

MICHEL FILIPHY SILVA SANTOS

**AVALIAÇÕES MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS EM *Joannesia princeps*
VELL. (EUPHORBIACEAE) EXPOSTA AO OZÔNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S237a Santos, Michel Filiphy Silva, 1992-
2019 Avaliações morfoanatômicas e fisiológicas em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) exposta ao ozônio / Michel Filiphy Silva Santos. – Viçosa, MG, 2019.
x, 50 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luzimar Campos da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 42-50.

1. *Joannesia princeps* - Anatomia. 2. *Joannesia princeps* Efeito do ozônio atmosférico. 3. Microscopia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.69

MICHEL FILIPHY SILVA SANTOS

**AVALIAÇÕES MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS EM *Joannesia princeps*
VELL. (EUPHORBIACEAE) EXPOSTA AO OZÔNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 01 de março de 2019.



Silvia Ribeiro de Souza



Cléberson Ribeiro



Luzimar Campos da Silva
(Orientadora)

“Ninguém banha-se duas vezes no mesmo rio.”

Heráclito de Éfeso

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, por proporcionarem essa oportunidade.

À CNPq, FAPEMIG e CAPES, pela concessão da bolsa e pelo auxílio financeiro para realização de todo o projeto.

À Minha Orientadora, Luzimar, por aceitar o desafio de me orientar, pela paciência e pelos ensinamentos.

Aos Professores Cleberson Ribeiro e Silvia Ribeiro, pela orientação, presteza e ensinamentos.

À Professora Regina Moraes e a mestranda Marina, do Instituto de Botânica, pela ajuda com as análises no IRGA.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálises, pelos equipamentos para realização da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao laboratório de Anatomia Vegetal, em especial às técnicas Aurora e Rosana pela ajuda na realização de várias análises anatômicas.

Ao LABIAP e ao laboratório de Ecologia do Instituto de Botânica de SP, pela estrutura para realização dos experimentos.

Aos professores do PPG em Botânica da UFV, pelos ensinamentos nas disciplinas e ajuda diária para conclusão deste projeto.

Aos funcionários do DBV, pela boa convivência e pela ajuda que sempre facilita a nossa vida.

A todos do grupo de trabalho com poluentes, em especial à Iara, pelo trabalho conjunto e ao Daniel, pela parceria de sempre e todas as análises estatísticas.

Aos companheiros de CEPE, Júlia, Riva, Matheus e Rafa, onde tive as melhores e mais bem fundamentadas discussões.

A todos(as) os(as) amigos(as) de SP, tanto aqueles(as) do LABIAP, como os(as) do alojamento (monastério). Com vocês a estadia foi muito mais prazerosa.

Ao Miller e a Dani, que entraram comigo nessa jornada acadêmica e continuam até hoje. Compartilhamos vitórias, angústias e conhecimentos.

Aos amigos da república, onde encontrei paz e uma família botânica. Os dias são bem mais fáceis quando se tem um bom lar.

À Hira, por todo amor, carinho, dedicação e uma boa dose de debates educacionais.

Agradeço à minha família, meu pai Agnaldo, minha mãe Eliana e meu irmão Gabriel, que sempre me apoiaram, acreditaram em mim e não pouparam esforços para que eu pudesse estudar e chegar onde cheguei.

A todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a conclusão desse trabalho. Vocês são parte importante dessa história.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura e experimento	8
Figura 2: Ozonização ao longo do experimento	14
Figura 3: Crescimento relativo de <i>Joannesia princeps</i> exposta ao ozônio e a ar filtrado	26
Figura 4: Caracterização morfológica de <i>Joannesia princeps</i>	27
Figura 5: Sintomas foliares visíveis em <i>Joannesia princeps</i> exposta a 100ppb.h-1 de ozônio por 16 dias	28
Figura 6: Teores de clorofilas a e b, clorofilas totais e relação clorofila a/b em <i>Joannesia princeps</i> expostas ao ozônio e a ar filtrado	29
Figura 7: Teor de carotenoides em <i>Joannesia princeps</i> expostas ao ozônio e a ar filtrado. 16 dias de exposição	29
Figura 8: Concentração de Peroxidases (POX) e Peroxidase do Ascorbato (APX) em <i>Joannesia princeps</i>	30
Figura 9: Anatomia de folhas de <i>Joannesia princeps</i> expostas ao ozônio 100ppb.h-1. Microscopia de luz.....	31
Figura 10: Caracterização histoquímica de folhas de <i>Joannesia princeps</i> expostas ao ozônio 100ppb.h-1. Microscopia de luz	32
Figura 11: Folhas de <i>Joannesia princeps</i> submetidas ao tratamento com ozônio (100 ppb.h-1). Microscopia Eletrônica de Varredura	34
Figura 12: Anatomia de glândulas peciolares de <i>Joannesia princeps</i> exposta ao ozônio (azul de toluidina). Microscopia de luz.....	36
Figura 13: Caracterização histoquímica de glândulas peciolares de <i>Joannesia princeps</i> exposta ao ozônio. Microscopia de luz	38
Figura 14: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de glândulas peciolares de <i>Joannesia princeps</i> submetidas ao tratamento com ozônio (100 ppb.h-1)	40

RESUMO

SANTOS, Michel Filiphy Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2019. **Avaliações morfoanatômicas e fisiológicas em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) exposta ao ozônio.** Orientadora: Luzimar Campos da Silva.

O Ozônio (O_3) é um poluente atmosférico altamente oxidante que pode causar danos à saúde de animais e plantas. No Brasil, é comum encontrar esse gás, em altas concentrações, em épocas com alta irradiância devido à sua formação fotoquímica. Em plantas, o O_3 é absorvido via complexo estomático e causa vários danos bioquímicos, fisiológicos e anatômicos, que resultam em pontos necróticos visíveis na folha. Os efeitos do O_3 são bem conhecidos, principalmente na Europa e América do Norte, mas faltam registros relacionados ao impacto desse poluente em ambientes tropicais. Nesse sentido, *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) é um excelente modelo de estudo, visto que é comum em Mata Atlântica e apresenta sensibilidade a outros poluentes atmosféricos. O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações morfoanatômicas e fisiológicas em folhas e glândulas peciolares de *J. princeps*, em resposta à exposição ao O_3 . Sementes de *J. princeps* foram obtidas e cultivadas em casa de vegetação. No estágio de plântulas, foram expostas ao O_3 em ambiente controlado com sistema de fumigação. Sintomas foliares visíveis foram avaliados, destacando o índice de injúria foliar. Teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides foram determinados e avaliadas as atividades das enzimas catalase (CAT), peroxidases (POX) e peroxidase do ascorbato (APX). Posteriormente, foram realizadas análises histoquímicas e anatômicas em microscopia de luz e eletrônica de varredura em folíolos e glândulas peciolares do ápice e da base. As plantas apresentaram sintomas visuais característicos de estresse por ozônio como pontuações escuras intervenhais e índice de injúria foliar de 16%. Não foram observadas diferenças estatísticas nos teores de pigmentos e nas enzimas avaliadas nas folhas. Os sintomas visuais característicos encontrados nas folhas foram: compostos fenólicos no parênquima paliçádico, lacunoso e epiderme; necroses no parênquima paliçádico, protusões pécticas e retração de protoplastos. Não foram observados sintomas visuais e anatômicos de injúria nas glândulas peciolares por microscopia de luz. Histoquimicamente, observou-se maior quantidade de proteínas e carboidratos nas glândulas das plantas fumigadas e menor quantidade nas folhas. Em

microscopia eletrônica de varredura, observou-se a degradação superficial das ceras epicuticulares, da crista estomática, da cutícula das células epidérmicas da face abaxial da folha e poucos estômatos não funcionais. As glândulas peciolares de *J. princeps* apresentaram diferença em relação ao desenvolvimento nas folhas jovens. Verificou-se rompimento das células da epiderme secretora após destacamento da cutícula para liberação da secreção. Os dados mostraram que *J. princeps* apresenta sintomas visuais e anatômicos característicos de estresse por ozônio, porém, tem baixo índice de injúria foliar visível.

ABSTRACT

SANTOS, Michel Filiphy Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2019. **Morphological and physiological evaluations in *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) exposed to ozone.** Adviser: Luzimar Campos da Silva.

Ozone (O₃) is a highly oxidizing atmospheric pollutant that can cause damage to the health of animals and plants. In Brazil, it is common to find this gas, in high concentrations, in times with high irradiance due to its photochemical formation. In plants, O₃ is absorbed via stomatal complex and causes various biochemical, physiological and anatomical damages that result in visible necrotic spots on the leaf. The O₃ effects are well known, mainly in Europe and North America, but records are lacking related to the impact of this pollutant in tropical environments. In this sense, *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) is an excellent study model, since it is common in the Atlantic Rainforest and presents sensitivity to other atmospheric pollutants. The objective of this work was to evaluate the morphoanatomical and physiological changes in leaves and petiolar glands of *J. princeps*, in response to O₃ exposure. Seeds of *J. princeps* were obtained and grown under greenhouse conditions. At the seedling stage, they were exposed to O₃ in a controlled environment with fumigation system. Visible leaf symptoms were evaluated, highlighting the index of foliar injury. The Chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids contents were determined and was evaluated the activities of catalase (CAT), peroxidases (POX) and ascorbate peroxidase (APX). Subsequently, histochemical and anatomical analyzes were performed in light microscopy and scanning electron microscopy in leaflets and petiolar glands at the apex and base. The plants presented visual symptoms characteristic of ozone stress as necrotic interveinal spots on the leaf blade and 16% of foliar injury index. No statistical differences were observed in the levels of pigments and enzymes evaluated in leaves. The characteristic visual symptoms found in the leaves were: phenolic compounds in the palisade parenchyma, lacunous parenchyma and epidermis; palisade parenchyma necrosis, pectic protrusions and protoplasts retraction. There were no visual and anatomical symptoms of injury in the petiolar glands analysed by light microscopy. Histochemically, it was observed a greater amount of proteins and carbohydrates in the petiolar glands of fumigated plants and smaller amount in the leaves. By MEV, the surface degradation of epicuticular waxes,

stomatal crest, epidermal cells cuticle of the abaxial leaf face and few non-functional stomata were observed. The peciolar glands of *J. princeps* presented a difference in relation to the development of young leaves. Secretory epidermis cells were disrupted after the cuticle detachment to release secretion. The data showed that *J. princeps* presents visual and anatomical symptoms characteristic of ozone stress, however, it has a low index of visible leaf injury.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	Objetivo Geral	6
2.1.	Objetivos Específicos	6
3	MATERIAIS E MÉTODOS	7
	3.1. <i>Obtenção do material vegetal e cultivo</i>	7
	3.2. <i>Exposição em ambiente controlado</i>	8
	3.3. <i>Sintomas foliares visíveis</i>	9
	3.4. <i>Atividade Enzimática</i>	10
	3.4.1. <i>Atividade da Catalase (CAT)</i>	10
	3.4.2. <i>Atividade da Peroxidase (POX)</i>	10
	3.4.3. <i>Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX)</i>	11
	3.4.4. <i>Determinação de concentração de proteínas nos extratos enzimáticos</i>	11
	3.5. <i>Teor de pigmentos</i>	11
	3.6. <i>Análises anatômicas</i>	11
	3.7. <i>Análise histoquímica das glândulas peciolares e folhas de J. princeps</i>	12
	3.8. <i>Análises estatísticas</i>	13
4	RESULTADOS	13
	4.1. <i>Exposição ao ambiente controlado</i>	13
	4.2. <i>Análise Biométrica</i>	14
	4.3. <i>Sintomatologia Visual</i>	14
	4.4. <i>Atividade Enzimática</i>	15
	4.5. <i>Teor de Pigmentos</i>	15
	4.6. <i>Anatomia e histoquímica das folhas de J. princeps</i>	15
	4.7. <i>Micromorfologia das folhas de J. princeps</i>	16
	4.8. <i>Localização, morfologia, anatomia, histoquímica e micromorfologia das glândulas peciolares de J. princeps</i>	17
	4.9. <i>Caracterização estrutural da superfície de glândulas peciolares de J. princeps</i>	18
5	DISCUSSÃO	19
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
7	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

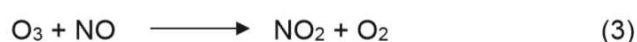
As concentrações de Ozônio (O_3) troposférico aumentaram significativamente durante o século 20. Estima-se que esse poluente aumente em uma taxa de 0,5 à 2,0% ao ano e que, até o ano de 2100, todas as áreas ambientais protegidas se encontrarão sob uma concentração maior que 60ppb, valor acima do recomendado para proteção ambiental (Fuhrer, 2009; Fuhrer et al., 2016; Bergmann et al., 2017). Cabe ressaltar que os valores atuais já causam problemas ambientais consideráveis. Van Dingenen et al. (2009) estimaram que nos anos 2000 houve uma significativa perda na produtividade mundial de milho, soja, arroz e trigo devido ao estresse por O_3 , o que gerou um prejuízo estimado em 14 milhões de reais. Espera-se que, em 2030, esse valor suba para casa dos 26 milhões de reais anuais.

Adicionalmente ao prejuízo às culturas alimentares, trabalhos têm demonstrado diminuição no crescimento em árvores florestais localizadas em reservas distantes de centros urbanos (Kitao et al., 2016). Em muitas regiões do mundo, principalmente na Europa, onde o monitoramento ocorre há mais tempo, é possível encontrar sintomas visuais de lesão por O_3 em várias plantas que se encontram em reservas de biodiversidade (Fuhrer et al., 2016).

O ozônio é uma molécula triatômica composta por três átomos de oxigênio. É um gás incolor, inodoro, tóxico e que tem um efeito duplo na atmosfera (Lagzi et al., 2013). A grande maioria desse gás, cerca de 90%, encontra-se na faixa atmosférica entre 19 e 30 km acima da superfície da Terra, a estratosfera, e, nessa região, o ozônio exerce papel de protetor da vida, evitando que os organismos vivos sejam afetados pela radiação solar. Além disso, ele também auxilia na manutenção natural de temperatura ótima do planeta (Finlayson-Pitts & Pitts, 1997; Denman & Brasseur, 2007; CETESB, 2014). Em contrapartida, na troposfera (até 10km acima da superfície terrestre), o ozônio, em altas concentrações, é extremamente nocivo à saúde humana, a outros animais e plantas no geral (Lagzi et al., 2013; CETESB, 2014).

O principal mecanismo de formação e destruição do ozônio, na troposfera, é decorrente de um ciclo fotoquímico que envolve moléculas precursoras, óxidos nítricos (NO_x) e compostos orgânicos voláteis (COVs) na presença de radiação solar. O ozônio é formado principalmente pela fotólise do NO_2 , liberando um átomo de

oxigênio altamente reativo capaz de reagir com a molécula de oxigênio (O₂) e formar O₃, porém, como o O₃ é uma molécula instável, ela reage rapidamente com o NO para



regenerar o NO₂. Portanto, a quantidade de O₃ na atmosfera depende da razão [NO₂]/[NO] e da velocidade de fotólise do NO₂. Em condições naturais, a quantidade de O₃ presente na atmosfera se mantém constante. Entretanto, na presença de COVs ou outras moléculas como Monóxido de carbono (CO) e Metano (CH₄ por exemplo), e a radiação solar, o NO pode ser convertido em NO₂, desbalanceando a reação de formação do O₃. Em ambientes muito poluídos existe uma intensa liberação de COVs e compostos nitrogenados, o que favorece o aumento de O₃ troposférico (CETESB, 2000; Lagzi et al., 2013). Em uma região, a concentração de ozônio pode variar ao longo do ano conforme características ambientais como radiação solar, nebulosidade, temperatura, assim como o transporte de precursores e do próprio ozônio. Além da formação fotoquímica, o O₃ pode ser transferido para a troposfera devido à dinâmica de conversão de gases entre troposfera e estratosfera, porém, essa dinâmica natural é menos impactante na concentração total que a formação fotoquímica (Freedman, 1996; Lagzi et al., 2013).

Sabe-se, há bastante tempo, que a poluição atmosférica é prejudicial ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Larcher, 2006). Nos últimos sessenta anos, o ozônio tem sido amplamente estudado e vários trabalhos corroboraram a ideia de que esse poluente em altas concentrações, por ter alto poder oxidante, é bastante nocivo às plantas. O ozônio é considerado um gás tóxico quando está em concentrações acima de 40 ppb para a maioria das plantas cultivadas sensíveis e para muitas espécies florestais (Oksanen et al., 2007; Royal Society, 2008; Lagzi et al., 2013).

