

GREGGAINS, V.; FINCH-SAVAGE, W.E.; QUICK, W.P.; ATHERTON, N.M. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, v.148, p.267-276, 2000.

GIBSON, K.D.; FISCHER, A.J. Relative growth and photosynthetic response of water-seeded rice and *Echinochloa oryzoides* (Ard.) Fritsch to shade. **International Journal of Pest Management**, v.47, p.305-309, 2001.

GUO, T.R.; ZHANG, G.P.; ZHOU, M.X.; WU, F.B.; CHEN, J.X. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. **Plant and Soil**, v.258, p.241–248, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. 1985. **Lipid peroxidation a radical chain reaction**. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, pp. 139±205.

HAKANSSON, S. 2003. **Weeds and Weed Management on Arable Land—An Ecological Approach**. Wallingford, UK: CABI. 288 p.

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.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acidreactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v.9, p.515-540, 1990.

LOVELACE, M.L.; TALBERT, R.E.; DILDAY, R.H.; SCHERDER, E.F.; BUEHRING, N.W. 2001. **Use of allelopathic rice with reduced herbicide rates for control of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*)**. Pages 75–88 in R. J. Norman and J.-F. Meullenet, eds., B.R. Wells Arkansas Rice Research Studies-2000. Research Series 485. Fayetteville, AR: University of Arkansas Agricultural Experiment Station.

SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Water Stress Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.): Variations in Hydrogen Peroxide Accumulation and Antioxidant Activity in Tolerant and Susceptible Genotypes. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.186, p.63-70, 2001.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI). **Arroz Irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Bento Gonçalves, RS: SOSBAI, 188p. 2010.

TIAN, X.R.; LEI, Y.B. Physiological responses of wheat seedlings to drought and UV-B radiation. Effect of exogenous sodium nitroprusside application. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.54, n.5, p.676-682, 2007.

VIDA, F.B.P.; FISCHER, A.J.; LACA, E.; FERNANDEZ, G.; MACKILL, D. Relating rice traits to weed competitiveness and yield using path analysis. **Weed Science**, v.54, n.6, p.1122-1131, 2006.

VICK, B.A.; ZIMMERMAN, D.C., 1987. **Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipooxygenase pathway**. In: Stumpf, P.K. (Ed.), *The Biochemistry of Plants, Lipids: Structure and Function*, 9th ed. Academic Press, New York, pp. 54±89.

YIN, X.L.; JIANG, L.; SONG, N.H.; YANG, H. Toxic Reactivity of wheat (*Triticum aestivum*) plants to herbicide isoproturon. **Journal of Agronomy and Food Chemistry**, v.56, n.12, 2008.

YU, L.W.; LATRIANO, L.; DUNCAN, S.; HARTWICK, R.; WITY, G. High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans-trans-muconaldehyde. **Analytical Biochemistry**, v.156, p.326-333, 1986.

ZHANG, H.; ZHANG, S.; MENG, Q.; ZOU, J.; JIANG, W.; LIU, D. Effects of aluminum on nucleoli in root tip cells, root growth and the antioxidant defense system in *Vicia faba* L. **Acta Biologica Cracoviensis, Series Botanica**, v.51, n.2, p.99-106, 2009.

ZHOU, Z.S.; HUANG, S.Q.; GUO, K.; MEHTA, S.K.; ZHANG, P.C.; YANG, Z.M. Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.101, p.1-9, 2007.

## ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL E DETERMINAÇÃO DO FLUXO GÊNICO ENTRE POPULAÇÕES DE ARROZ VERMELHO

Goulart, I.C.G.R.<sup>1</sup>; Kupas, V.<sup>2</sup>; Dias, L.P.<sup>2</sup>; Rosa, T.M.<sup>3</sup>; Borba, T.C.O.<sup>4</sup>; Menezes, V.G.<sup>5</sup>; Merotto Jr., A.<sup>6</sup>

Palavras-chave: fecundação cruzada; imidazolinonas; *Oryza sativa*, resistência.

