

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Abordagem morfoanatômica e metabólica dos efeitos multidimensionais do
herbicida glifosato em espécies nativas do Cerrado e Mata Atlântica**

Hugo Humberto de Araújo
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

HUGO HUMBERTO DE ARAÚJO

**Abordagem morfoanatômica e metabólica dos efeitos multidimensionais do
herbicida glifosato em espécies nativas do Cerrado e Mata Atlântica**

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

Orientadora: Luzimar Campos da Silva

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A663a
2025

Araújo, Hugo Humberto de, 1997-

Abordagem morfo-anatômica e metabólica dos efeitos multidimensionais do glifosato em espécies nativas do cerrado e mata atlântica / Hugo Humberto de Araújo. – Viçosa, MG, 2025.
1 tese eletrônica (122 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Luzimar Campos da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.587>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Plantas - Efeito dos herbicidas. 2. Plantas - Fisiologia.
3. Nectários. 4. Floração. 5. Secreções vegetais. 6. Herbicidas.
7. Meio ambiente - Conservação. 8. Bioquímica vegetal. I. Silva,
Luzimar Campos da, 1971-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação
em Botânica. III. Título.

CDD 22. ed. 632.954

HUGO HUMBERTO DE ARAÚJO

Abordagem morfoanatômica e metabólica dos efeitos multidimensionais do herbicida glifosato em espécies nativas do Cerrado e Mata Atlântica

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

APROVADA: 3 de setembro de 2025.

Assentimento:

Hugo Humberto de Araújo
Autor

Luzimar Campos da Silva
Orientadora

Essa tese foi assinada digitalmente pelo autor em 15/09/2025 às 13:46:10 e pela orientadora em 15/09/2025 às 14:01:17. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **EEJC.QQH8.V657** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pelo acolhimento e por possibilitarem a minha formação e a realização desta pesquisa.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal, em especial Aristéa e Renata, por todos os conhecimentos transmitidos nas disciplinas, pelo esclarecimento de dúvidas e pelas oportunidades de aprendizado junto a vocês.

À professora Luzimar, pela orientação, pela amizade e por sempre confiar no meu trabalho. Obrigado pela parceria ao longo desses anos, por todo o conhecimento compartilhado e por todas as oportunidades!

Ao “Grupo de Estudos da Luzimar”, Graciele, Júlia, Pedro, Vanessa, Danielle, Camila, Michel e Franklin e às recém-chegadas Júnia e Paula, pelo apoio e ajuda nas coletas e no processamento das amostras, além das valiosas discussões e ensinamentos ao longo do doutorado.

Em especial, agradeço a Graciele e Júlia, pelo companheirismo, pela ajuda de bom grado, sempre com muita eficiência e boas risadas. Obrigado por estarem sempre presentes, pela amizade e por toda a ajuda no cultivo, na coleta, no processamento e nas análises das amostras. Adoro vocês e adoro trabalhar com vocês!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Letícia, Danizete, Graciele, Júlia, Júnia, Pedro, João, Luís, Vic, Vanessa, Gabriel, Monia, Bruno e todos os demais, pela ajuda nas coletas, pelos momentos agradáveis fora do laboratório e pelas risadas no cafezinho. Em especial, às técnicas Aurora e Rosana, pela agradável companhia diária, pela ajuda e pelas palavras de incentivo e acolhimento nos momentos difíceis.

Em especial, agradeço ao Danizete e Letícia, pela amizade, apoio no processamento das amostras para ultraestrutura e todos os momentos de descontração no laboratório e palavras de carinho e motivação que foram muito importantes.

Aos colegas de outros laboratórios, pela ajuda e parceria no processamento das amostras e nas análises, em especial a Vinícius, Ana, Jailson e Raylla, Dilma, João Paulo e aos professores Fábio, Jurací e

Luciano, por abrirem as portas de seus laboratórios.

Aos meus pais, José e Everalda, aos meus irmãos Tiago e Carla, aos meus cunhados Flávio e Karina e aos meus sobrinhos João Vitor, Felipe, Maria Luísa e Manu, pelo apoio e pelo amor incondicional, mesmo à distância. Obrigado por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as etapas.

Ao meu namorado, Kaike, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelas palavras de apoio e incentivo nas fases difíceis, pelos merecidos descansos aos fins de semana e pela paciência nesta etapa tão singular. Obrigado por ser minha família e meu refúgio neste período desafiador! Amo você!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram e contribuíram para este trabalho e para a minha jornada durante o doutorado, o meu muito obrigado!

