 2004).

Outra forma de avaliar o estresse celular tem sido pela peroxidação lipídica, através das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), via acúmulo de aldeído malônico (MDA). Estudos avaliando a competição entre arroz e capim-arroz (*Echinochloa* sp.) (LANGARO et al., 2011) ou entre soja e *Lolium multiflorum* L. (OLIVEIRA, 2013), demonstram a possibilidade da utilização da metodologia para detectar o estresse oxidativo originado através da competição entre plantas. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TBARS em plantas de arroz e arroz-vermelho sob competição.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no município de Capão do Leão - RS, na estação de cultivo 2011/12, em delineamento experimental completamente casualizado, com seis repetições. As unidades experimentais foram vasos plásticos com capacidade volumétrica de 4 L, preenchidos com solo oriundo de lavoura orizícola.

O experimento foi instalado em série de substituição incluindo diferentes combinações da cultivar de arroz IRGA 424 e de biótipo de arroz-vermelho, variando-se as proporções relativas de plantas por vaso de 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100 (32:0, 24:8, 16:16, 8:24 e 0:32), com manutenção da população total de 32 plantas por vaso, equivalente a 1.143 plantas m<sup>-2</sup>, determinada em experimento de monocultivo (dados não mostrados).

<sup>1</sup>Eng. Agr. Doutorando (a) em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, s/n - CP 354 CEP 96010-900 - Pelotas - RS - Brasil, marcosnohato@hotmail.com.

<sup>2</sup>Eng. Agr. Mestranda do Programa de Pós Graduação em Fitossanidade, UFPel.

<sup>3</sup>Eng. Agr. Professor Adjunto do Programa de Pós Graduação em Fitossanidade, UFPel.

<sup>4</sup>Graduando em Ciências Biológicas, UFPel.

Aos 30 dias após a emergência (DAE) foram realizadas coletas da parte aérea do arroz e arroz-vermelho, sendo armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da determinação do teor de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), conforme descrito por Sergier et al., (1997); e, das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), via acúmulo de aldeído malônico (MDA), conforme descrito por Heath & Packer (1968), com modificações. Para proceder-se as análises foram macerados 0,2 g de folhas com nitrogênio líquido, homogeneizados em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos. Para a quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , adicionaram-se alíquotas de 0,2 mL do sobrenadante em 0,8 mL de tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio 1M. A solução foi deixada em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, sendo a absorbância lida a 390 nm. A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinada através de curva padrão e expressa em mM/g.

Para determinar TBARS, alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v) e ácido tricloroacético 10% (m/v) e incubadas a  $90^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos e a absorbância lida a 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. Calculou-se a concentração de MDA utilizando-se o coeficiente de absorvidade de  $155 \text{ mM cm}^{-1}$ , sendo os resultados em nM MDA  $\text{g}^{-1}$  de MF.

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua normalidade (teste de Shapiro Wilk) e, posteriormente submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Os efeitos das proporções em relação ao monocultivo (testemunha) foram avaliados pelo teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ) e entre as proporções em mistura pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), separadamente em relação ao arroz e arroz-vermelho.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no arroz, em competição com o arroz-vermelho, apresentou maior valor na proporção 25:75, em relação à testemunha. Essa proporção também apresentou aumento nos teores da variável, comparativamente às demais, quando analisado o efeito da competição interespecífica (Tabela 1). Esses resultados indicam que a presença do arroz-vermelho nas proporções, pode aumentar o teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na cultura, apresentando maiores valores do que a competição intraespecífica.

**Tabela 1.** Teor de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (mM/g) de plantas de arroz e arroz-vermelho, em função de quatro proporções de séries substitutivas avaliadas aos 30 dias após a emergência (DAE). FAEM/UFPEl, Capão do Leão/RS, 2011/12.

Proporção de plantas (arroz:arroz-vermelho)	Arroz
100:0 (T)	0,95
75:25	<sup>1</sup> b 0,94 ns
50:50	b 0,97 ns
25:75	a 1,22 *
Arroz-vermelho	
0:100 (T)	0,59
25:75	a 0,55 ns
50:50	a 0,42 *
75:25	a 0,39 *

\* ou <sup>ns</sup> média difere ou não da testemunha (T), na coluna, pelo teste Dunnett ( $p \leq 0,05$ ). <sup>1</sup>Médias antecedidas por mesmas letras na coluna, em presença dos competidores, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Estudos demonstram que o arroz-vermelho apresentou maior habilidade competitiva em relação ao arroz cultivado na avaliação de variáveis morfológicas (FLECK et al., 2008; DAI et al., 2013). Dessa forma, acredita-se que essa superioridade no processo competitivo, pode desequilibrar a formação de espécies reativas de oxigênio, aumentando a presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A maneira como esse fenômeno ocorre ainda permanece desconhecido, mas sabe-se que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode inibir a síntese de proteínas do fotossistema II (TAKAHASHI & MURATA, 2008), apresentar correlação negativa com a atividade da enzima rubisco (ZHOU et al.,

2007) e causar danos sobre lipídios e demais componentes como ácidos nucleicos, essenciais para a atividade e integridade da célula (MITTLER et al., 2004), sugerindo que tais eventos também sejam acionados durante a competição.

Para o arroz-vermelho em competição com o arroz cultivado, o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentou menor valor nas proporções 50:50 e 75:25 em comparação ao monocultivo da daninha. Ainda, não se observaram diferenças entre as proporções de plantas com presença do competidor (Tabela 1). Tais resultados demonstram que as maiores proporções de plantas de arroz cultivado na associação com o arroz-vermelho diminuem os teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na daninha, ou seja, a competição intraespecífica na daninha tem maior capacidade de causar dano celular do que a competição interespecífica com o arroz.