### INTRODUÇÃO

Diversas populações de arroz vermelho foram identificadas como resistentes a herbicidas imidazolinonas no RS (MENEZES *et al.*, 2009). Aproximadamente 13% destas populações estudadas apresentaram mutações iguais às presentes nas cultivares PUITÁ (INTA CL e SATOR CL, e mais de 80% apresentaram a mesma mutação que a IRGA 422 CL (ROSO *et al.*, 2010). Estes resultados indicam a ocorrência de fluxo gênico entre cultivares de arroz resistentes às imidazolinonas e arroz vermelho nas lavouras do RS. Ainda, após introgrida em arroz vermelho, a resistência a herbicidas pode ser distribuída para outras populações por fluxo gênico através de eventos de migração como sementes contaminadas e em conjunto com máquinas e implementos. O fluxo gênico, também conhecido como migração, refere-se ao processo de troca de genes entre populações normalmente da mesma espécie, podendo, porém, ocorrer entre espécies muito próximas filogeneticamente. A rápida evolução da resistência de arroz vermelho às imidazolinonas pode ser explicada não somente pelo fluxo gênico de pólen entre plantas resistentes e suscetíveis, mas também pelo fluxo de sementes de arroz vermelho resistente entre lavouras. A predominância de autogamia no gênero *Oryza* determina que o fluxo gênico seja comumente restrito, e que ocorra alta diversidade genética entre populações geograficamente ou ecologicamente distantes. Apesar do problema que o arroz vermelho representa para a cultura do arroz no Brasil, o conhecimento de sua diversidade genética no Brasil ainda é limitado. Ainda, não existem estudos relacionados à estrutura populacional de arroz vermelho que indiquem os parâmetros genéticos de migração na região Sul do Brasil. Entretanto, diversos marcadores moleculares utilizados para o arroz cultivado tem sido utilizados para caracterização genética do arroz vermelho em vários outros locais (CAO *et al.*, 2006), e representam uma ferramenta de fácil utilização. A determinação das práticas de prevenção a ocorrência de arroz vermelho resistente a herbicidas necessita do efetivo conhecimento da ocorrência de fluxo gênico entre populações para que recomendações específicas e efetivas em função da magnitude da ocorrência de eventos de migração e da diversidade genética de arroz vermelho. O objetivo do trabalho foi caracterizar geneticamente populações de arroz vermelho do RS com suspeita de resistência aos herbicidas imidazolinonas e elucidar aspectos relacionados ao fluxo gênico de sementes entre diferentes locais.

### MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA Arroz e Feijão. Foram utilizadas 27 populações de arroz vermelho RS coletadas na safra 2009/2010 (Figura 1). Cada população foi composta de 20 panículas de 20 plantas distintas. As coletas foram realizadas em lavouras de arroz com suspeita de ocorrência de arroz vermelho resistente aos herbicidas imazethapyr e imazapic. As populações de arroz vermelho foram fenotipadas quanto à resistência ao herbicida imazethapyr. Foram utilizados 24 marcadores moleculares SSR organizados em quatro painéis conforme descrição apresentada em Borba *et al.* (2009). As PCRs foram conduzidas em um volume final de 5 µL contendo 3 ng

<sup>1</sup> Eng Agr, MSc, Depto de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, goulart@ufrgs.br

<sup>2</sup> Bolsista IC, Acadêmico da Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS.

<sup>3</sup> Bolsista IC - EMBRAPA Arroz e Feijão, acadêmica da Faculdade de Ciências Biológicas, UFG, Goiânia, GO.

<sup>4</sup> Eng Alim, Dr, EMBRAPA Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

<sup>5</sup> Eng Agr, MSc, Equipe de Agronomia, Instituto Riograndense do Arroz, IRGA, Cachoeirinha, RS.

<sup>6</sup> Eng Agr, PhD, Depto de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, merotto@ufrgs.br

de DNA; concentrações otimizadas de cada par de iniciadores forward e reverse (BORBA *et al.*, 2009); 2,5 µL de Master Mix (QIAGEN) e 0,5 µL de Qsolution (QIAGEN). Os fragmentos foram analisados em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

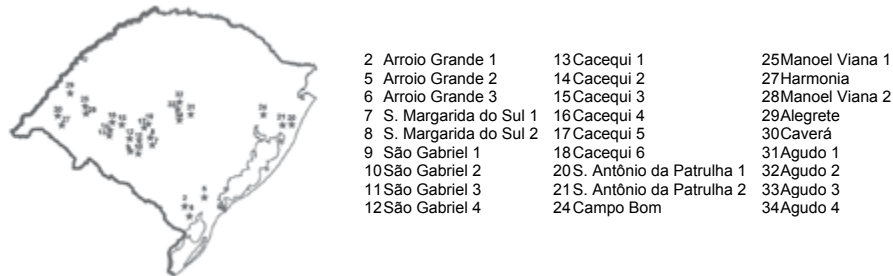


Figura 1. Origem geográfica de 27 populações de arroz vermelho coletadas no RS.