Os efeitos fitotóxicos do ozônio dependem da sua difusão molecular via complexo estomático durante as trocas gasosas. Uma vez dentro da folha, o O₃ tem capacidade de reagir com biomoléculas insaturadas formando Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que afetam, primeiramente, a membrana plasmática e,

posteriormente, todas as membranas internas, causando também outros danos oxidativos (Vollenweider et al., 2003; Larcher, 2006; Vainonen & Kangasjärvi, 2015). Esse processo, juntamente com destruição de proteínas, leva a um estresse fisiológico e pode causar morte celular, o que é visível nas folhas em forma de pontos ou manchas necróticas, principalmente na superfície adaxial (Ladd & Sachs, 2004; Vainonen & Kangasjärvi, 2015). Os sintomas visíveis mais característicos do estresse por ozônio são coloração bronzeada, manchas difusas na folha e pontuações escuras avermelhadas dispersas, porém, esses sintomas também podem estar presentes em outros tipos de estresses (Vollenweider and Günthardt-Goerg, 2005). As lesões causadas por O₃ que podem ser facilmente identificadas em campo são pontos, geralmente com coloração intensa, que acontecem exclusivamente próximo as nervuras e essa característica é utilizada para identificação do estresse por O₃ (Novak et al., 2003; Vainonen & Kangasjärvi, 2015).

Os sintomas visuais sucedem os danos fisiológicos, bioquímicos e anatômicos, uma vez que eles são reflexo de danos internos, devido a planta não responder eficientemente aos danos oxidativos (Vollenweider et al., 2003; Oksanen et al., 2007). Problemas fisiológicos estão relacionados com danos oxidativos, que refletem na condutância estomática e na eficiência do uso da água o que, conseqüentemente, afeta a produção de fotoassimilados (Papazian et al., 2016). A diminuição da assimilação de carbono reduz a produtividade geral da planta como crescimento, rendimento floral e produção de frutos e sementes (Larcher, 2006). Em nível bioquímico, todos esses sintomas fisiológicos estão relacionados com a oxidação das ligações duplas de sulfidril e ácidos graxos pelas EROs, que reduzem a seletividade da membrana plasmática (Larcher, 2006). O decréscimo na produtividade ocorre devido à competição entre as rotas metabólicas normais e o estresse oxidativo. A planta, sob estresse, produz enzimas que participam da eliminação e neutralização das EROs como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutational peroxidase (GPX) e peroxiredoxina (PrxR) (Calatayud et al., 2007; Gao et al., 2016).

Com relação às alterações morfoanatômicas são observados colapso e morte celular, principalmente no parênquima paliçádico, presença de caloses e protusões péctico celulósicas na parede celular, rompimento de membrana plasmática, acúmulo de taninos, alteração no número e tamanho de cloroplastos e acúmulo de compostos

fenólicos no vacúolo (Faoro & Iriti, 2005; Guerrero et al., 2013; Dumont et al., 2014; Gao et al., 2016; Moura et al., 2018, 2011; Fernandes et al., 2019). Cardoso-Gustavson et al. (2014) associaram a produção de cristais de oxalato de cálcio e COVs com a resistência ao estresse por ozônio. Gao et al. (2016) mostraram, em microscopia eletrônica de transmissão, o rompimento da lamela média como um dos sintomas de colapso do parênquima paliçádico. Em espécies sensíveis, as protusões péctico celulósicas são consideradas características sintomáticas de estresse por O₃ de fácil visualização (Moura et al., 2011). Algumas espécies com fácil identificação de sintomas visuais ou anatômicos são consideradas boas indicadoras de impacto ambiental como *Psidium guajava* 'Paluma', *Ipomea tricolor* e *Nicotiana tabacum* (Ladd & Sachs, 2004; Furlan et al., 2007; Pedroso, 2007; Esposito et al., 2009; Moura et al., 2011).

No Brasil, a concentração de O₃ também apresenta aumento significativo em regiões intensamente urbanizadas como São Paulo (CETESB, 2017). Em algumas épocas do ano, altas concentrações também foram reportadas em áreas rurais e até mesmo na floresta amazônica (Artaxo et al., 2005). Como o O₃ é um poluente secundário, ele pode ser formado em áreas muito diferentes das fontes de emissão. Assim, em áreas rurais, por não existir altas taxas de NO que diminuem a concentração de O₃, a quantidade de ozônio pode ser ainda maior que em centros urbanos (Lagzi et al., 2013). Existem evidências de estresse por ozônio em plantas nativas da mata atlântica em regiões metropolitanas, mas ainda faltam registros para áreas de reservas e de proteção ambiental (Moura et al., 2018).

A Mata Atlântica é um Bioma tropical, brasileiro, extremamente degradado, apresentando somente 15% da sua cobertura original, sendo que apenas cerca de 8% estão em condições de boa conservação (Scarano, 2002). Apesar de se conhecer alguns impactos do ozônio nas plantas nativas desse bioma (Moura & Alves, 2014; Moura et al., 2018) mais esforços nas pesquisas necessitam ser feitos para entender como níveis elevados de ozônio impactam plantas nativas, visto que toda região litorânea, maior parte do domínio da Mata Atlântica, é extremamente urbanizada e, provavelmente, apresentará taxas futuras de O₃ troposférico acima dos valores limites.

Joannesia princeps Vell. (Euphorbiaceae), conhecida popularmente como cotieira, boleira, andá-açú, purga-de-cavalo, dentre outras denominações, é uma planta de porte arbóreo que pode ser encontrada nas regiões norte, nordeste e sudeste do país e é característica, principalmente, de florestas pluviais de Mata Atlântica, mas também é encontrada em algumas regiões do cerrado e da restinga (Carvalho, 2005; Borges, 2012). É considerada uma planta decídua e heliófita e possui folhas compostas digitado-partidas, alternas e pecíolo cilíndrico com três a cinco folíolos. Na base e no ápice dos folíolos encontram-se glândulas secretoras (Sousa et al., 2007; Carvalho, 2014; Silva, 2015). Essa espécie apresenta grande potencial econômico, sua madeira pode ser utilizada para madeiraria, caixotaria, produção de fósforos e outros materiais. Também possui fibra de boa qualidade e é indicada para produção de papel. Suas sementes podem ser utilizadas na produção de ração animal e biodiesel, além de serem comumente utilizados como laxante natural, embora causem toxidez quando ingeridas em quantidades elevadas (Carvalho, 2005; Sousa et al., 2007).

Devido ao seu crescimento acelerado, o que promove rápida regeneração e recuperação de áreas degradadas, *J. princeps* pode ser uma ótima alternativa para reflorestamento (Spadeto et al., 2017). Alguns estudos com *J. princeps* exposta ao flúor, conduzidos em campo e casa de vegetação, evidenciaram danos causados por esse poluente (Santanna-Santos & Azevedo, 2007), principalmente nos estádio de plântula, quando foi observado maior índice de dano foliar (necrose e clorose), maior dano anatômico e menor crescimento, ao ser comparada com outras espécies de mata atlântica (Silva et al., 2005). Em Ipatinga – MG, mudas cultivadas em experimento de campo, apresentaram necrose e clorose foliar, bem como alterações anatômicas nas folhas e nas glândulas extraflorais (Castro, 2008; Silva, 2015). Esta cidade, a exemplo de outros grandes centros do Brasil, apresenta altas concentrações de O₃ em algumas épocas do ano (CETESB, 2014; Silva, 2015).

Nesse contexto, *J. princeps* se apresenta como um ótimo modelo de estudo, por ter se apresentando sensível a outros poluentes atmosféricos (Silva et al., 2005), pelo seu alto valor comercial (Carvalho, 2014) e ambiental (Spadeto et al., 2017) e, principalmente, por se tratar de uma planta nativa da Mata Atlântica (Carvalho, 2014).

Entender as respostas das plantas nativas brasileiras ao ozônio pode fornecer informações sobre o impacto desse poluente em ambientes de clima tropical, visto que ainda pouco se sabe sobre o comportamento de plantas nativas desse ambiente em possíveis concentrações futuras de O₃. Uma vez que o O₃ pode afetar tecidos foliares em diversas espécies, defende-se a hipótese de que altas concentrações de ozônio (O₃) causam danos morfoanatômicos e fisiológicos em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae), planta nativa da Mata Atlântica e comum em toda sua extensão.

2 Objetivo Geral

Levando em consideração a problemática ambiental relacionada ao O₃ troposférico, os objetivos desse trabalho são avaliar as alterações morfoanatômicas e fisiológicas em folhas e glândulas peciulares de *J. princeps* em resposta à exposição ao ozônio.

2.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar os danos morfoanatômicos em folhas e glândulas peciulares de *J. princeps* expostas ao ozônio;
- Avaliar as respostas enzimáticas de *J. princeps* quando expostas a altas concentrações de ozônio.
- Levantar informações em relação ao nível de resistência ao estresse por ozônio em *J. princeps*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do material vegetal e cultivo

As sementes de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) utilizadas no experimento foram coletadas na mata da dendrologia, localizada no campus da Universidade Federal de Viçosa – UFV, município Viçosa – MG.

Para desinfestação, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio a 5% durante 10 minutos, lavadas em água destilada três vezes por dois minutos cada e secas com papel toalha. A testa das sementes foi rompida suavemente com um martelo, para a quebra de dormência. Após preparadas, as sementes foram semeadas em 36 vasos plásticos de 3L contendo substrato convencional, onde cresceram por 60 dias até estarem com, no mínimo, quatro folhas totalmente expandidas.

Para garantir suprimento hídrico adequado, as plantas foram irrigadas por capilaridade por meio de cordões de nylon inseridos na base dos vasos (VDI, 2003). Nesse modelo, uma extremidade do cordão fica em contato direto com as raízes das plantas e a outra mergulhada em água de torneira contida dentro de uma caixa plástica fechada. A cada 15 dias, para suprimento nutricional, foi aplicado 200ml de solução nutritiva de Hoagland em pH 6,0 (1/2 força) (Epstein, 1975).

Todo procedimento foi realizado em casa de vegetação situada no Instituto de Botânica, localizado na região sudeste da cidade de São Paulo (Figura 1A e B). Essa casa de vegetação possui ar filtrado a partir de filtros específicos para poluentes particulados e gasosos. A temperatura e umidade do ar foram monitoradas e controladas diariamente por meio de termohigrógrafo.

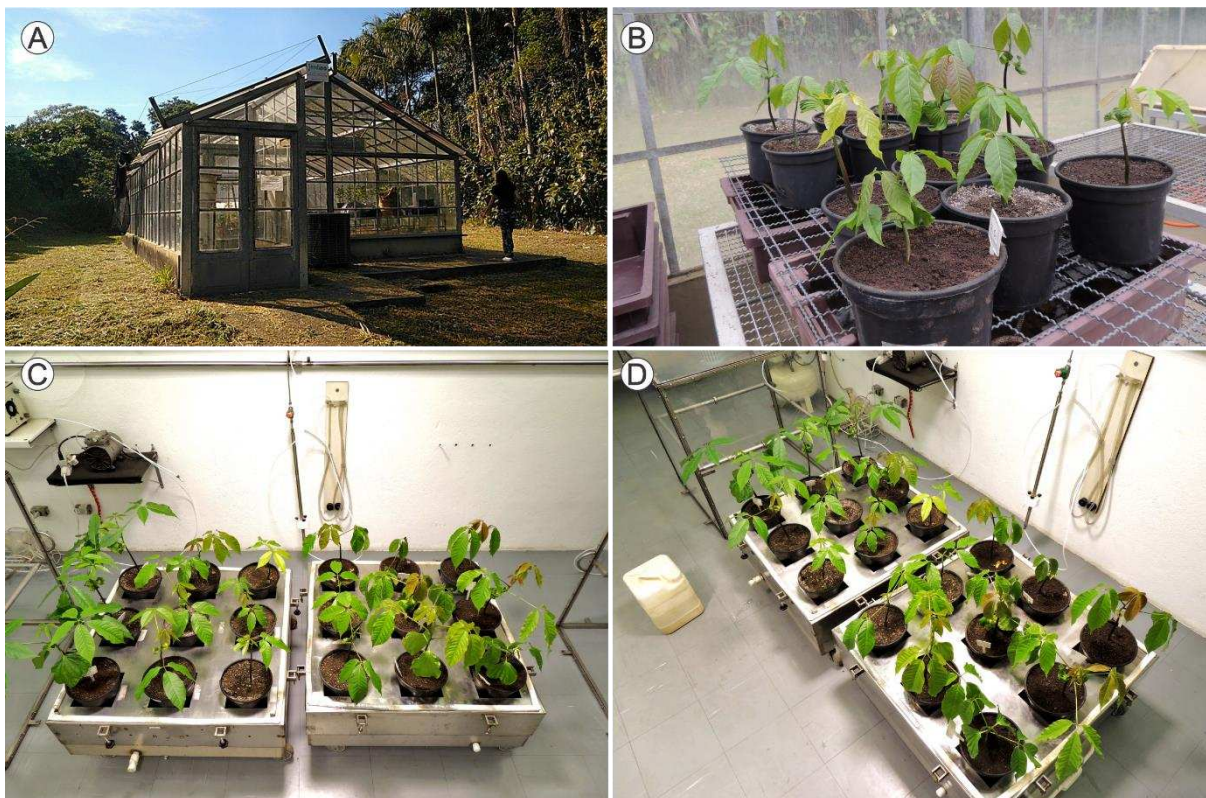


Figura 1: Estrutura e experimento. Casa de vegetação para crescimento vegetal pertencente ao laboratório de Interações atmosféricas do Instituto de Botânica (A e B). Disposição dos vasos nos suportes das câmaras de teflon (C e D).

3.2. Exposição em ambiente controlado

Para exposição ao Ozônio e controle foram utilizadas câmaras de teflon com armação de aço inox, uma para o poluente O_3 e outra com ar filtrado (Figura 1C e D). A câmara possui, em seu interior, um pequeno espaço para acomodação dos vasos e na parte inferior compartimento com água. Essas câmaras, juntamente com o sistema de fumigação, que consiste em aparelho para purificar e umedecer o ar; misturador; dispositivo gerador de ozônio; controlador e instrumentos de monitoramento dos gases, estão localizados no laboratório de interação atmosfera-planta da Seção de Ecologia do Instituto de Botânica (Souza & Pagliuso, 2009). Nas câmaras de tratamento, o ar passa por todas as etapas do sistema de fumigação e nas câmaras para controle o ar não passa pela etapa de ozonização. A concentração de ozônio foi medida continuamente por um monitor manual EcotechTM 9810B.

Foram utilizados nove vasos com plantas individuais para tratamento com O_3 e nove para controle mantido em câmara com ar filtrado sem adição de ozônio. No dia anterior à aplicação do ozônio as plantas foram retiradas da casa de vegetação e mantidas por 24h sob iluminação artificial constante para aclimação.

As plantas foram submetidas ao tratamento por dezesseis dias, durante quatro horas diárias no período de 9 às 13h. Aplicou-se uma concentração diária de 100ppb.h⁻¹. Os valores acima de 40 ppb.h⁻¹ são considerados tóxicos para a maioria das espécies e 80 ppb.h⁻¹ é o limite máximo estabelecido. A concentração 100 ppb.h⁻¹ foi escolhida por ser um valor possível e esperado para os próximos 100 anos em alguns locais mais poluídos do mundo (Bergmann et al., 2017).

As plantas foram iluminadas artificialmente com lâmpadas de vapor metálico 400W e lâmpadas de fluorescência 30W (modelo TL-05) que emitem radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (até 500 μmol.m⁻².s⁻¹) durante 8 horas diárias. A temperatura foi controlada para, aproximadamente, 25°C.

Ao final da exposição, foram avaliados os danos visíveis, as trocas gasosas e coletadas amostras para análises bioquímicas e morfoanatômicas.

3.3. Sintomas foliares visíveis

As plantas foram medidas com uma fita métrica no início e no fim do experimento.