Quanto a variável TBARS, o arroz competindo com o arroz-vermelho apresentou maior valor na proporção 25:75 em comparação ao monocultivo da cultura (Tabela 2). Para a análise da competição interespecífica, a maior proporção de arroz cultivado mostrou menor valor em relação a menor proporção, corroborando com os resultados observados para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e demonstrando que a competição do arroz com a maior população da daninha provocou estresse oxidativo na cultura. Possivelmente, na menor proporção de plantas de arroz-vermelho, a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzida no arroz não alterou o estado redox nas células, a ponto de resultar no estresse oxidativo. Porém, não se descarta que devido à dupla função do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, essa molécula tenha desempenhado função na transdução do sinal para ativar mecanismos de defesa da planta contra competição.

**Tabela 2.** Teor de TBARS (nM MDA g<sup>-1</sup> de MF) de plantas de arroz e arroz-vermelho, em função de quatro proporções de séries substitutivas avaliadas aos 30 dias após a emergência (DAE). FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011/12.

Proporção de plantas (arroz:arroz-vermelho)	Arroz	
100:0 (T)	8,76	
75:25	<sup>1</sup> b 8,47	ns
50:50	ab 10,28	ns
25:75	a 13,23	*
	Arroz-vermelho	
0:100 (T)	8,77	
25:75	a 7,89	ns
50:50	a 7,93	ns
75:25	a 6,68	*

\* ou <sup>ns</sup> média difere ou não da testemunha (T), na coluna, pelo teste Dunnett (p≤0,05). <sup>1</sup>Médias antecedidas por mesmas letras na coluna, em presença dos competidores, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Estudos demonstram que a utilização de baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode aumentar a tolerância das plantas frente ao estresse (PRASAD et al., 1994; FADZILLA et al., 1997) devido mecanismos como a indução da expressão de genes de defesa, incluindo proteínas de choque térmico (VANDENABEELE et al. 2003). Além do envolvimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ativação de MAPKs (proteína quinase ativada por mitógeno) que modulam a expressão gênica e traduzem estímulo extracelular em resposta intracelular (KOVITUN et al. 2000).

Para o arroz-vermelho competindo com o arroz cultivado, a variável TBARS apresentou menor valor na proporção 75:25 em relação ao monocultivo da daninha. Já, para a análise da competição interespecífica, não se observaram diferenças entre as proporções de plantas com presença do competidor (Tabela 1). Esses resultados mostram que a diminuição da TBARS foi decorrente do maior número de plantas de arroz na proporção, reforçando a menor habilidade do arroz em causar dano celular sobre o arroz-vermelho.

## CONCLUSÃO

A maior proporção de plantas de arroz-vermelho na associação com o arroz cultivado aumenta o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TBARS na cultura, enquanto que a maior proporção de arroz cultivado na associação com o arroz-vermelho reduz o teor das variáveis na planta daninha.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFIFI, M.; SWANTON, C. Early physiological mechanisms of weed competition. **Weed Science**, v.60, n.4, p.542-551, 2012.
- AGOSTINETTO, D. et al. Arroz vermelho: ecofisiologia e estratégias de controle. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.341-349, 2001.
- DAI, L. et al. A comparative study of competitiveness between different genotypes of weedy rice (*Oryza sativa*) and cultivated rice. **Pest Management Science**. 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.3534/pdf>. Acesso em: 17 maio 2013.
- FADZILLA, N.M. et al. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.2, p.325-331, 1997.
- FLECK, N.G. et al. Competitividade relativa entre cultivares de arroz irrigado e biótipo de arroz-vermelho. **Planta Daninha**, v.26, n.1, p.101-111, 2008.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.189-198, 1968.
- KOVTUN, Y. et al. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.6, p.2940-2945, 2000.
- LANGARO, A.C. et al. Danos celulares em plantas de arroz e capim-arroz cultivadas sob condições de competição. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 7, Balneário Camboriú, SC. **Anais...** Itajaí, 2011, p.423-426.
- MARCHEZAN, E. Arroz vermelho: Caracterização, prejuízos e controle. **Ciência Rural**, v.24, n.2, p.415-421, 1994.
- MENEZES, V.G.; SILVA, P.R.F. Manejo de arroz-vermelho através do tipo e arranjo de plantas em arroz irrigado. **Planta Daninha**, v.16, n.1, p.45-57, 1998.
- MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, v.9, n.10, p.490-498, 2004.
- MORILES, J.C. et al. Microarray and growth analyses identify differences and similarities of early corn response to weeds, shade, and nitrogen stresses. **Weed Science**, v.60, n.2, p.158-166, 2012.
- OLIVEIRA, C. **Mudanças morfofisiológicas e metabólicas em biótipos de azevém, suscetível e resistente a glyphosate, em competição com soja**. 2013. 81f. Dissertação (Mestrado em fitossanidade) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- OTTIS, B.V. et al. Rice yield and quality as affected by cultivar and red rice (*Oryza sativa*) density. **Weed Science**, v.53, n.4, p.499-504, 2005.
- PRASAD, M.D. et al. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**, v.6, n.1, p.65-74, 1994.
- SERGIER, I. et al. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plant. **Comptes Rendus de Academie Bulgare des Sciences**, v.51, n.3, p.121-124, 1997.
- SHIVRAIN, V.K. et al. Maximum outcrossing rate and genetic compatibility between red rice (*Oryza sativa*) biotypes and Clearfield™ rice. **Weed Science**, v.56, n.6, p.807-813, 2008.
- TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environment stresses accelerate photoinhibition? **Trends Plant Science**, v.13, n.4, p.178-182, 2008.
- VANDENABEELE, S. et al. A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.26, p.16113-16118, 2003.
- ZHOU, Y.H. et al. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.5, p.1207-1217, 2007.