Foi estimado para cada população e para cada marcador SSR o número médio de alelos, a heterozigosidade esperada, a heterozigosidade observada e o conteúdo de informação polimórfica (PIC), o coeficiente de endogamia e a matriz de distâncias genéticas de Nei. Foi construída a partir da matriz de distâncias genéticas das populações um dendrograma baseado no método UPGMA. Com o objetivo de visualizar a relação genética entre os indivíduos componentes de cada população, foi obtida a matriz de distâncias genéticas de Nei entre pares de indivíduos. A partir desta matriz foi realizada a análise de componentes principais (ACP). Para a determinação da correlação entre a distância genética e a distância geográfica das populações de arroz vermelho foi realizado o teste de Mantel. Os dados foram submetidos à análise da variância molecular (AMOVA) pelo software Arlequin 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). A presença de estruturação entre as 27 populações de arroz vermelho foi determinada pelo software STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que as populações de arroz vermelho do RS apresentam diversidade genética relativamente alta entre os indivíduos, embora exista considerável variação entre estas populações, na média dos indivíduos. Neste sentido a AMOVA indicou que a variação genética dos 534 acessos de arroz vermelho avaliados foi de 26% entre populações e de 74% dentro das populações (Tabela 1). Assim, o valor de  $F_{ST}$  obtido pela AMOVA foi de 0,26. Isto indica que a variabilidade genética nas populações de arroz vermelho está relacionada, sobretudo, à diversidade dentro de cada população em comparação com a variabilidade entre populações.

Tabela 1. Análise de variância molecular (AMOVA) das 27 populações de arroz vermelho baseada na análise de 24 marcadores SSR e fluxo gênico (Nm).

Fonte da Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem de Variação	Valor P
Entre Populações	26	5016,686	8,542	26%	0,001
Dentro de Populações	507	12171,576	24,007	74%	0,001
Total	533	17188,262	32,549		
Fluxo gênico (Nm = [(1 / $F_{ST}$ ) - 1] / 4)	0,7				

De forma geral, em populações naturais de espécies autógamas é esperada baixa diversidade genética devido ao alto grau de homozigose. Entretanto, em se tratando de populações advindas de áreas de cultivo, como o arroz vermelho, a diversidade dentro das populações pode ser mais elevada. Isso é possível devido à seleção imposta por práticas como o rouging, por exemplo. Isso resulta na seleção de indivíduos oriundos de fluxo

gênico com as cultivares que são fenotipicamente semelhantes às plantas cultivadas (CAO *et al.*, 2006). Além disso, a transferência de alelos de cultivares de arroz para populações de arroz vermelho através do fluxo gênico pode aumentar sua diversidade. O fluxo gênico entre lavouras aumenta igualmente a diversidade genética de populações (CAO *et al.*, 2006). A diferenciação genética, ilustrada pelo  $F_{ST}$  entre as populações de arroz vermelho no presente estudo é alta. Isto é devido provavelmente ao sistema de fecundação predominante no arroz vermelho que é a autogamia.

O resultado do teste de Mantel indicou que não há correlação ( $R^2=0,06$ ) entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas das populações de arroz vermelho. Da mesma forma, os resultados da ACP indicaram que os indivíduos foram agrupados em três grupos, havendo uma interface entre dois deles com alguns indivíduos localizados de forma intermediária (Figura 1A). As cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL foram agrupadas próximas entre si, enquanto que Sator CL, embora no mesmo grupo, apresentou certa distância das demais. Estes resultados foram semelhantes aos observados no dendrograma UPGMA (dados não apresentados). Diversos indivíduos de uma mesma população foram alocados em grupos diferentes (Figura 1A). Esses indivíduos podem ser originados de introduções de sementes de arroz vermelho contaminantes de arroz cultivado ou sementes de outras populações de arroz vermelho que foram eventualmente transportadas para os locais das respectivas coletas.