Para análises de injúrias foliares, as folhas foram fotografadas com câmera semi-profissional (modelo Colpix P510, Nikon, Japão). Parâmetros de incidência e severidade dos danos foram analisados. De acordo com Chappelka et al. (1997) incidência é o número de indivíduos com sintomas foliares dividido pelo número total de indivíduos e severidade é o número total de folhas com danos em uma planta específica em relação ao número total de folhas de todas as plantas que possuem danos. Posteriormente, foi analisada a porcentagem de dano foliar caracterizados em intervalos de 1 a 5, sendo 1 – 5 % (classe 1), 6 – 25 % (classe 2), 26 – 50 % (classe 3), 51 – 75 % (classe 4) e 76 – 100 % (classe 5). Com esses dados de injúria foliar foi calculado o Índice de Injúria Foliar (IIF), descrito em Furlan et al. (2008).

$$\text{IIF (\%)} = \frac{(N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4) + (N5 \times 5)}{(N0 + N1 + N2 + N3 + N4 + N5)} \times 100$$

Onde N1, N2, N3, N4 e N5 representam a quantidade de folíolos com sintomas em cada classe e N0 é o número de folíolos que não apresentaram sintomas.

3.4. Atividade Enzimática

As folhas utilizadas para análise de atividade enzimática foram aquelas localizadas no 2° nó do ápice para base, totalmente expandidas. As folhas coletadas foram colocadas em papel alumínio, identificadas e congeladas em nitrogênio líquido. Após a coleta, em laboratório, as amostras foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, trituradas e armazenadas em tubos Falcon.

Foram analisadas as atividades das enzimas catalase, peroxidases e peroxidase do ascorbato. Para obtenção do extrato enzimático aproximadamente 30mg de material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizadas em meio de extração composto por 1) tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto et al, 1999). O extrato resultante foi centrifugado por 15 minutos a 12.000g sob temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi dividido em três alíquotas para análise da atividade das enzimas SOD, CAT, POX e APX e armazenados em freezer (-80°C) até o momento da análise.

3.4.1. Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada pelo consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), seguindo protocolo proposto por Havir & McHale (1987). O extrato enzimático bruto foi adicionado ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7) e H_2O_2 40 μ M. A atividade enzimática foi avaliada na absorbância a 240 nm em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA) durante 1 minuto. O fator da extinção molar do H_2O_2 (39,4 $mM^{-1} cm^{-1}$) foi utilizado para o cálculo da atividade, e o resultado final expresso em μ mol de H_2O_2 $min^{-1} mg^{-1}$ MF.

3.4.2. Atividade da Peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

Para determinação da atividade das peroxidases foi adicionado o extrato enzimático ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 25mM, pH 6,8, pirogalol 20mM e H_2O_2 20 mM (Kar & Mishra, 1976). A reação gera purpurogalina e foi determinada em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA) pelo aumento da absorbância durante o primeiro minuto de reação a 420nm, a 25 °C. Para cálculo da atividade enzimática foi utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,47 $mM^{-1} cm^{-1}$ (Chance & Maehly, 2004) e expressa em μ mol de purpurogalina $min^{-1} mg^{-1}$ MF.

3.4.3. *Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)*

Para determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) foi utilizada a metodologia proposta por Asada (1992) com algumas modificações. O extrato foliar foi adicionado a uma solução contendo 80mM de tampão fosfato de potássio (pH = 7,0), 1mM de EDTA, 10mM de ácido ascórbico e 2mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A reação de consumo do H₂O₂ foi realizada em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA) com comprimento de onda a 290nm, por 1 minuto, em comparação com uma solução controle. O resultado final foi expresso em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$.

3.4.4. *Determinação de concentração de proteínas nos extratos enzimáticos*

O extrato utilizado para quantificação de proteínas foi o mesmo utilizado na quantificação das enzimas. Uma alíquota de 5 μL do extrato foi adicionada a 250 μL da solução do reagente de Bradford (Bradford, 1976) e, posteriormente lida no comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas solúveis nas amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) e os resultados foram expressos em $\text{mg g}^{-1} \text{ MF}$.

3.5. *Teor de pigmentos*

Conforme Wellburn (1994), os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides foram determinados com a utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator. Para tal, quatro discos foliares do quarto nó, do ápice para a base, com aproximadamente 5 mm de diâmetro foram colocados em recipientes protegidos de luz contendo 4ml de DMSO. Após 48 horas em temperatura ambiente os valores de absorbâncias do extrato (A_{663} e A_{645} para clorofilas *a* e *b*, respectivamente e A_{480} para carotenoides) foram lidas em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA) e os teores dos pigmentos foram determinados e expressos em ug.cm^{-2} .

3.6. *Análises anatômicas*

Para análises anatômicas foram coletadas amostras de folíolos do 1º, 3º e 4º nós com e sem sintomas visuais. Também foram coletadas as glândulas localizadas na base e no ápice do pecíolo desses nós. Após a coleta, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2) (Karnovsky, 1965, modificado) e deixadas no vácuo por 48h, seguido de desidratação em série etílica. Posteriormente, as amostras foram incluídas em metacrilato

(Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) e cortes longitudinais e transversais foram seccionadas à 5µm de espessura em micrótomo rotativo de avanço automático Leica RM2265 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) com utilização de navalhas de vidro. Para avaliação anatômica estrutural, as secções foram coradas com azul de toluidina (O'Brien & McCully, 1981) e as lâminas montadas em resina sintética (Permout, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA). A análise e o registro fotográfico foram realizadas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) com sistema U-Photo com câmera digital acoplada (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Alemanha) localizados no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

Amostras de glândulas peciolares localizadas na base e no ápice do pecíolo e fragmentos foliares do 1º, 3º e 4º nó foram analisados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), para avaliar possíveis alterações superficiais ocasionadas pelo O₃ nas ceras epicuticulares, epiderme e estômatos. As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2) (Karnovsky, 1965, modificado), desidratadas em série etílica e levadas à secagem ao ponto crítico (Bozzola & Ruessel, 1992) utilizando-se equipamento (modelo CPD030, BalTecBalzers, Liechtenstein). Após a montagem das amostras nos suportes ("Stubs"), foi realizada a deposição metálica com ouro (Bozzola & Ruessel, 1992) utilizando-se equipamento Sputter Coater (modelo FDU 010 da Balzers, Liechtenstein). As amostras foram observadas e documentadas em microscópio eletrônico de varredura (modelo Leo 1430VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra) pertencente ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3.7. Análise histoquímica das glândulas peciolares e folhas de J. princeps

Para os testes histoquímicos, foram coletadas as glândulas localizadas na base e no ápice do pecíolo e fragmentos foliares de folíolos do 1º, 3º e 4º nós com sintomas e sem sintomas. Após a coleta, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2) (Karnovsky, 1965, modificado) e deixadas no vácuo, seguido de desidratação em série etílica. Posteriormente, as amostras foram incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) e seccionadas a 5µm de espessura em micrótomo rotativo de avanço automático Leica RM2265 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) com utilização de navalhas de vidro. Foram realizados os

seguintes testes histoquímicos: Reação com ácido periódico - Reagente de Schiff (PAS) com controle adequado, para a detecção de carboidratos totais (O'Brien & McCully, 1981); Sudan Black B (Benes, 1964, modificado; Pearse, 1985, modificado), para localização de lipídios e Xilidine Ponceau 1 % pH 2,5 (Vidal, 1970), para evidênciação de proteínas totais. As lâminas foram montadas em resina sintética (Permount, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) e as observações e registro das imagens foram feitos em fotomicroscópio (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) com sistema U-Photo com câmara digital acoplada (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Alemanha) localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal (DBV-UFV).

3.8. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA, e as médias foram comparadas com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o software RStudio (Bhering, 2017).

4 RESULTADOS

4.1. Exposição ao ambiente controlado

A concentração diária de ozônio variou ao longo dos dias de tratamento com média de 96,580 ppb.h (Figura 2A).

O Valor de Referência para Proteção de Produtividade agrícola (VRPP) adotado para o Brasil, que é baseado no índice AOT40 estabelecido pela organização mundial da saúde (soma de todos os valores de concentrações de Ozônio que ultrapassem 40ppb.h entre 8 e 20h) é de 3000ppb.h (ou 6000 $\mu\text{g}/\text{m}^3\cdot\text{h}$) acumulado em três meses (CETESB, 2014). Neste experimento, o valor acumulado de ozônio foi de 8742 ppb.h, valor diário bem acima do recomendado para proteção da vegetação, confirmando que as plantas foram submetidas a doses fitotóxicas de Ozônio (Figura 2B).

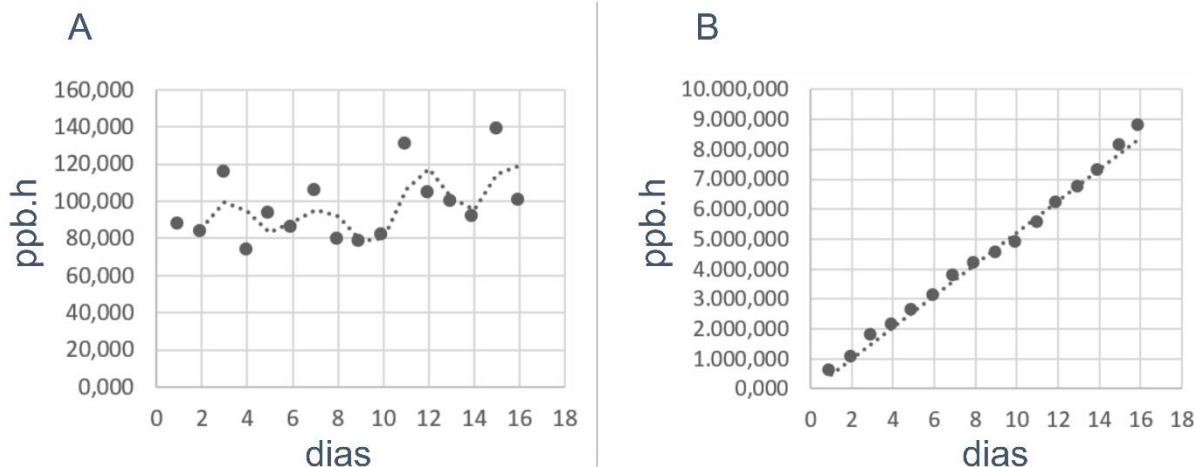


Figura 2: Ozonização ao longo do experimento. A - Valores médios de ozônio durante os 16 dias de exposição (ppb.h). B - Valores acumulados de Ozônio durante o experimento em ppb.h (AOT40).

4.2. Análise Biométrica

O crescimento relativo das plantas não apresentou diferença estatística quando comparado ao controle após 16 dias de exposição ao ozônio (Figura 3).

4.3. Sintomatologia Visual

J. princeps apresenta crescimento monopodial com ramificação de folhas do tipo alterna oposta. As folhas cotiledonares são grandes e se mantêm durante grande parte do crescimento. As folhas são compostas, com 3 a 5 folíolos. As folhas apresentam glândulas peciolares basais e apicais (Figura 4B, C e D).

Os sintomas começaram a aparecer a partir do sétimo dia de exposição, iniciando com necroses (Figuras 5C, D e E) e cloroses (Figuras 5F) da margem da folha em direção ao centro. Todas as plantas apresentaram algum tipo de sintoma a partir desse dia, algumas com severidade maior que outras. As plantas apresentaram média de severidade de 43%, ou seja, tiveram, em média, 43% de folhas visualmente afetadas em algum nível. Porém, o índice de injúria foliar foi de 15,99%.

Os sintomas visuais mais característico encontrados foram pontuações escuras intervenais. Elas se iniciaram sempre a partir das margens para centro da folha e aumentando em intensidade com o tempo de fumigação (Figura 5E). Essas pontuações progrediram para manchas maiores e disformes ocupando, algumas vezes, a maior parte do limbo foliar (Figuras 5D e G). Outros sintomas recorrentes

foram manchas cloróticas (Figura 5B) e pequenas pontuações claras nas margens e pontas das folhas (Figura 5F).

Não foram observados sintomas visuais de injúria nas glândulas peciolares em nenhuma das plantas.

4.4. Atividade Enzimática

A atividade das enzimas CAT, POX e APX não apresentaram diferenças significativas quando calculadas em relação à massa fresca ou à proteínas totais (Figura 6).

4.5. Teor de Pigmentos

Os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, carotenoides e a razão clorofila *a/b* não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparado plantas expostas ao ozônio em relação as plantas mantidas em ar filtrado (Figuras 7 e 8).

4.6. Anatomia e histoquímica das folhas de *J. princeps*.

As folhas de *J. princeps* são unisseriadas e dorsiventrais, apresentam uma camada de parênquima paliçádico voltado para superfície adaxial e quatro a seis camadas de parênquima lacunoso. É considerada hipoestomática, embora seja comum encontrar alguns estômatos na face adaxial próximo à nervura mediana da folha. A nervura mediana apresenta de duas a três faixas contínuas de colênquima angular na face abaxial e, na face adaxial, acima da nervura mediana, colênquima angular em formato de cunha. O feixe vascular é colateral. Idioblastos cristalíferos estão presentes em toda a folha. Além de idioblastos, é comum visualizar laticíferos e algumas células com compostos fenólicos, principalmente na região das nervuras (Figura 9A, C e E).

Os sintomas anatômicos mais evidentes nos indivíduos expostos ao tratamento com ar filtrado + ozônio foram: Necrose das células do parênquima paliçádico e, em locais com danos mais severos, da epiderme adaxial (Figuras 9B e D); Acúmulo de compostos fenólicos, corados em verde, no parênquima paliçádico, no parênquima lacunoso e na epiderme (Figuras 9D); protusões pécticas na parede (Figura 9F) e retração do protoplasto (Figura 9B e F).

As protusões pécticas são caracterizadas por pequenas protuberâncias péctico-celulósicas na parede lateral das células e são evidentes no parênquima

lacunoso (Figura 9F). A presença de compostos fenólicos foi notada em grande parte da folha, principalmente próximo às necroses (Figura 9B e D). A fase inicial da lesão é caracterizada pelo acúmulo de compostos fenólicos com posterior rompimento das células do parênquima paliçádico. As células da epiderme adaxial, nos locais necrosados, se tornam mais tabulares e, em alguns casos, entram em colapso (Figuras 9B). Observou-se, também, retração do protoplasto de células epidérmicas e parenquimáticas (Figura 9B e F).

Os testes histoquímicos evidenciaram diferenças nas folhas das plantas tratadas em relação ao controle (Figura 10). O Reagente de Schiff/ ácido periódico – PAS mostrou a presença de polissacarídeos neutros no parênquima paliçádico e lacunoso. As plantas mantidas em ar filtrado apresentaram uma distribuição uniforme do conteúdo, enquanto as plantas do tratamento com ozônio apresentaram grânulos menores e mais espaçados, mesmo nos locais onde não havia necrose (Figura 10D e F).

As células da epiderme, do parênquima paliçádico e lacunoso reagiram positivamente com o teste Xilidine Ponceau (XP). No parênquima paliçádico e lacunoso, as estruturas coradas apresentaram uma distribuição bem definida nas paredes laterais das células e grânulos grandes foram marcados na epiderme adaxial e abaxial para ar filtrado. Nas plantas tratadas com ozônio a distribuição dos conteúdos corados foi disforme, principalmente nos locais de lesão, onde as células rompidas ficaram totalmente coradas. Na epiderme, poucos e pequenos grânulos foram marcados (Figura 10G e H).

O teste com Sudam Black não diferiu entre os tratamentos.

4.7. Micromorfologia das folhas de J. princeps.

Em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram analisadas folhas que já estavam completamente desenvolvidas quando submetidas ao tratamento com ozônio (adultas) e folhas que se desenvolveram ao longo da exposição (jovens).

Nas folhas da planta controle, as células da epiderme são túrgidas e apresentam limites bem definidos em sulcos, o que confere uma característica ondulada da superfície foliar (Figuras 11A, C, E e G). As folhas adultas (Figuras 11A e C) apresentaram mais ornamentações de ceras epicuticulares nas células

subsidiárias dos estômatos, enquanto as folhas jovens (Figuras 11E e G) apresentaram ornamentações em todas as células da epiderme abaxial.

As plantas submetidas ao ozônio apresentaram danos severos na epiderme da face abaxial da folha, tanto nas folhas adultas (Figuras 11B e D), como nas folhas jovens (11F e H). Os sintomas mais evidentes nas folhas jovens e adultas foram desarranjo das ceras epicuticulares (Figura 11B,F e H), degradação das células guardas (Figura 11D e H), rompimento das cristas estomáticas (Figura 11D e H) e retração das células epidérmicas, devido à queda da turgidez (Figura 11F). Nas folhas adultas foram observados sulcos ao longo da epiderme, onde as células se sobrepueram (Figuras 11B). Nas folhas jovens, as células epidérmicas se apresentaram murchas e colapsadas, com as conexões entre as paredes anticlinais mais evidentes e as ceras epicuticulares desuniformes (11F).