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido”.
(Marie Curie)

RESUMO

ARAÚJO, Hugo Humberto de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2025. **Abordagem morfoanatômica e metabólica dos efeitos multidimensionais do herbicida glifosato em espécies nativas do Cerrado e Mata Atlântica.** Orientadora: Luzimar Campos da Silva.

O uso indiscriminado e o manejo incorreto do glifosato podem promover efeitos indesejados, como a contaminação do solo, da água e de organismos não alvo, inclusive espécies vegetais nativas. Os efeitos deste herbicida na porção aérea das plantas são bem documentados. No entanto, existem muitas lacunas sobre os efeitos no sistema radicular, na reprodução e em estruturas secretoras de defesa vegetal, especialmente em espécies não alvo. A hipótese de estudo é que o glifosato, mesmo em doses abaixo das utilizadas convencionalmente em campo, pode promover danos multidimensionais em espécies nativas não alvo comprometendo a interação entre porção aérea e radicular, além de danos durante a floração e em estruturas de defesa. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos multidimensionais promovidos pelo glifosato em plantas nativas em três perspectivas: (i) avaliar seus potenciais efeitos na interação entre parte aérea e sistema radicular de *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae), (ii) investigar os impactos na fase reprodutiva de *Cochlospermum regium* (Bixaceae), (iii) avaliar os impactos em nectários extraflorais (NEFs) de *Joannesia princeps* (Euphorbiaceae). Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, onde as plantas foram expostas ao glifosato em diferentes doses: 0 (controle), 180, 360, 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (gramas do equivalente ácido por hectare) . Para avaliação dos impactos do herbicida foram feitas análises de alterações visuais, análises estruturais em microscopia de luz e eletrônica, além de avaliações fisiológicas e metabólicas. Quando pertinente, os dados foram submetidos à análise estatística para comparação dos resultados. Em *E. contortisiliquum*, os efeitos do glifosato foram observados tanto a curto quanto a longo prazo. Inicialmente, os danos se concentraram em tecidos jovens e ativos, mas, a longo prazo, estenderam-se para toda a planta. Houve aumento da peroxidação lipídica, redução de pigmentos fotossintéticos e assimilação de CO₂, acúmulo de amido, queda nos níveis de açúcares, aminoácidos e proteínas, além de alteração na produção de compostos fenólicos. Danos estruturais e visuais ocorreram em folhas e raízes, evidenciando a sensibilidade da espécie e que as respostas entre as porções aérea e radicular estão relacionadas. Em *C. regium*, o herbicida comprometeu ápices caulinares e botões florais, mesmo em doses inferiores às utilizadas em campo. Nas menores doses, houve atraso no

desenvolvimento floral. Nas maiores doses, ocorreram gemas múltiplas, senescência de estípulas, colapso de tricomas e alterações na morfologia de idioblastos e laticíferos. Nenhuma planta tratada atingiu a antese, sugerindo atraso na floração, comprometendo a reprodução da espécie. Em *J. princeps*, nectários extraflorais apresentaram clorose, necrose e abscisão precoce. O herbicida causou colapso epidérmico, alterações em plastídios e mitocôndrias, vacuolização e redução de proteínas, carboidratos e fenóis. O volume e a qualidade do néctar foram reduzidos, o que pode afetar interações ecológicas mediadas por NEFs. Nossos resultados confirmaram a hipóteses de estudo e contemplam os objetivos propostos. O glifosato promoveu alterações multidimensionais em espécies nativas do Cerrado e Mata Atlântica mesmo em doses inferiores às aplicadas comumente em campo. Estes resultados ampliam a literatura sobre os efeitos diretos e indiretos do glifosato em plantas e reforçam a necessidade do manejo adequado deste herbicida.

Palavras-chave: *Enterolobium contortisiliquum*; *Cochlospermum regium*; floração; *Joannesia princeps*; nectários extraflorais; sistemas subterrâneos

ABSTRACT

ARAÚJO, Hugo Humberto de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2025. **Morphoanatomical and metabolic approach to the multidimensional effects of the herbicide glyphosate on native species of the Cerrado and Atlantic Forest.** Adviser: Luzimar Campos da Silva.