A análise da estrutura das populações (K=6) confirmou a ancestralidade comum entre as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL ao colocá-las juntas no grupo K1 (Figura 1C). A maior parte dos indivíduos de arroz vermelho pertenceu ao grupo K1 (Figura 1B). O agrupamento de população de arroz vermelho suscetível no mesmo grupo K das cultivares resistentes a imidazolinonas indica que tais populações sofreram fluxo gênico anterior à utilização destas. Esse fluxo gênico provavelmente ocorreu a partir da cultivar IRGA 417, e não com as cultivares IRGA 422 CL ou PUITÁ INTA CL. Em diversos casos grupos diferentes foram atribuídos a indivíduos de uma mesma população (Figura 1B).

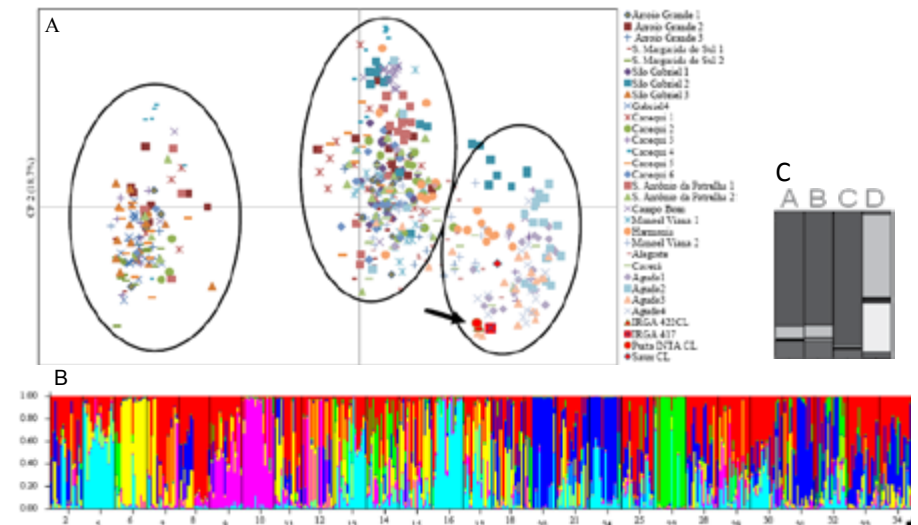


Figura 1. (1) Análise de componentes principais (ACP) de 27 populações de arroz vermelho do RS. A seta indica a posição das cultivares IRGA 417, IRGA 422CL e PUITÁ INTA CL. (2) Estrutura populacional obtida pela análise STRUCTURE. No detalhe (3), A, B, C e D representam IRGA 417, IRGA 422CL, PUITÁ INTA CL e SATOR CL, respectivamente. A numeração das populações corresponde àquelas listadas na Tabela 1.

Isso prova a ocorrência do fluxo de sementes de arroz vermelho entre lavouras de arroz, tanto suscetíveis como resistentes às imidazolinonas. Além disso, as populações suscetíveis encontradas neste estudo são geneticamente distintas das populações resistentes.

O método utilizado no presente estudo foi mais informativo que os utilizados anteriormente no Brasil, sobretudo em se tratando da resistência de arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas. As populações de arroz vermelho no País foram caracterizadas bioquímica e geneticamente (MALONE *et al.*, 2007) e morfológicamente (SCHWANKE *et al.*, 2008). No presente estudo, foram utilizada amostra de maior tamanho e marcadores mais informativos. Por outro lado, métodos semelhantes aos empregados no presente trabalho foram utilizados em populações de arroz vermelho de outros locais do mundo (CAO *et al.*, 2006; GEALY *et al.*, 2009; SHIVRAIN *et al.*, 2010). Entretanto, estes trabalhos não compararam geneticamente cultivares de arroz resistente a herbicidas com populações de arroz vermelho a fim de estudar a relação entre estas como apresentado no presente estudo. Os resultados do presente estudo indicam, por exemplo, baixa diversidade genética, como resultado de baixa ocorrência de migração de sementes nas populações 5, 6, 10, 16 e 27 (Figura 1c). Ainda, observa-se que na população 27 dois indivíduos apresentam alta variabilidade genética em relação aos demais integrantes da população. Estes indivíduos possivelmente representam contaminantes de sementes que foram introduzidos recentemente na população (Figura 1c).