A epiderme da face adaxial da folha não apresentou diferenças superficiais entre folhas expostas ao ozônio e controle.

4.8. Localização, morfologia, anatomia, histoquímica e micromorfologia das glândulas peciolares de J. princeps

É comum encontrar em *J. princeps* dois tipos de glândulas peciolares, na base do pecíolo e no ápice, próximo aos folíolos (Figura 4). As glândulas da base apresentam-se individualizadas, uma de cada lado do pecíolo (Figura 4C). As glândulas do ápice são unidas pela porção basal, livres na extremidade apical, porque geralmente se desenvolvem em duplas (Figuras 4B e 4D). Morfologicamente, são cilíndricas e apresentam uma região abaulada na parte superior, onde ocorrem rupturas da cutícula para liberação da secreção.

As glândulas apresentam cutícula espessa na região de secreção que se torna mais delgada nas laterais. Na parte superior, logo abaixo da cutícula, existe uma epiderme secretora em forma de paliçada, composta por duas a três camadas de células alongadas que coram intensamente de azul escuro com azul de toluidina. Entre a epiderme em paliçada e o parênquima de preenchimento encontra-se um parênquima secretor composto por duas a três camadas celulares frouxamente arranjadas e isodiamétricas que coram de azul ciano (Figura 12A, C e E). A lateral das glândulas é formada por uma epiderme tabular unisseriada e várias camadas de células subepidérmicas com compostos fenólicos que coram de verde. As glândulas

são intensamente vascularizadas com xilema e floema bem evidentes em meio ao parênquima nectarífero. O parênquima apresenta idioblastos cristalíferos, células com compostos fenólicos e laticíferos (Figuras 12A e B).

Não foram evidenciadas alterações anatômicas nas glândulas que possam ser atribuídas à exposição ao tratamento com ozônio (Figura 12).

Em relação aos testes histoquímicos, a epiderme em paliçada, o parênquima secretor, o parênquima subjacente ao parênquima secretor e os feixes vasculares coraram mais intensamente em todas as lâminas analisadas tratadas com ozônio que em cortes das plantas controle (Figuras 12 e 13).

Tanto as células do controle como as do tratamento reagiram positivamente com Reagente de Schiff/ ácido periódico – PAS, principalmente na região da parede celular (Figuras 13C, D, E e F). Porém, assim como para azul de toluidina, o conteúdo intracelular das células tratadas com ozônio (Figura 12D) coraram mais intensamente que as células das plantas controle (Figura 12C). Além disso, é possível identificar muitos grânulos de polissacarídeos nas células do parênquima nectarífero e da epiderme secretora nas plantas tratadas com ozônio (Figura 13D). Nas plantas controle, esses grânulos são menos numerosos e mais discretos (Figura 13C).

Reações positivas para Xilidine Ponceau (XP) foram observadas em ambos os tratamentos (Figuras 13A e B). Grânulos proteicos foram identificados nas glândulas das plantas expostas ao ozônio (Figuras 13B) e no tratamento controle (Figuras 13A). Feixes vasculares, parênquima de preenchimento e parênquima nectarífero apresentaram maior intensidade de coloração nas plantas tratadas com ozônio (Figuras 13B).

Os testes com Sudan Black B não apresentaram diferenças entre plantas tratadas com ozônio e plantas controle (Figuras 13G).

4.9. Caracterização estrutural da superfície de glândulas peciolares de J. princeps

Assim como para folhas, em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram analisadas glândulas de folhas adultas e jovens.

As plantas de referência, mantidas em ar filtrado, apresentaram glândulas de folhas adultas saudáveis, com epiderme e superfície intactas (Figuras 14A e C). Hifas fúngicas foram observadas na superfície acima da cutícula. As glândulas das plantas

adultas expostas ao ozônio apresentaram rachaduras na cutícula e na epiderme secretora, expondo o parênquima nectarífero (Figura 14B e D).

Diferente das glândulas das folhas adultas, as glândulas das folhas jovens, que se expandiram durante a exposição, não estavam totalmente desenvolvidas (Figura 14E e F). As glândulas de referência mostraram-se com algumas partes totalmente desenvolvidas e alguns locais ainda em divisão e expansão celular. A parte já desenvolvida da glândula teve formação de protuberância secretora e rompimento da cutícula, com consequente exposição do parênquima em paliçada não colapsado (Figura 14E e G). Não foram observadas hifas fúngicas. Em contrapartida, as glândulas de folhas jovens expostas ao ozônio mostraram-se com toda a superfície em desenvolvimento e rachaduras na cutícula e na epiderme em paliçada (Figura 14F e H) com algumas colônias de hifas fúngicas (Figura 14F). As superfícies laterais das glândulas expostas ao ozônio estavam completamente disformes (Figuras 14F e H).

5 DISCUSSÃO

A taxa de crescimento relativo e acúmulo de biomassa são parâmetros usualmente utilizados para verificar estresses ambientais em plantas, principalmente em plantas cultiváveis, por se tratar de um parâmetro de fácil verificação (Larcher, 2006). O ozônio, assim como outros poluentes oxidantes, afeta o desenvolvimento da planta como um todo e, conseqüentemente, diminui o crescimento e a produtividade. Além de plantas cultiváveis, que podem apresentar decréscimo no desenvolvimento devido ao ozônio (Ashmore, 2005; Fuhrer, 2009; Ghude et al., 2014; Holmes, 2014; Feng et al., 2015; Ainsworth, 2017). Registros a longo prazo demonstraram que espécies florestais, mesmo em condições atuais de concentração de ozônio, também apresentam decréscimo no acúmulo de biomassa (Calatayud et al., 2007; Guerrero et al., 2013; Feng et al., 2014; Holmes, 2014; Kitao et al., 2016). Neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas em relação ao crescimento, que pode ser devido ao pequeno tempo de exposição das plantas. Embora *J. princeps* seja uma planta de crescimento rápido, 16 dias não foram suficientes para se observar diferenças no crescimento.

Sintomas visuais podem ser bons indicadores de qualidade ambiental (Vollenweider et al., 2003; Vollenweider and Günthardt-Goerg, 2005; Calatayud et al., 2007; Li et al., 2016). Muitos sintomas visuais podem aparecer em espécies expostas

ao ozônio, dentre eles destacam-se pontuações difusas, cloroses, necroses e bronzeamento foliar (Novak et al., 2003). Estes sintomas são característicos e ocorrem na face adaxial das folhas das plantas (Novak et al., 2003; VDI, 2003).

Em *J. princeps* ocorreram pontuações escuras intervenais nas margens da folha, que se estenderam em direção ao centro da folha no decorrer dos dias de fumigação. Todas as plantas apresentaram algum tipo de sintoma visual, desde pontuações cloróticas até manchas necróticas, mostrando um alto nível de severidade. Porém, o índice de injúria foliar foi pequeno, ou seja, grande parte da planta não foi afetada. Vale ressaltar que nenhuma das folhas que se desenvolveram ao longo do experimento apresentaram sintomas visuais. Os mesmos sintomas observados para *J. princeps* foram documentados para ozônio em outras espécies de mata atlântica brasileira (Moura et al., 2018), o que demonstra boas possibilidades de monitoramento ambiental desse poluente através de sintomatologia visual. *Ipomoea nil* (L.) Roth, *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' e *Psidium guajava* foram tomadas como boas bioindicadoras de ozônio no Brasil, pois são sensíveis e apresentam sintomas característicos de injúria visual por ozônio (Furlan et al., 2007; Sant'Anna et al., 2008; Moura et al., 2011). Alguns países utilizam o monitoramento ambiental através de sintomatologia visual, principalmente na Europa e nos EUA onde os estudos com ozônio são conduzidos há mais tempo (Chappelka et al., 1997; Oksanen et al., 2007; Guerrero et al., 2013) e, mais recentemente, na china (Feng et al., 2014).

Não foram observados sintomas visuais nas glândulas peciolares e não existe relato na literatura de sintomas em glândulas peciolares atribuídos ao ozônio. Estudos conduzidos em campo com *J. princeps* expostas a diferentes tipos de poluentes, incluindo ozônio, demonstraram danos visíveis nas glândulas tão severos quanto os observados nas folhas (Silva, 2015). Em experimentos realizados com chuva ácida, Silva et al., (2005) consideraram *J. princeps* boa bioindicadora, pois demonstrou sensibilidade a esse poluente. Esses dados, juntamente com os dados encontrados neste trabalho, podem dar indícios da sensibilidade geral e específica para ozônio de *J. princeps* ao ozônio.

Sintomas foliares visíveis são resultados finais de processos de degradação celular que, por sua vez, são resultados de processos degradadores que ocorrem à nível bioquímico (Larcher, 2006), quando o ozônio é absorvido.

Algumas espécies de plantas pioneiras de mata atlântica, por terem rápido crescimento, apresentam boa reposta antioxidativa em ambientes poluídos (Brandão et al., 2017). *J. princeps* é considerada uma espécie pioneira e é indicada para recuperação de áreas degradadas. Porém, neste trabalho, não foram identificadas diferenças significativas quando se compara plantas fumigadas e plantas controle com relação às enzimas responsáveis por degradar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), uma das principais EROS.

Muitas espécies apresentam vias antioxidativas não enzimáticas que combatem as EROS (Grulke and Heath, 2019). É possível que *J. princeps*, apresente outros mecanismos antioxidativos não enzimáticos que reduzem a ação de EROs como, por exemplo, ácido ascórbico e glutathione (Feng et al., 2010; Brandão et al., 2017). Além disso, Li et al. (2016) demonstraram que algumas plantas podem responder com mudanças antioxidativas a nível de massa foliar por área e não apenas por massa foliar, o que pode explicar nossos resultados para o sistema enzimático.

Alguns trabalhos demonstraram a sobreposição de locais com morte celular e produção de H₂O₂ em plantas expostas ao ozônio (Faoro & Iriti, 2005), ou seja, as respostas antioxidativas podem ocorrer apenas nos locais de lesões e não na folha como um todo. Como o índice de injúria foliar nesse trabalho não foi alto, é possível que o aumento na atividade das enzimas não tenha sido detectado.

A presença de pigmentos acessórios da família dos carotenoides vem sendo relatado na literatura como via de combate ao estresse antioxidativo por ozônio (Li et al., 2016; Brandão et al., 2017; Gao et al., 2017; Fernandes et al., 2019) assim como a alteração no nível e a relação de clorofila *a* e *b* (Dębski et al., 2017). Neste trabalho, entretanto, não foram encontradas alterações na quantidade total de nenhum dos pigmentos testados.

Os sintomas anatômicos encontrados nesse trabalho são característicos de plantas estressadas por ozônio e já foram documentados na literatura: Presença de compostos fenólicos no interior das células do parênquima paliçádico e do parênquima lacunoso (Vollenweider et al., 2013; Alves et al., 2016; Fernandes et al., 2016; Dębski et al., 2017; Gao et al., 2017; Moura et al., 2018); colapso das células do parênquima paliçádico (Guerrero et al., 2013; Gao et al., 2016), presença de protusões pécticas nas paredes das células de parênquima (Ljubešić and Britvec, 2006; Guerrero et al.,

2013; Alves et al., 2016) e retrações do protoplasto em células do parênquima lacunoso e epiderme (Ljubešić & Britvec, 2006).

A caracterização anatômica pode ser utilizada para visualização de estresse por ozônio, uma vez que nem sempre as lesões são visíveis em primeiro momento ou em baixas concentrações do poluente (Faoro & Iriti, 2005), sendo necessário a utilização de métodos mais detalhados para observações do impacto na vegetação.

O sintoma mais abundante e visível nesse trabalho foi a presença de compostos fenólicos, que ocorreram em todos os tecidos da folha. Muitas classes de fenóis e polifenóis são relatados como sintomas de estresse por ozônio, pois esses compostos também são antioxidativos e agem como inibidores de EROS que entram no citoplasma celular ou que são produzidas devido ao próprio metabolismo das células (Santos & Furlan, 2013; Alves et al., 2016; Fernandes et al., 2016). Fernandes et al. (2016) mostraram que a produção de polifenóis em plantas submetidas a estresse por ozônio pode estar relacionado com morte celular programada. Compostos fenólicos são ocasionalmente encontrados nas folhas de *J. princeps*, porém, foi notável o aumento da presença desses compostos nas plantas fumigadas com ozônio. Silva et al. (2005) também observaram acúmulos de fenólicos em *J. princeps* em experimento com chuva ácida, o que demonstra que a produção de compostos fenólicos é resposta comum a esses dois poluentes atmosféricos.

As presença de protusões pécticas estão relacionadas à defesa extracelular contra o estresse oxidativo (Vollenweider et al., 2003; Faoro & Iriti, 2005; Guerrero et al., 2013). Tendo em vista que o ozônio é um gás e entra via complexo estomático, antes deste entrar nas células, pode reagir com compostos de parede celular. Substâncias pécticas interagem com EROS formando as protusões, o que evita a entrada do ozônio no protoplasto. Caloses, que são hemiceluloses, também foram relatadas na parede celular como resposta ao estresse por ozônio em *Vitis vinifera* (Ljubešić & Britvec, 2006).

Diversos pontos de necrose celular foram observados em *J. princeps*, principalmente no parênquima paliçádico, o que concorda com resultados de trabalhos com *Nicotiana tabacum*, *Ipomoea nil* e *Psidium guajava* crescendo em ambiente tropical (Moura & Alves, 2014; Alves et al., 2016; Moura et al., 2018) e diversas outras espécies crescendo em clima temperado (Ljubešić & Britvec, 2006; Guerrero et al.,

2013b; Li et al., 2016). Pellinen et al. (1999), trabalhando com *Betula pendula*, exposta a concentrações altas de ozônio, demonstraram que a resposta ordenada em organelas celulares para produção de H₂O₂ pode não estar relacionadas com a defesa contra estresse oxidativo, mas sim com a morte celular programada. Outro sintoma encontrado em *J. princeps* foi retração do protoplasto em células da epiderme e do parênquima lacunoso, o que também corrobora dados já relatados na literatura (Vollenweider et al., 2003; Moura et al., 2018), embora não seja comum retração do protoplasto na epiderme em plantas submetidas ao estresse por ozônio.

Em folhas de *J. princeps*, através das técnicas de histoquímica, houve reação positiva para carboidratos e proteínas. Nas folhas saudáveis, os grânulos de carboidratos mostraram-se maiores e melhor distribuídos pelas células, diferente de plantas tratadas, onde eles são menores e mais dispersos. Proteínas estão presentes em grande quantidade, tanto no tratamento, quanto no controle, mas existem glóbulos proteicos nas células da epiderme das plantas controle que não foram observados nas plantas fumigadas.

Nas glândulas peciolares de *J. princeps*, observaram-se reações mais intensas para carboidratos e proteínas em plantas expostas ao ozônio. É possível que exista um direcionamento de metabólitos para as glândulas peciolares quando a planta se encontra em condição de estresse. Entretanto, Silva (2015) observou o contrário para proteínas em plântulas de *J. princeps* expostas na cidade de Ipatinga, mostrando menor atividade nas glândulas afetadas pela poluição.

Quando o ozônio entra, via complexo estomático, inevitavelmente, há dano oxidativo, o que é evidente em locais necrosados nas folhas de *J. princeps*. Porém, como já foi dito, a taxa de injúria foliar nesse experimento não foi alta, principalmente quando se compara a taxa de ozônio em que essa planta foi submetida com plantas sensíveis. *P. guajava* 'Paluma', por exemplo, apresentou mais sintomas visuais que *J. princeps* em um experimento de campo de 60 dias com um AOT40 de aproximadamente 880 ppb.h, menos da metade aplicado nesse experimento (Furlan et al., 2007). *Ipomoea nil*, em casa de vegetação, apresentou sintomas visuais em apenas seis dias com uma média diária de 40 ppb.h⁻¹ de ozônio por seis horas diárias (Moura et al., 2011).

A cutícula e as ceras epicuticulares são possíveis barreiras contra a entrada do ozônio nas folhas das plantas (Gao et al, 2016; Li et al., 2016). Observou-se intensa destruição nas camadas de ceras epicuticulares e da cutícula, tanto em folhas jovens como em folhas adultas de *J. princeps* exposta ao ozônio. É importante ressaltar que as folhas jovens não apresentaram sintoma visual de injúria e, quando analisadas em MEV, apresentaram ceras epicuticulares mais organizadas que nas folhas adultas.

As alterações micromorfológicas encontradas nos estômatos das plantas expostas ao ozônio são semelhantes às encontradas em outras espécies (Vollenweider et al., 2013; Dumont et al., 2014). Nesse trabalho, foram evidenciadas alterações nas cristas estomáticas e degradação das células guardas, mas não foi possível verificar se os estômatos perderam a função. Em plantas estressadas, é comum encontrar estômatos fechados como sintoma de resposta a poluentes atmosféricos (Larcher, 2006). Geralmente, a baixa taxa de assimilação de CO₂, acompanhada de poucos sintomas visuais, indica fechamento estomático precoce como estratégia de evitação (Ashmore, 2005; Grulke & Heath, 2019). Diversos trabalhos demonstram influência do ozônio na fotossíntese (Hartikainen et al., 2012; Gao et al., 2016, 2017; Kinose et al., 2017; Xu et al., 2018). Análises de trocas gasosas podem fornecer respostas quanto a sensibilidade e eficiência dos estômatos em resposta ao estresse por ozônio em *J. princeps*.

A alteração no desenvolvimento das glândulas peciolares das folhas jovens ocorreu porque estas estavam expostas ao ozônio desde o início da formação. Além disso, após o rompimento da cutícula, observou-se rompimento na parede anticlinal das células do parênquima secretor em paliçada das plantas tratadas com ozônio. Esse rompimento pode ser um indício da degradação da lamela média pelo ozônio (Gao et al., 2016), reforçando a importância da cutícula na proteção contra o estresse por ozônio.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que, quando o ozônio entra em contato com o mesófilo de *J. princeps*, causa danos morfoanatômicos característicos de estresse por ozônio como protusões pecto-celulósicas nas células do mesófilo, destruição das células do parênquima paliçádido e produção de compostos fenólicos. Porém, o baixo índice de injúria foliar (IFF), as avaliações enzimáticas e de pigmentos indicam um dano foliar

relativamente baixo para uma exposição com concentrações altas de ozônio. Provavelmente, *J. princeps* apresenta mecanismos não enzimáticos de resposta a esse poluente, como os compostos fenólicos evidenciados nas plantas expostas ao ozônio ou, até mesmo, mecanismos de resistência a entrada desse poluente, como fechamento estomático.

A densa camada de ceras epicuticulares, principalmente em folhas jovens, também pode ajudar a explicar um pouco dessa resistência, porém, a entrada do ozônio nas células é diretamente proporcional a taxa de trocas gasosas e essa análise pode fornecer respostas precisas acerca da tolerância de altas concentrações desse gás em *J. princeps*.

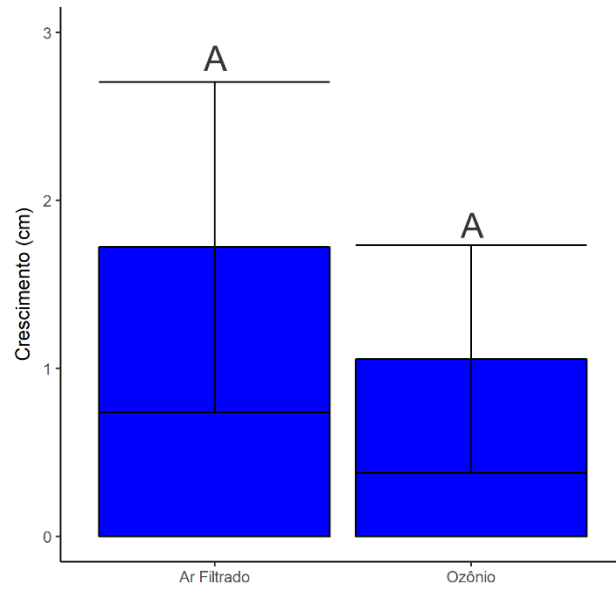


Figura 3: Crescimento relativo de *Joannesia princeps* exposta ao ozônio e a ar filtrado. 16 dias de exposição. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

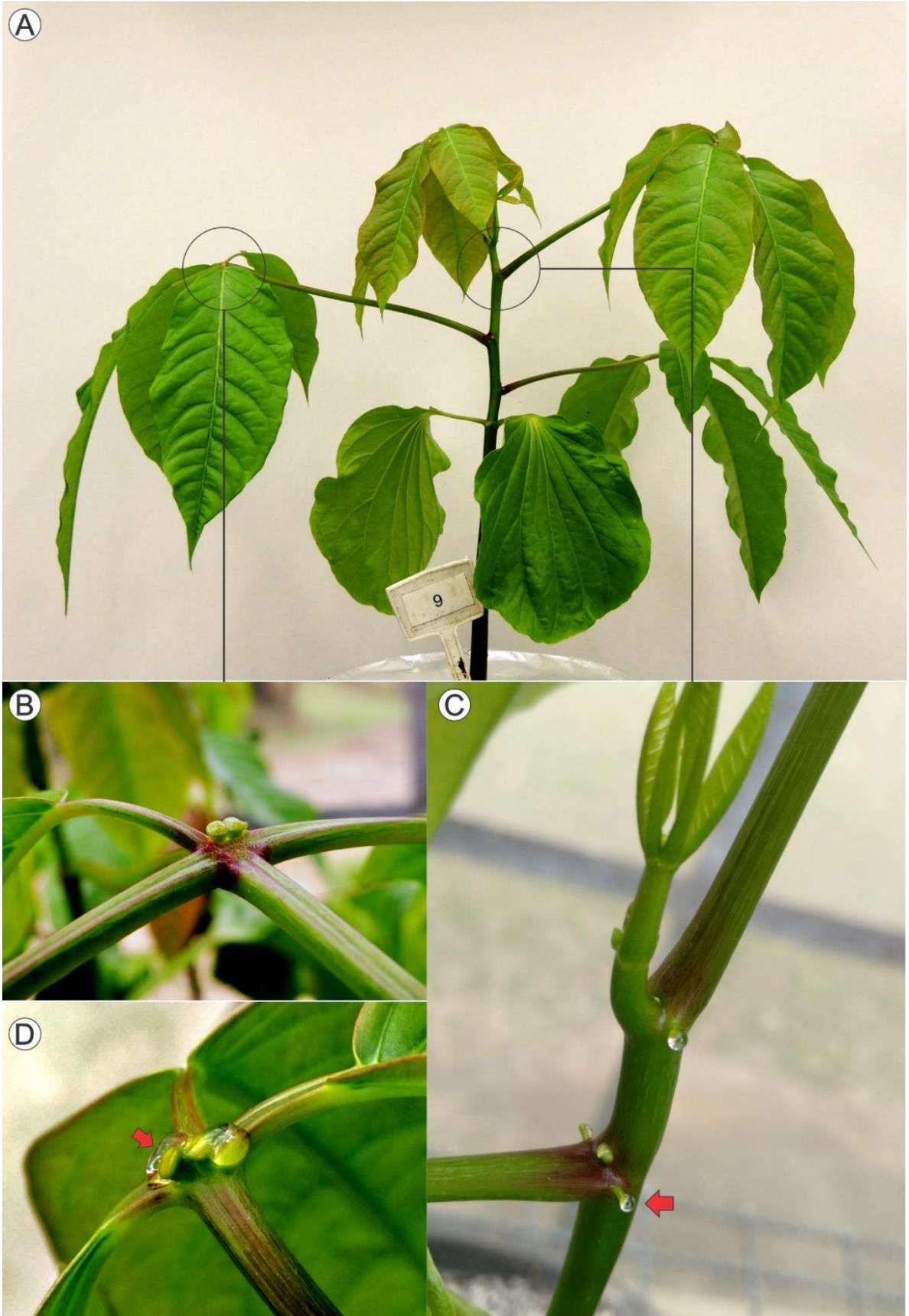


Figura 4: Caracterização morfológica de *Joannesia princeps*. A. Plântula com crescimento monopodial e totalmente desenvolvida (detalhe para glândulas). B & D. Glândulas apicais. C. Glândulas basais. Secreção exsudada (setas)

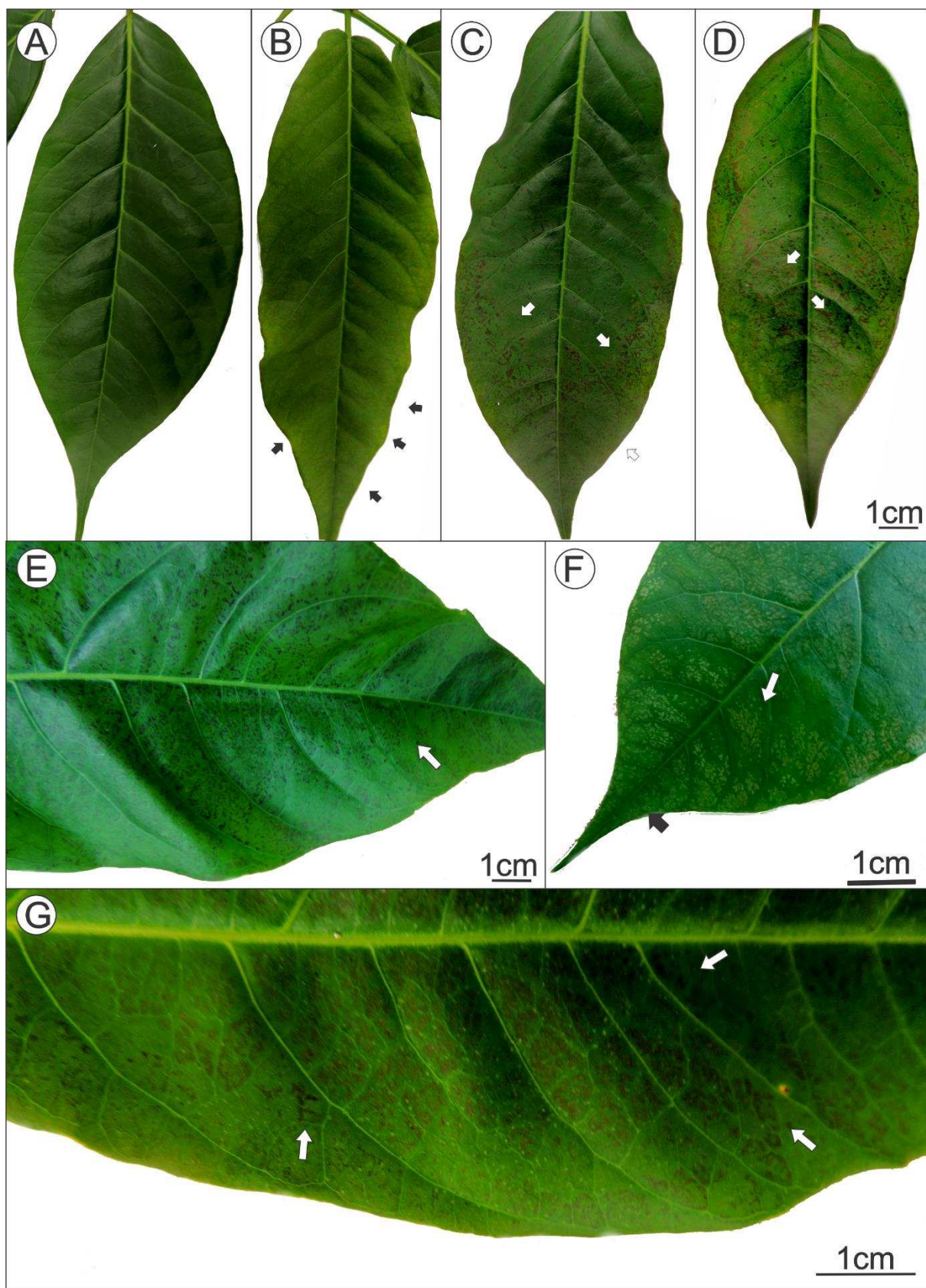


Figura 5: Sintomas foliares visíveis em *Joannesia princeps* exposta a 100ppb.h⁻¹ de ozônio por 16 dias. A-D progressão dos sintomas foliares em folhas diferentes. E. pontuações intervenais escuras. F. Pontuações claras. G. Bronzeamento. Lesões indicadas pelas setas.

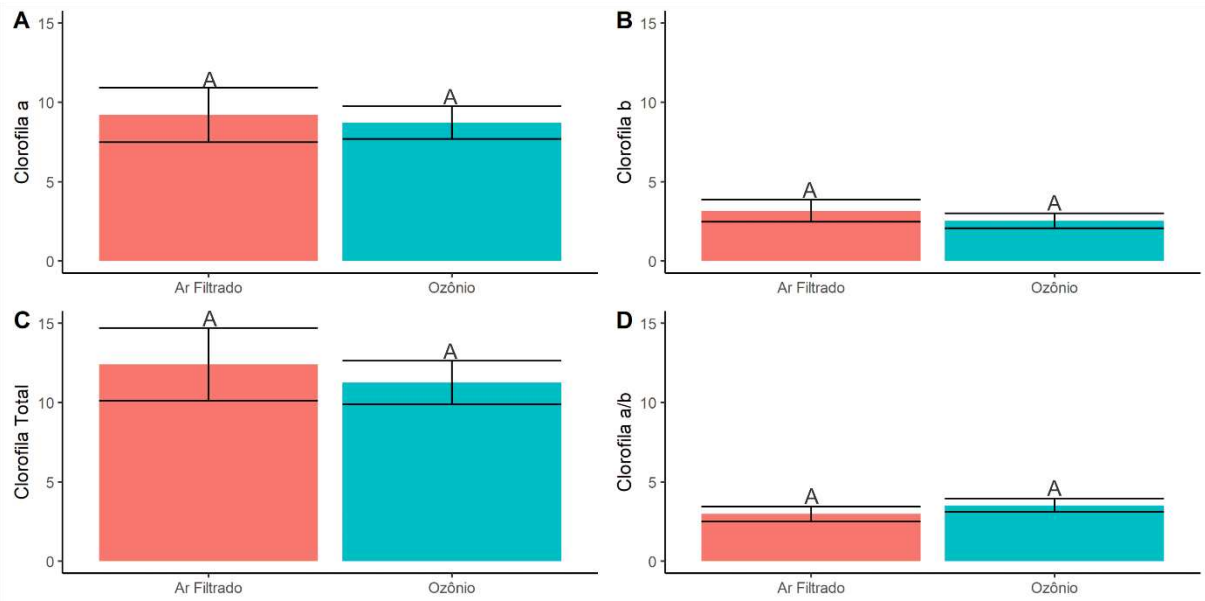


Figura 6: Teores de clorofilas a e b, clorofilas totais e relação clorofila a/b em *Joannesia princeps* expostas ao ozônio e a ar filtrado. 16 dias de exposição. Unidade: $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

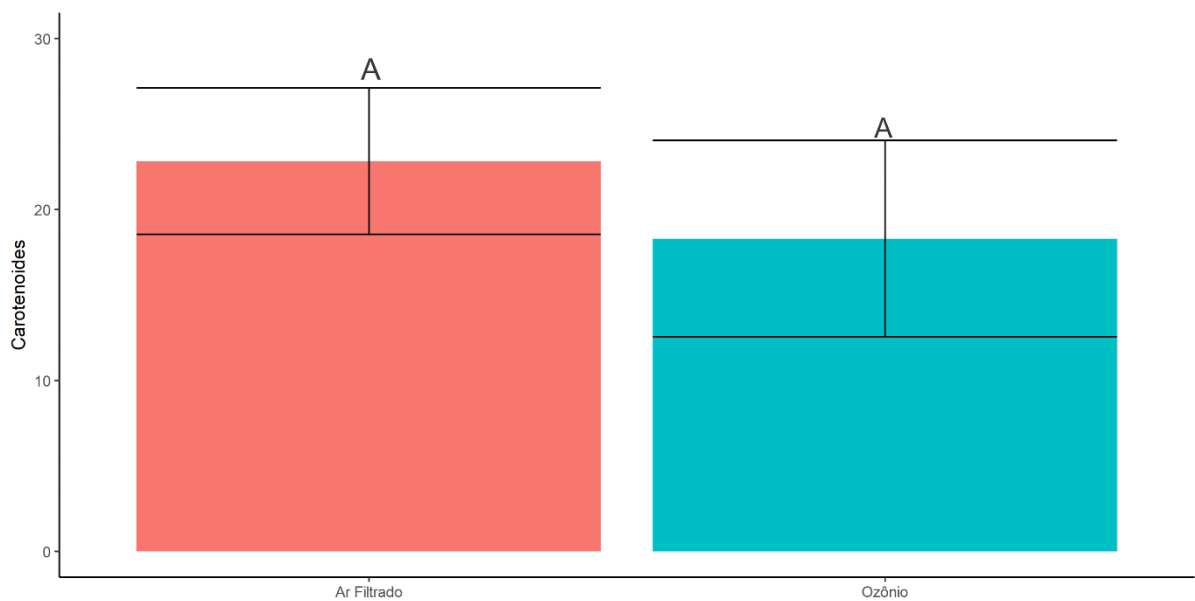


Figura 7: Teor de carotenoides em *Joannesia princeps* expostas ao ozônio e a ar filtrado. 16 dias de exposição. Unidade: $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