## CONCLUSÕES

Os resultados observados confirmam a ocorrência da origem da resistência a herbicidas em arroz vermelho devida, sobretudo ao fluxo gênico de sementes e pólen. No entanto, populações geneticamente isoladas também foram identificadas. O sistema de análise da estrutura de populações utilizados neste estudo possibilita a identificação do isolamento genético e da intensidade de fluxo gênico em populações de arroz vermelho como ferramenta para o diagnóstico específico de populações que apresentaram aporte de sementes contaminadas de arroz vermelho, e também para o diagnóstico regional da maior importância do fluxo gênico em detrimento de processos independentes em relação a origem da resistência a herbicidas em arroz vermelho.

## REFERÊNCIAS

- BORBA, T. C. O., *et al.* Microsatellite marker-mediated analysis of the EMBRAPA Rice Core Collection genetic diversity. *Genetica*, v. 137, n. 3, p. 293-304, 2009.
- CAO, Q., *et al.* Genetic Diversity and Origin of Weedy Rice (*Oryza sativa* f.) Populations Found in North-eastern China Revealed by Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Annals of Botany*, v. 98, n. 6, p. 1241-1252, 2006.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. e SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 1, n., p. 47-50, 2005.
- GEALY, D. R., AGRAMA, H. A. e EIZENGA, G. C. Exploring Genetic and Spatial Structure of US Weedy Red Rice (*Oryza sativa*) in Relation to Rice Relatives Worldwide. *Weed Science*, v. 57, n. 6, p. 627-643, 2009.
- MALONE, G., *et al.* Caracterização bioquímica e molecular de acessos de arroz vermelho coletados no estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 37, n. 2, p. 77-85, 2007.
- MENEZES, V. G., *et al.* Arroz-vermelho (*Oryza sativa*) resistente aos herbicidas imidazolinonas. *Planta Daninha*, v. 27, n., p. 1047-1052, 2009.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. e DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- ROSO, A. C., *et al.* Regional scale distribution of imidazolinone herbicide-resistant alleles in red rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. *Field Crops Research*, v. 119, n. 1, p. 175-182, 2010.
- SCHWANKE, A. M. L., *et al.* Caracterização morfológica de ecótipos de arroz daninho (*Oryza sativa*) provenientes de áreas de arroz irrigado. *Planta Daninha*, v. 26, n., p. 249-260, 2008.
- SHIVRAIN, V. K., *et al.* Genetic diversity of weedy red rice (*Oryza sativa*) in Arkansas, USA. *Weed Research*, v. 50, n. 4, p. 289-302, 2010.

## PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E DANOS CELULARES PELA APLICAÇÃO DE PROFOXYDIM NA CULTURA DO ARROZ

Ana Claudia Langaro<sup>1</sup>; Roberta Manica-Berto<sup>3</sup>; Marcos André Nohatto<sup>2</sup>; Franciele Mariani<sup>2</sup>; Rui Carlos Zambiasi<sup>4</sup>; Dirceu Agostinetto<sup>5</sup>

Palavras-chave: herbicida, estresse oxidativo, metabólitos secundários.

## INTRODUÇÃO

A utilização do herbicida profoxydim, inibidor da enzima acetil CoA carboxilase (AC-Case), para controle em pós-emergência de plantas daninhas na cultura do arroz irrigado tem apresentado problemas de fitotoxicidade na cultura. A utilização de herbicidas pode provocar nas plantas cultivadas o aumento da produção de radicais livres, especialmente espécies reativas de oxigênio (EROs) (MARTINEZ-CAYUELA, 1998). Conseqüentemente, tais moléculas altamente reativas irão reagir com os lipídios formadores das membranas, originando a peroxidação lipídica, que, além de formar novos radicais lipídicos, danificam irreversivelmente as membranas celulares (HESS, 2000; FLECK & VIDAL, 2001). A resposta direta do dano às membranas celulares pela peroxidação lipídica é o extravasamento do conteúdo celular para o meio que estiver envolvendo os tecidos danificados (KRUSE *et al.*, 2006), desestruturando diversos processos fisiológicos e metabólicos das plantas.