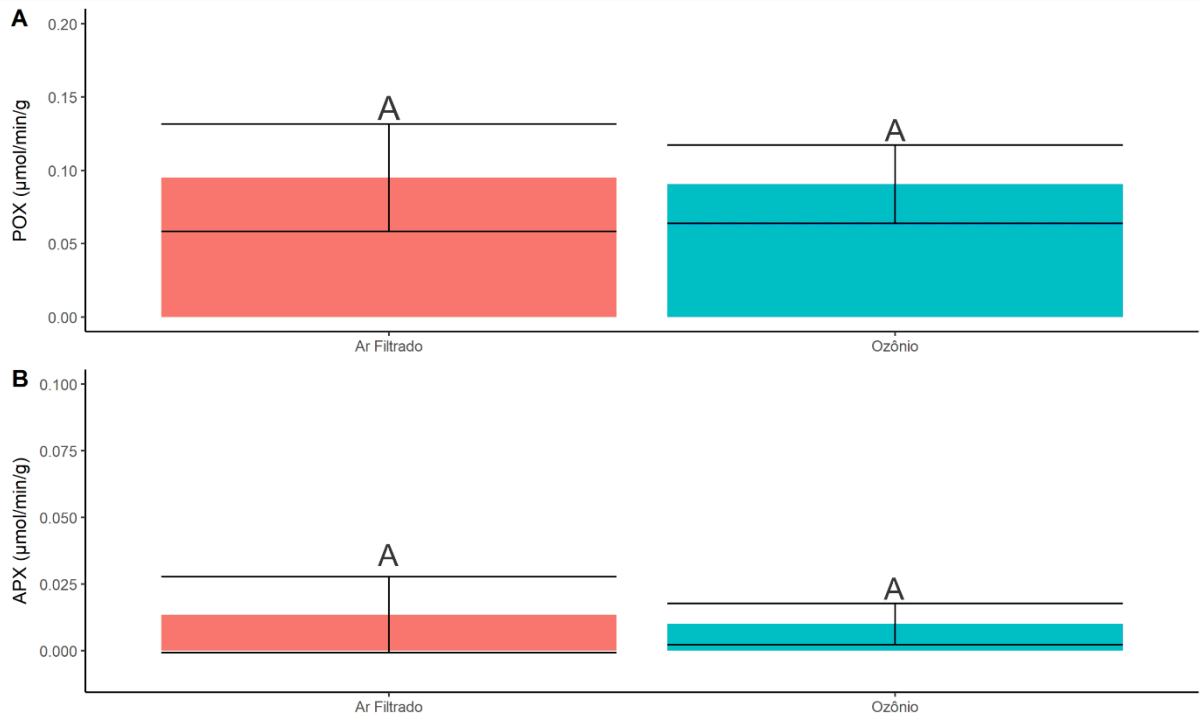


Figura 8: Concentração de Peroxidases (POX) e Peroxidase do Ascorbato (APX) em *Joannesia princeps*. 16 dias de exposição ao ozônio e a ar filtrado (controle). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

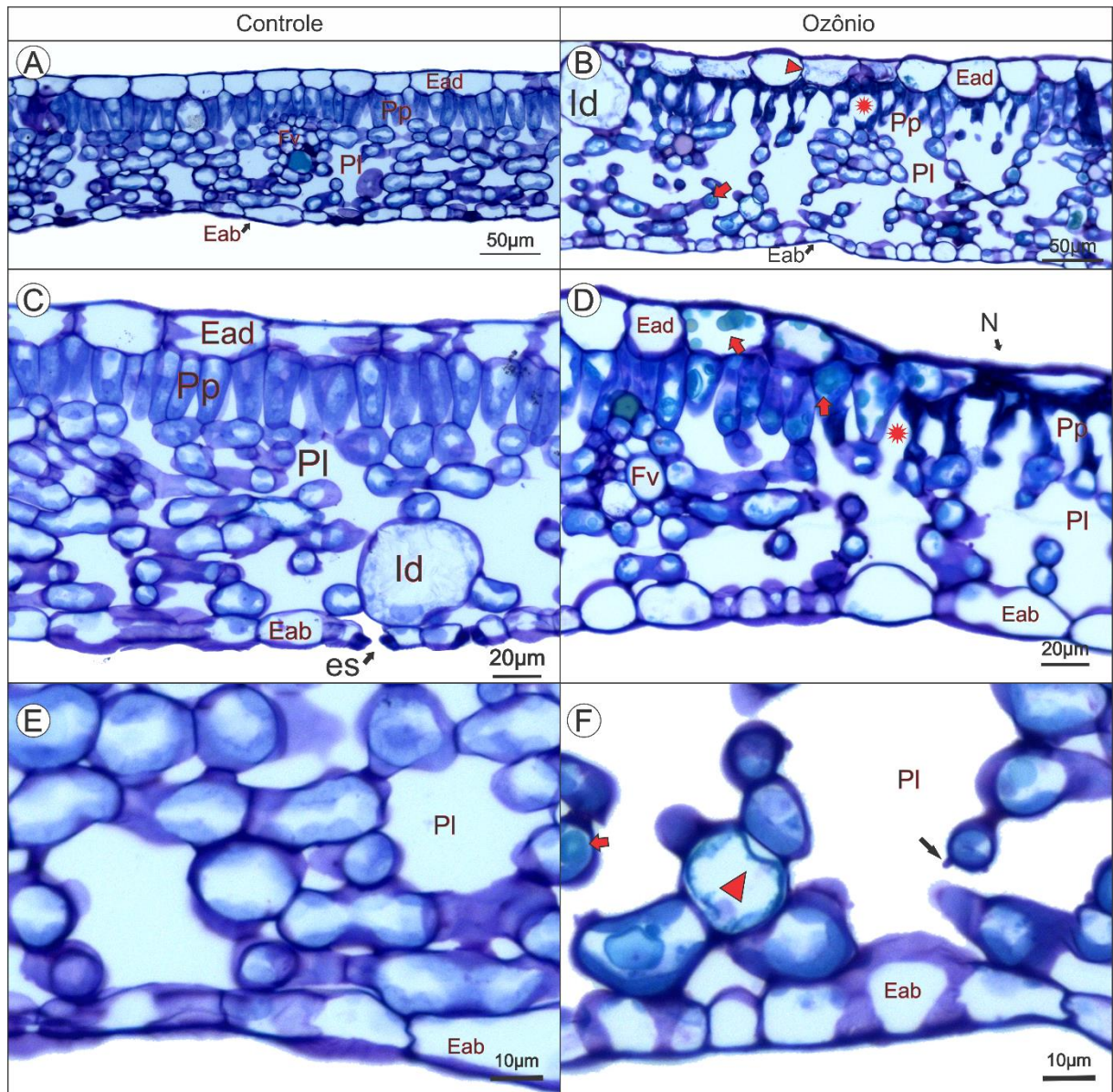


Figura 9: Anatomia de folhas de *Joannesia princeps* expostas ao ozônio 100ppb.h-1 (Azul de Toluidina) – Secções transversais. Microscopia de luz. A, C e E. Plantas controle. B, D e F. Plantas expostas ao ozônio. B. Necrose do parênquima paliçádico (Pp) e células da epiderme da face adaxial da folha (Ead) em colapso (asterisco). Retração do protoplasto nas células da epiderme (Ponta de seta). D. Compostos fenólicos nas células do parênquima e da epiderme (seta vermelha). F. Protusões péctico celulósicas na parede das células do parênquima lacunoso (PI) (seta preta) e retração do protoplasto (ponta de seta). es – estômato; Fv – Feixe vascular; Eab – Epiderme abaxial; Id – Idioblasto; N – Necrose.

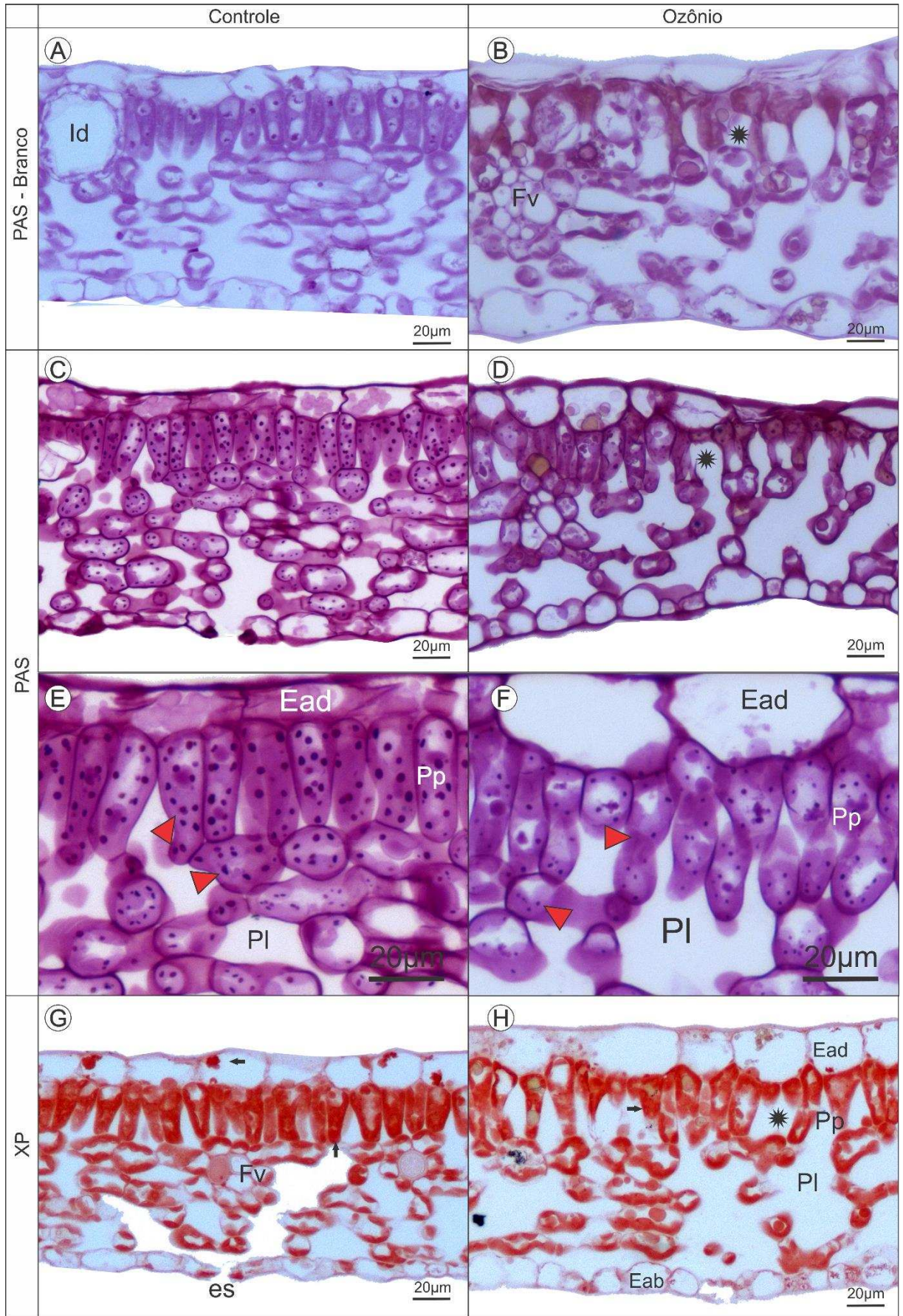


Figura 10: Caracterização histoquímica de folhas de *Joannesia princeps* expostas ao ozônio 100ppb.h-1. Microscopia de luz. Secções transversais submetidas a diferentes testes histoquímicos. A e B. Branco. C-F. Reagente de Schiff/ ácido periódico – PAS, polissacarídeos neutros corados de magenta, pequenos grãos de carboidratos podem ser observados nas células do parênquima lacunoso e parênquima paliçádico (setas vermelhas). É possível observar a diferença de quantidade de carboidratos entre o tecido necrosado (asterisco) e o tecido sadio. G e H. Xilidine Ponceau com as proteínas coradas de vermelho (pequenos corpos proteicos podem ser observados na epiderme e parênquima (setas pretas). Pp – Parênquima paliçádico; Pl – Parênquima lacunoso; Ead – Epiderme adaxial; es – estômato; Fv – Feixe vascular; Eab – Epiderme abaxial.

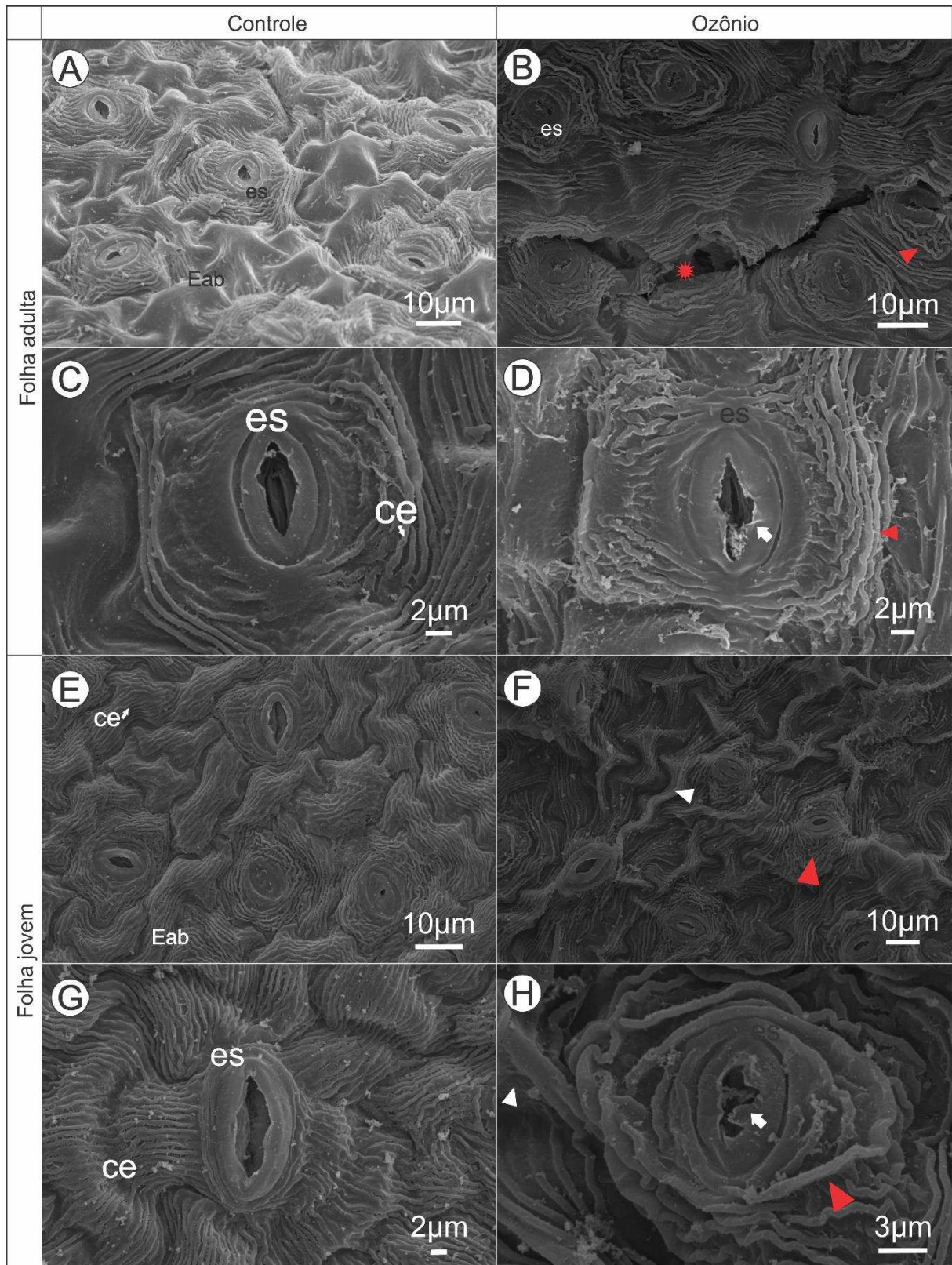


Figura 11: Folhas de *Joannesia princeps* submetidas ao tratamento com ozônio (100 ppb.h⁻¹). Microscopia Eletrônica de Varredura. Face abaxial da folha. A – D. Folhas adultas. E – H. Folhas jovens. B. Sulcos na epiderme provocados por perda de turgidez (Asterisco). F. Murcha das células da epiderme de folhas jovens. (ponta de

seta branca). B, D, F e H. Ceras epicuticulares (ce) desarranjadas (ponta de seta vermelha). D e H. Estômatos (es) com células guarda degradadas (seta branca).

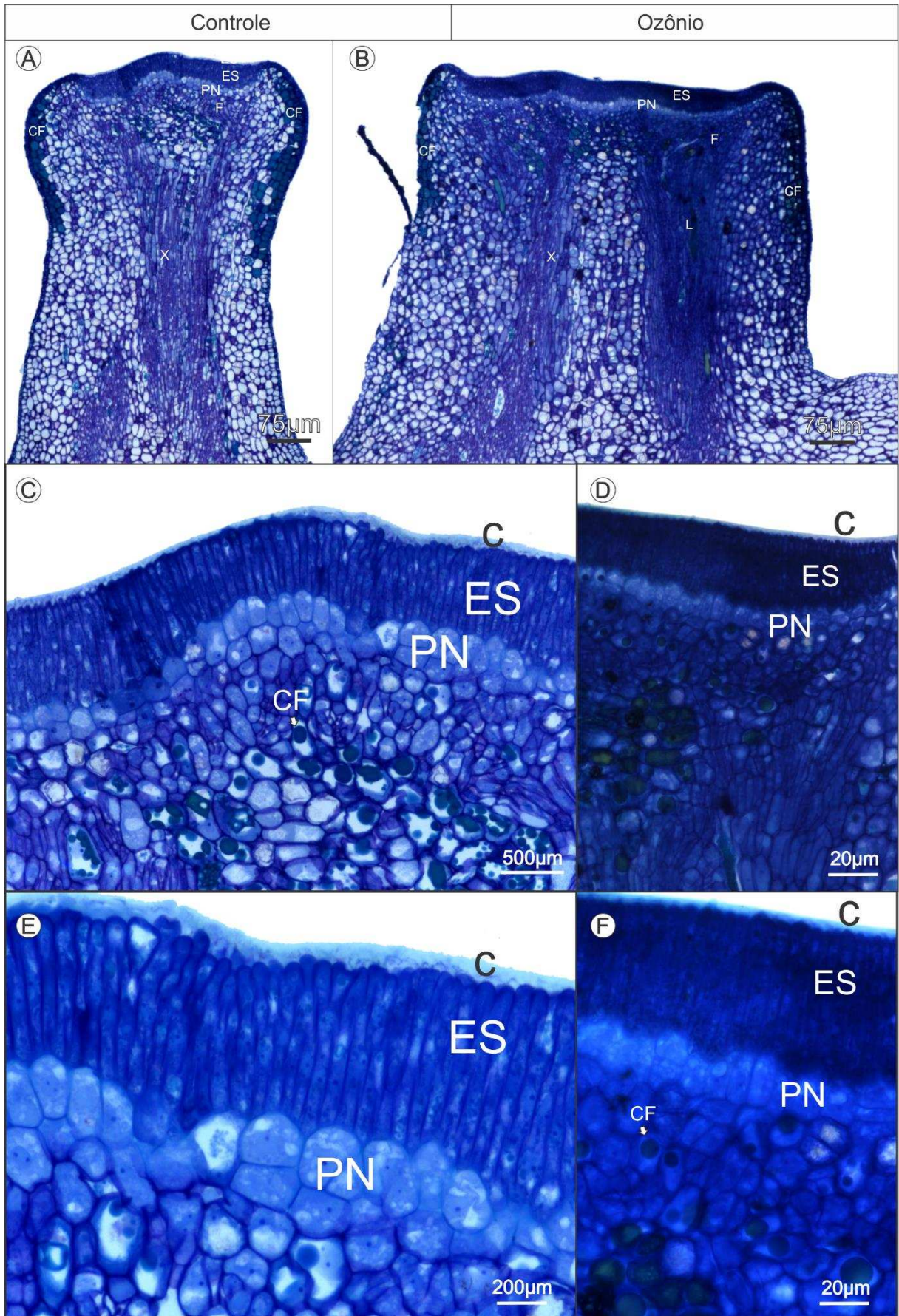


Figura 12: Anatomia de glândulas peciolares de *Joannesia princeps* exposta ao ozônio (azul de toluidina). Microscopia de luz. Secção longitudinal. A, C e E. Controle. B, D e F Plantas tratadas com ozônio (100 ppb.h-1). Plantas tratadas coradas mais intensamente que plantas controle. C – Cutícula; ES – Epiderme Secretora em paliçada; PN – Parênquima Nectarífero; CF – Compostos fenólicos; F – Floema; X – Xilema; L – Laticífero.

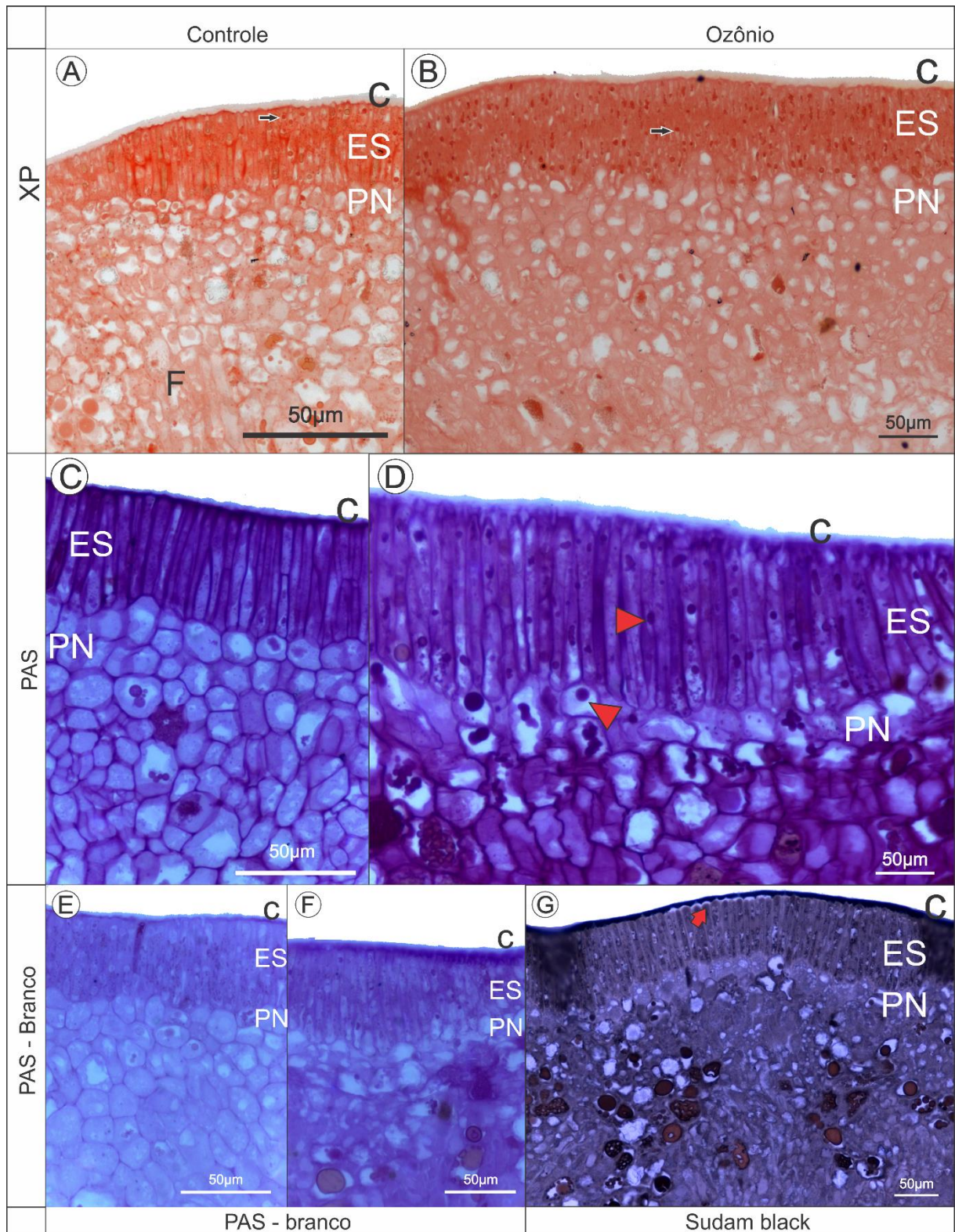


Figura 13: Caracterização histoquímica de glândulas peciolares de *Joannesia princeps* exposta ao ozônio. Microscopia de luz. Secções longitudinais submetidas a diferentes testes histoquímicos. A, C e E. Controle. B, D e F e G. Plantas tratadas com ozônio (100 ppb.h-1). A e B. Xilidine Ponceau com as proteínas coradas de vermelho (pequenos corpos proteicos podem ser observados na epiderme secretora (setas pretas). E e F. Branco do controle e do tratamento, respectivamente. C e D. Reagente de Schiff/ ácido periódico – PAS, polissacarídeos neutros corados de magenta,

pequenos grãos de carboidratos podem ser observados nas células do parênquima nectarífero e epiderme secretora (ponta de seta vermelha). Plantas tratadas coradas mais intensamente que plantas controle. G. Sudam Black evidenciando cutícula corada de preto e secreção subcuticular (seta vermelha). C – Cutícula; PS – Parênquima Secretor; PN – Parênquima Nectarífero.

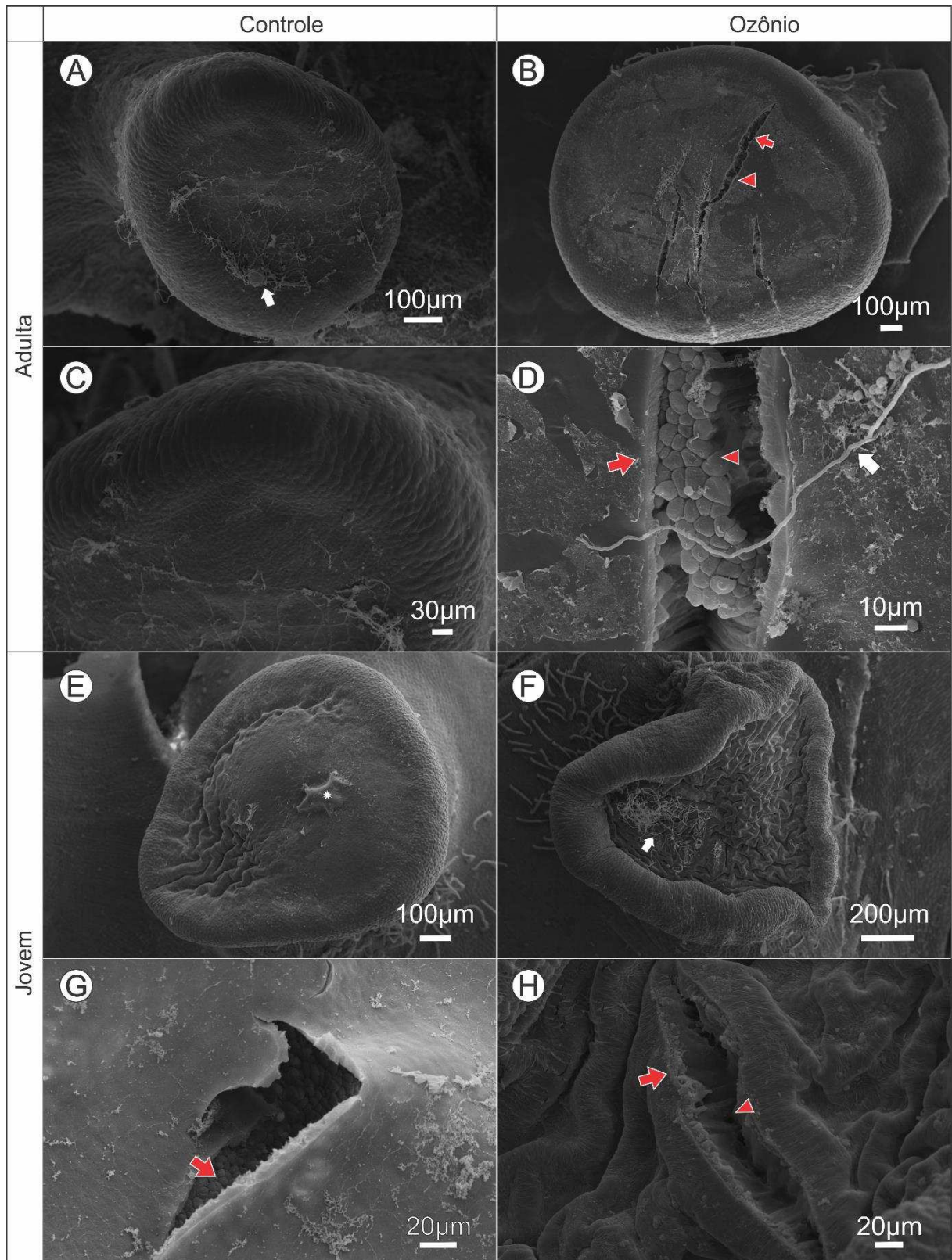


Figura 14: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de glândulas peciolares de *Joannesia princeps* submetidas ao tratamento com ozônio (100 ppb.h⁻¹). A – D. Folhas adultas. E – H. Folhas jovens. B, D, G e H. Rompimento da cutícula para liberação de secreção (seta vermelha). D e H. Detalhe para epiderme em paliçada rompida nos tratamentos com ozônio (ponta de seta). E. Protuberância de secreção

(asterisco). F. Glândula com desenvolvimento comprometido. A, D e F. Hifas fúngicas (seta branca).

7 REFERÊNCIAS

- Ainsworth, E.A., 2017. Understanding and improving global crop response to ozone pollution. *Plant J.* <https://doi.org/10.1111/tpj.13298>
- Alves, E.S., Moura, B.B., Pedroso, A.N.V., Tresmondi, F., Machado, S.R., 2016. Cellular markers indicative of ozone stress on bioindicator plants growing in a tropical environment. *Ecol. Indic.* 67, 417–424. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2016.03.011>
- Artaxo, P., Gatti, L. V., Leal, A.M.C., Longo, K.M., Freitas, S.R. de, Lara, L.L., Pauliquevis, T.M., Procópio, A.S., Rizzo, L. V., 2005. Química atmosférica na Amazônia: a floresta e as emissões de queimadas controlando a composição da atmosfera amazônica. *Acta Amaz.* 35, 185–196. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672005000200008>
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85, 235–241. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04728.x>
- Ashmore, M.R., 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell Environ.* 28, 949–964. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01341.x>
- Beneš, K., 1964. Detection of lipids in the plant meristematic cell with the aid of Sudan black staining. *Biol. Plant.* 6, 142–151. <https://doi.org/10.1007/BF02926669>
- Bergmann, E., Bender, J., Weigel, H.J., 2017. Impact of tropospheric ozone on terrestrial biodiversity: A literature analysis to identify ozone sensitive taxa. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 90, 83–105. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2017.090.012>
- Bhering, L.L., 2017. Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 17, 187–190. <https://doi.org/10.1590/1984-70332017v17n2s29>
- Borges, R.A.X., 2012. Centro Nacional de Conservação da Flora - CNCFlora [WWW Document]. URL [http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Joannesia princeps](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Joannesia_princeps) (accessed 6.19.18).
- Bozzola, J.J., Russel, L.D., 1992. *Electronmicroscopy*. Jones and Bartlett Publishers,

Boston.