Para combater os danos provocados pelas EROs, as plantas desenvolveram dois mecanismos de proteção, um sistema antioxidante enzimático e outro não enzimático (MITTLER, 2002). No sistema antioxidante não enzimático está incluído a produção de compostos fenólicos, que são sintetizados pelas plantas em resposta a algum tipo de estresse (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992), como a utilização de herbicidas. Assim, a determinação dos compostos fenólicos, bem como a peroxidação e o extravasamento de eletrólitos constituem-se como ferramentas para a avaliação dos efeitos dos herbicidas em nível celular nas plantas, surgindo à possibilidade de utilizar tais variáveis para compreender o comportamento fitotóxico do herbicida profoxydim na cultura do arroz.

O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de compostos fenólicos e danos celulares devido à utilização do herbicida profoxydim na cultura do arroz.

## MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e laboratório na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel), em Capão do Leão-RS, no período de dezembro de 2010 a fevereiro de 2011. Os ensaios em casa de vegetação foram alocados em vasos plásticos com capacidade volumétrica de 8 L, preenchidos com solo oriundo de lavoura orizícola, peneirado e adubado conforme as recomendações para a cultura do arroz irrigado (SOSBAI, 2010). O delineamento experimental foi o completamente casualizado, com quatro repetições.

Para a etapa em casa de vegetação, foi realizada aplicação do herbicida profoxydim, na dose de 400 g i.a. ha<sup>-1</sup>, aos 30 dias após a semeadura. Para isso, utilizou-se

<sup>1</sup>Graduanda(o) em Agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPel, Bolsista Fapergs E-mail: namelia.langaro@gmail.com;

<sup>2</sup> Eng. Agr(a), Doutorando(a) do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade /FAEM/UFPel. E-mail: marcosnohato@hotmail.com; francielemariani@boll.com

<sup>3</sup>Eng. Agr., Dr. Pós-Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade /FAEM/UFPel. E-mail: robertamanica@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Químico Industrial, Dr. Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos/FAEM/UFPel. E-mail: zambiasi@gmail.com

<sup>5</sup> Eng. Agr., Dr. Professor do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade/FAEM/UFPel, bolsista em produtividade do CNPq. E-mail: dirceu\_agostinetto@ufpel.edu.br

pulverizador costal, pressurizado com CO<sub>2</sub>, munido com bicos tipo leque e pontas 110.015, e volume de calda equivalente a 150 L ha<sup>-1</sup>. Posteriormente, foram realizadas coletas da parte aérea das plantas aos 7 e 20 dias após a aplicação do tratamento (DAT), em plantas que receberam herbicida e do tratamento comparativo (controle), sem aplicação de herbicida. Após as coletas, as folhas foram armazenadas a -80°C até o momento da quantificação dos compostos fenólicos e dos danos celulares, via TBARS e por extravasamento de eletrólitos.

A determinação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com método descrito por Singleton & Rossi (1965), com modificações. Para a etapa de extração pesou-se 2 g de amostra triturada, diluiu-se em 20 mL de metanol, colocou-se em banho-maria a 25°C, durante 3 horas. Após este período, a amostra foi filtrada com algodão para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com metanol. Para a etapa de quantificação dos fenóis foi retirado 1 mL do extrato obtido e adicionado 10 mL de água ultra-pura e 0,5 mL de Folin-Ciocalteu 2N, deixando-se reagir por 3 minutos, e após foram adicionados 1,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20% (m/v), permanecendo no escuro por mais 2 horas. Realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 UV/Visível - Pharmacia Biotech) no comprimento de onda de 765 nm. Foi elaborada curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg GAE) por grama de matéria fresca (MF).

Os danos celulares nos tecidos das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foram determinados via acúmulo de aldeído malônico (MDA), conforme descrito por Health & Packer, 1968. Para isso, 0,2 g de folhas foram macerados com nitrogênio líquido e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 7830 rpm por 20 minutos. Aliquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v) em ácido tricloroacético 10% (m/v) e incubadas a 90°C por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos. A absorbância foi lida a 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e os resultados foram expressos em nM MDA g<sup>-1</sup> de matéria fresca.