Brandão, S.E., Bulbovas, P., Lima, M.E.L., Domingos, M., 2017. Biochemical leaf traits as indicators of tolerance potential in tree species from the Brazilian Atlantic Forest against oxidative environmental stressors. *Sci. Total Environ.* 575, 406–417. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.10.006>

Calatayud, V., Cerveró, J., Sanz, M.J., 2007. Foliar, physiological and growth responses of four maple species exposed to ozone. *Water. Air. Soil Pollut.* 185, 239–254. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9446-5>

Cardoso-gustavson, P., Bolsoni, V.P., Oliveira, D.P. De, Tereza, M.G.G., Aidar, M.P.M., Marabesi, M.A., Alves, E.S., Souza, S.R. De, 2014. Ozone-Induced Responses in *Croton floribundus* Spreng . (Euphorbiaceae): Metabolic Cross-Talk between Volatile Organic Compounds and Calcium Oxalate Crystal Formation. *PLoS One* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105072>

Carvalho, P.E.R., 2014. *Espécies Arbóreas Brasileiras*, 1st ed. Embrapa, Brasília, DF.

Carvalho, P.E.R., 2005. *Boleira*. Circ. técnica da Empres. Bras. Pesqui. Agropecuária - EMBRAPA 1–9.

Castro, L., 2008. Utilização de caracteres morfoanatômicos na avaliação do efeito de poluentes em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae). Dissertação: Universidade Federal de Viçosa.

CETESB, 2017. *Qualidade do ar no estado de São Paulo 2016*. CETESB, São Paulo.

CETESB, 2014. *Avaliação dos Níveis de Ozônio Troposférico (AOT40) com referência à proteção da vegetação no estado de São Paulo*. CETESB, São Paulo.

CETESB, 2000. *Estudo do comportamento do ozônio na Região Metropolitana de São Paulo*. CETESB, São Paulo.

Chance, B., Maehly, A.C., 2004. Assay of catalases and peroxidases, in: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 764–775. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(55)02300-8)

Chappelka, A., Renfro, J., Somers, G., Nash, B., 1997. Evaluation of ozone injury on foliage of black cherry (*Prunus serotina*) and tall milkweed (*Asclepias exaltata*) in Great

Smoky Mountains National Park. *Environ. Pollut.* 95, 13–18.
[https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00120-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00120-0)

Dębski, H., Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., Bączek, N., Piechota, M., Horbowicz, M., 2017. The effect of tropospheric ozone on flavonoids and pigments content in common buckwheat cotyledons. *Ecol. Chem. Eng. S* 24, 457–465.
<https://doi.org/10.1515/eces-2017-0031>

Denman, K.L. (Co), Brasseur, G. (Co), 2007. Couplings Between Changes in the Climate System and Biogeochemistry Couplings Between Changes in the Climate System and Biogeochemistry Chapter 7. J. Feichter *Clim. Chang.*

Domingos, M., Bulbovas, P., Camargo, C.Z.S., Aguiar-Silva, C., Brandão, S.E., Dafré-Martinelli, M., Dias, A.P.L., Engela, M.R.G.S., Gagliano, J., Moura, B.B., Alves, E.S., Rinaldi, M.C.S., Gomes, E.P.C., Furlan, C.M., Figueiredo, A.M.G., 2015. Searching for native tree species and respective potential biomarkers for future assessment of pollution effects on the highly diverse Atlantic Forest in SE-Brazil. *Environ. Pollut.* 202, 85–95. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2015.03.018>

Dumont, J., Cohen, D., Gérard, J., Jolivet, Y., Dizengremel, P., Le Thiec, D., 2014. Distinct responses to ozone of abaxial and adaxial stomata in three Euramerican poplar genotypes. *Plant, Cell Environ.* 37, 2064–2076.
<https://doi.org/10.1111/pce.12293>

Epstein, E., 1975. *Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas*. Livros Téc. ed. Universidade de São Paulo, Rio de Janeiro.

Esposito, M.P., Ferreira, M.L., Sant’Anna, S.M.R., Domingos, M., Souza, S.R., 2009. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum* “Bel-W3” under environmental conditions in São Paulo, SE - Brazil. *Atmos. Environ.* 43, 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.10.006>

Faoro, F., Iriti, M., 2005. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biol. Plant.* 49, 585–592. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-0053-2>

Feng, Z., Hu, E., Wang, X., Jiang, L., Liu, X., 2015. Ground-level O₃ pollution and its impacts on food crops in China: A review. *Environ. Pollut.* 199, 42–48.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2015.01.016>

- Feng, Z., Pang, J., Nouchi, I., Kobayashi, K., Yamakawa, T., Zhu, J., 2010. Apoplastic ascorbate contributes to the differential ozone sensitivity in two varieties of winter wheat under fully open-air field conditions. *Environ. Pollut.* 158, 3539–3545. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2010.08.019>
- Feng, Z., Sun, J., Wan, W., Hu, E., Calatayud, V., 2014. Evidence of widespread ozone-induced visible injury on plants in Beijing, China. *Environ. Pollut.* 193, 296–301. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.06.004>
- Fernandes, F.F., Cardoso-Gustavson, P., Alves, E.S., 2016. Synergism between ozone and light stress: structural responses of polyphenols in a woody Brazilian species. *Chemosphere* 155, 573–582. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.04.076>
- Fernandes, F.F., Esposito, M.P., da Silva Engela, M.R.G., Cardoso-Gustavson, P., Furlan, C.M., Hoshika, Y., Carrari, E., Magni, G., Domingos, M., Paoletti, E., 2019. The passion fruit liana (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae) is tolerant to ozone. *Sci. Total Environ.* 656, 1091–1101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.425>
- Finlayson-Pitts, B.J., Pitts, J.N., 1997. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* 276, 1045–52. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.276.5315.1045>
- Freedman, B., 1996. *Environmental Ecology: The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses*, 2nd ed. Academic Press Inc, San Diego. 606p.
- Fuhrer, J., 2009. Ozone risk for crops and pastures in present and future climates. *Naturwissenschaften* 96, 173–194. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0468-7>
- Fuhrer, J., Val Martin, M., Mills, G., Heald, C.L., Harmens, H., Hayes, F., Sharps, K., Bender, J., Ashmore, M.R., 2016. Current and future ozone risks to global terrestrial biodiversity and ecosystem processes. *Ecol. Evol.* 6, 8785–8799. <https://doi.org/10.1002/ece3.2568>
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Salatino, A., Sanz, M.J., 2007. *Psidium guajava* “Paluma” (the guava plant) as a new bio-indicator of ozone in the tropics. *Environ. Pollut.* 147, 691–695. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.09.014>

Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Sanz, M.J., Domingos, M., Salatino, A., 2008. *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn., a native Atlantic Forest species, as a bio-indicator of ozone: Visible injury. *Environ. Pollut.* 152, 361–365. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2007.06.042>

Gao, F., Calatayud, V., García-Breijo, F., Reig-Armiñana, J., Feng, Z., 2016. Effects of elevated ozone on physiological, anatomical and ultrastructural characteristics of four common urban tree species in China. *Ecol. Indic.* 67, 367–379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.012>

Gao, F., Catalayud, V., Paoletti, E., Hoshika, Y., Feng, Z., 2017. Water stress mitigates the negative effects of ozone on photosynthesis and biomass in poplar plants. *Environ. Pollut.* 230, 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.044>

Ghude, S.D., Jena, C., Chate, D.M., Beig, G., Pfister, G.G., Kumar, R., Ramanathan, V., 2014. Reductions in India's crop yield due to ozone. *Geophys. Res. Lett.* 41, 5685–5691. <https://doi.org/10.1002/2014GL060930>

Gulke, N., Heath, R.L., 2019. Ozone effects on plants in natural ecosystems. *Plant Biol.* <https://doi.org/10.1111/plb.12971>

Guerrero, C.C., Günthardt-Goerg, M.S., Vollenweider, P., 2013. Foliar Symptoms Triggered by Ozone Stress in Irrigated Holm Oaks from the City of Madrid, Spain. *PLoS One* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069171>

Hartikainen, K., Riikonen, J., Nerg, A.M., Kivimäenpää, M., Ahonen, V., Tervahauta, A., Kärenlampi, S., Mäenpää, M., Rousi, M., Kontunen-Soppela, S., Oksanen, E., Holopainen, T., 2012. Impact of elevated temperature and ozone on the emission of volatile organic compounds and gas exchange of silver birch (*Betula pendula* Roth). *Environ. Exp. Bot.* 84, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.014>

Havir, E.A., McHale, N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 84, 450–5. <https://doi.org/10.1104/PP.84.2.450>

Holmes, C.D., 2014. Air pollution and forest water use. *Nature* 507, E1–E2. <https://doi.org/10.1038/nature13113>

Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities

during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiol.* 57, 315–9. <https://doi.org/10.1104/PP.57.2.315>

Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137. <https://doi.org/10.1038/srep27790>

Kinose, Y., Fukamachi, Y., Okabe, S., Hiroshima, H., Watanabe, M., Izuta, T., 2017. Photosynthetic responses to ozone of upper and lower canopy leaves of *Fagus crenata* Blume seedlings grown under different soil nutrient conditions. *Environ. Pollut.* 223, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.014>

Kitao, M., Yasuda, Y., Kominami, Y., Yamanoi, K., Komatsu, M., Miyama, T., Mizoguchi, Y., Kitaoka, S., Yazaki, K., Tobita, H., Yoshimura, K., Koike, T., Izuta, T., 2016. Increased phytotoxic O₃ dose accelerates autumn senescence in an O₃-sensitive beech forest even under the present-level O₃. *Sci. Rep.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep32549>

Ladd, I., Sachs, S., 2004. Using Sensitive Plants as Bioindicators of Ground Level Ozone Pollution. NASA Langley Res. Cent. 44p.

Lagzi, M.; Mészáros, R.; Gelybó, G.; Leelőssy, Á., 2013. Atmospheric Chemistry, 1st ed. ELTE Faculties of Science Student Foundation, ITStudy Hungary Ltd, Hungria. disponível em: https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0073_atmospheric_chemistry/ch08.html. Acesso em: 20/02/2019.

Larcher, W., 2006. *Ecofisiologia Vegetal*, 4ed ed. RiMa, São Carlos - SP. Brazil. 521p.

Li, P., Calatayud, V., Gao, F., Uddling, J., Feng, Z., 2016. Differences in ozone sensitivity among woody species are related to leaf morphology and antioxidant levels. *Tree Physiol.* 36, 1105–1116. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpw042>

Ljubešić, N., Britvec, M., 2006. Tropospheric ozone-induced structural changes in leaf mesophyll cell walls in grapevine plants. *Biologia (Bratisl.)* 61. <https://doi.org/10.2478/s11756-006-0012-1>

Moura, B.B., Alves, E.S., 2014. Climatic factors influence leaf structure and thereby affect the ozone sensitivity of *Ipomoea nil* “Scarlet O’Hara.” *Environ. Pollut.* 194, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.042>

Moura, B.B., Alves, E.S., Marabesi, M.A., de Souza, S.R., Schaub, M., Vollenweider,

- P., 2018. Ozone affects leaf physiology and causes injury to foliage of native tree species from the tropical Atlantic Forest of southern Brazil. *Sci. Total Environ.* 610–611, 912–925. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.130>
- Moura, B.B., Souza, S.R. de, Alves, E.S., 2014. Response of Brazilian native trees to acute ozone dose. *Environ. Pollut.* 21, 4220–4227. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2326-1>
- Moura, B.B., Souza, S.R. De, Alves, E.S., 2011. Structural responses of *Ipomoea nil* (L.) Roth 'Scarlet O'Hara' (Convolvulaceae) exposed to ozone. *Acta Botanica Brasilica.* 25, 122–129. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062011000100015>
- Novak, K., Skelly, J.M., Schaub, M., Kräuchi, N., Hug, C., Landolt, W., Bleuler, P., 2003. Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environ. Pollut.* 125, 41–52. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00085-X)
- O'Brien, T.P., McCully, M.E., 1981. The study of plant structure principles and select methods. *Terrestrial Plant Ecology*, Melbourne. 45p.
- Oksanen, E., Kontunen-Soppela, S., Riikonen, J., Peltonen, P., Uddling, J., Vapaavuori, E., 2007. Northern environment predisposes birches to ozone damage. *Plant Biol.* 9, 191–196. <https://doi.org/10.1055/s-2006-924176>
- Papazian, S., Khaling, E., Bonnet, C., Lassueur, S., Reymond, P., Moritz, T., Blande, J.D., Albrechtsen, B.R., 2016. Central Metabolic Responses to Ozone and Herbivory Affect Photosynthesis and Stomatal Closure. *Plant Physiol.* 172, 2057–2078. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01318>
- Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemistry: theoretical and applied*. Vol. II. 4. ed. Longman Group Limited. Edinburgh. 624p.
- Pedroso, A.N.V., 2007. *Poluentes Atmosféricos & Plantas Bioindicadoras*. 18p.
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim RR, M.M., 1999. Aluminium effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11, 137–143. ISSN: 0103-3131
- Pellinen, R., Palva, T., Kangasjarvi, J., 1999. Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J.* 20, 349–356. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00613.x>

Royal Society, 2008. Ground-level ozone in the 21st century: future trends, impacts and policy implications.

Santos, A.C. da R., Furlan, C.M., 2013. Levels of phenolic compounds in *Tibouchina pulchra* after fumigation with ozone. *Atmos. Pollut. Res.* 4, 250–256. <https://doi.org/10.5094/APR.2013.027>

Sant'Anna-Santos, B.F., Azevedo, A.A., 2007. Aspectos morfoanatômicos da fitotoxidez do flúor em duas espécies arbóreas tropicais. *Rev. Bras. Biociências* 5, 48–50.

Sant'Anna, S.M.R., Esposito, M.P., Domingos, M., Souza, S.R., 2008. Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Environ. Pollut.* 151, 389–394. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2007.06.013>

Scarano, F.R., 2002. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rainforest. *Ann. Bot.* 90, 517–524. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf189>

Silva, D.R., 2015. Efeitos da poluição atmosférica de Ipatinga - MG sobre *Joannesia princeps* vell. (Euphorbiaceae) com ênfase nos nectários extraflorais. Universidade Federal de Viçosa (Dissertação). 82p.

Silva, L.C., Azevedo, A.A., Monteiro Da Silva, E.A., Oliva, M.A., 2005. Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). *Aust. J. Bot.* 53, 789–796. <https://doi.org/10.1071/BT04096>

Sousa, O.V. de, Fioravante, I.A., Yamamoto, C.H., Alves, M.S., Del-Vechio-Vieira, G., Araújo, A. da L.A. de, 2007. Propriedades biológicas das sementes de *Joannesia princeps* Vellozo. *HU Rev.* 33, 23–27.

Souza, S.R., Pagliuso, J.D., 2009. Design and assembly of an experimental laboratory for the study of atmosphere–plant interactions in the system of fumigation chambers. *Environ. Monit. Assess.* 158, 243–249. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0578-x>

Spadeto, C., Wilson Fernandes, G., Negreiros, D., Kunz, S.H., 2017. Facilitative effects of tree species on natural regeneration in an endangered biodiversity hotspot. *Brazilian J. Bot.* 40, 943–950. <https://doi.org/10.1007/s40415-017-0408-x>

- Vaionen, J.P., Kangasjärvi, J., 2015. Plant signalling in acute ozone exposure. *Plant. Cell Environ.* 38, 240–252. <https://doi.org/10.1111/pce.12273>
- Van Dingenen, R., Dentener, F.J., Raes, F., Krol, M.C., Emberson, L., Cofala, J., 2009. The global impact of ozone on agricultural crop yields under current and future air quality legislation. *Atmos. Environ.* 43, 604–618. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.10.033>
- VDI, 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Standardized tobacco exposure, Beuth, Berlin.
- Vidal, B. de C., 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. *Ann. Histochem.* 15, 289–96.
- Vollenweider, P., Fenn, M.E., Menard, T., Günthardt-Goerg, M., Bytnerowicz, A., 2013. Structural injury underlying mottling in ponderosa pine needles exposed to ambient ozone concentrations in the San Bernardino Mountains near Los Angeles, California. *Trees* 27, 895–911. <https://doi.org/10.1007/s00468-013-0843-7>
- Vollenweider, P., Günthardt-Goerg, M.S., 2005. Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environ. Pollut.* 137, 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.01.032>
- Vollenweider, P., Ottiger, M., Günthardt-Goerg, M., 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environ. Pollut.* 124, 101–118. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00412-8](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00412-8)
- Wellburn, A.R., 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Xu, Y., Shang, B., Yuan, X., Feng, Z., Calatayud, V., Bordotti, S., Esposito, N., 2018. Relationships of CO₂ assimilation rates with exposure- and flux-based O₃ metrics in three urban tree species. *Sci. Total Environ.* 613–614, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.058>