Outra forma de avaliar os danos celulares foi através da permeabilidade relativa das membranas, determinada por meio do extravasamento de eletrólitos conforme descrito por Tarhanen et al. (1999). Para isso, 0,2 g de amostra foram triturados e lavados três vezes com água ultra-pura para a retirada do conteúdo das células rompidas durante o corte e de outros eletrólitos aderidos às folhas. Após este procedimento, as mesmas foram colocadas em 50 mL de água ultra-pura e deixadas por 6 horas em banho-maria a 25°C. Decorrido esse tempo, a condutância inicial (Ci) foi obtida utilizando-se um condutivímetro (Lutron, CD-4301). Posteriormente a essa leitura, as mesmas amostras foram colocadas em estufa a 90°C por 2 horas e feita a segunda leitura (Cf). O extravasamento de eletrólitos foi calculado pela relação  $Ci/(Ci+Cf) \times 100$  e o resultado foi expresso em percentagem.

Os dados foram analisados quanto a sua normalidade e homocedasticidade e, posteriormente, submetidos à análise de variância (p<0,05). Os efeitos das coletas foram comparados pelo teste de Tukey (p<0,05).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variável compostos fenólicos, verificou-se diferença entre as épocas de coleta após a aplicação do herbicida profoxydim (Tabela 1). Tais resultados possivelmente estão associados aos mecanismos de proteção das plantas ao herbicida, em especial ao sistema antioxidante não enzimático. Após a aplicação do herbicida, ocorreu a ativação das defesas químicas e bioquímicas da planta, aumentando o conteúdo desses compostos de metabolismo secundário.

Quanto a variável peroxidação, verificou-se aumento dos níveis de MDA ao longo do tempo, sendo mais pronunciado na segunda coleta das plantas (Tabela 1). Esses resultados devem-se ao aumento da produção das EROs após a aplicação do herbicida,

ocasionando danos nas estruturas dos ácidos graxos insaturados, presentes na composição das membranas biológicas das organelas celulares. Trabalho conduzido por Hassan & Alla (2005), também relatou aumento no conteúdo de MDA em plântulas de milho e feijão após a exposição das plantas a herbicidas inibidores do Fotossistema II, o que sugere que a formação dos sintomas de fitotoxicidade evidenciados na cultura do arroz são decorrentes dos danos provocados pelos herbicidas às membranas biológicas.

Com relação ao extravasamento de eletrólitos, ao contrário do que se esperava, não ocorreu aumento após a aplicação do herbicida (Tabela 1). A explicação para esse fato decorreria da possibilidade do herbicida não causar danos suficientes ao ponto de serem observados na análise de extravasamento celular.

Tabela 1 - Efeito do herbicida profoxydim em plantas de arroz no teor de fenóis totais, TBARS e extravasamento de eletrólitos, avaliado em duas épocas de coleta. UFPel, Capão do Leão - RS, 2011

Tratamento	Fenóis Totais (mg GAE g <sup>-1</sup> de MF)	Teores de TBARS (nM MDA g <sup>-1</sup> de MF)	Extravasamento de Eletrólitos (%)
Controle	20,75 b <sup>1/2</sup>	6,22 b	43,65 a
7 DAT <sup>2</sup>	22,47 b	6,78 b	43,21 a
20 DAT	36,51 a	18,59 a	43,45 a
CV (%)	11,66	18,11	5,69

<sup>1/2</sup> Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). <sup>2</sup> Dias após a aplicação do tratamento.

## CONCLUSÃO

O uso do herbicida profoxydim provoca distúrbios no metabolismo de plantas de arroz, devido à formação de radicais livres que afetam os níveis de peroxidação, aumentando a produção de compostos fenólicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores do fotossistema 2. In: VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. (Eds.). **Herbicidologia**, p.100-112, 2001.
- HASSAN, N.M.; ALLA, M.M.N. Oxidative stress in herbicide-treated broad bean and maize plants. **Acta physiologiae plantarum**, v.27, p.429-438, 2005.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.189-198, 1968.
- HESS, F.D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, v.48, p.160-170, 2000.
- KRUSE, N.D.; et al. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone. **Planta Daninha**, v.24, p.379-390, 2006.
- MARTINEZ-CAYUELA, M. Toxicidade de xenobióticos mediada por radicais livres de oxigênio. **Ars Pharmaceutica**, v.39, p.5-18, 1998.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.
- NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.369-89, 1992.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.
- SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI). **Arroz Irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Bento Gonçalves, RS: SOSBAI, 188p. 2010.
- TARHANEN, S. et al. Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. **Environmental Pollution**, v.104, p.121-129, 1999.