Frequent use and improper management of glyphosate can cause undesirable effects, such as contamination of soil, water, and non-target organisms, including native plant species. The effects of this herbicide on the aerial portion of plants are well documented. However, there are many gaps in knowledge regarding its effects on the root system, reproduction, and secretory structures of plant defense, especially in non-target species. The study hypothesis is that glyphosate, even at doses lower than those conventionally used in the field, can cause multidimensional damage to non-target native species, compromising the interaction between the aerial portion and roots, as well as damaging flowering and defense structures. The objective of this study was to investigate the multidimensional effects of glyphosate on native plants from three perspectives: (i) to evaluate its potential effects on the interaction between the shoot and root system of *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae); (ii) to investigate the impacts on the reproductive phase of *Cochlospermum regium* (Bixaceae); and (iii) to evaluate the impacts on extrafloral nectaries (EFNs) of *Joannesia princeps* (Euphorbiaceae). The experiments were conducted in a greenhouse, where the plants were exposed to glyphosate at different doses: 0 (control), 180, 360, 720, and 1440 g.e.a.ha⁻¹ (grams of acid equivalent per hectare). To assess the impacts of the herbicide, visual changes, structural analyses by light and electron microscopy, and physiological and metabolic evaluations were performed. When applicable, the data were subjected to statistical analysis for comparison. In *E. contortisiliquum*, the effects of glyphosate were observed in both the short and long term. Initially, damage was concentrated in young, active tissues, but in the long term, it spread throughout the plant. There was an increase in lipid peroxidation, a reduction in photosynthetic pigments and CO₂ assimilation, starch accumulation, a decrease in sugar, amino acid, and protein levels, and changes in the production of phenolic compounds. Structural and visual damage occurred in leaves and roots, demonstrating the species' sensitivity and the interrelationship between the aerial and root portions. In *C. regium*, the herbicide damaged shoot apices and flower buds, even at lower doses than those used in the field. At lower doses, floral development was delayed. At higher doses, multiple buds, stipule

senescence, trichome collapse, and changes in idioblast and laticifer morphology occurred. No treated plants reached anthesis, suggesting delayed flowering and compromising the species' reproduction. In *J. princeps*, extrafloral nectaries exhibited chlorosis, necrosis, and early abscission. The herbicide caused epidermal collapse, alterations in plastids and mitochondria, vacuolization, and a reduction in proteins, carbohydrates, and phenols. Nectar volume and quality were reduced, which may affect ecological interactions mediated by EFNs. Our results confirmed the study hypotheses and proposed objectives. Glyphosate promoted multidimensional changes in native species of the Cerrado and Atlantic Forest even at doses lower than those commonly applied in the field. These results expand the literature on the direct and indirect effects of glyphosate on plants and reinforce the importance of appropriate management of this herbicide.

Keywords: *Enterolobium contortisiliquum*; *Cochlospermum regium*; flowering; *Joannesia princeps*; extrafloral nectaries; underground systems

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS	16
Impactos do herbicida glifosato na porção aérea e sistema radicular de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong (Fabaceae): Alterações morfológicas, estruturais e metabólicas em uma leguminosa arbórea não alvo	18
Resumo	18
1. Introdução	19
2. Materiais e métodos.....	21
2.1 Obtenção das mudas e condições de cultivo	21
2.2 Aplicação do herbicida	22
2.3 Avaliação de danos visuais em folhas e raízes.....	22
2.4 Caracterização anatômica de folhas e raízes	23
2.5 Análise de trocas gasosas.....	23
2.6 Análises bioquímicas e metabólicas	23
2.6.1 Quantificação de pigmentos, metabólitos primários e compostos fenólicos	24
2.7 Determinação da peroxidação lipídica	24
2.8 Análise estatística dos dados.....	25
3. Resultados	25
3.1 Caracterização de alterações visuais em folhas e raízes	25
3.2 Caracterização de alterações anatômicas em folhas e raízes.....	26
3.3 Alterações nas trocas gasosas.....	28
3.4 Quantificação de pigmentos vegetais	28
3.5 Quantificação de metabólitos primários em folhas e raízes	29
3.6 Quantificação de compostos fenólicos e peroxidação lipídica em folhas e raízes ...	29
3.7 Análise de PCA e correlação	30
4. Discussão	31
5. Conclusão	39
Referências	40
Figuras	47
Material suplementar	56
Efeitos do herbicida glifosato no desenvolvimento inicial de gemas e botões florais de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart. ex Schrank) Pilg. (Bixaceae), uma espécie nativa do Cerrado: Alterações visuais, micromorfológicas e estruturais	58

Resumo	58
1. Introdução	59
2. Materiais e métodos	61
2.1 Condições de cultivo e aplicação do herbicida	61
2.2 Caracterização visual	62
2.3 Análise anatômica, histoquímica e micromorfologia.....	62
3. Resultados	63
3.1 Alterações visuais	63
3.2 Alterações em microscopia eletrônica de varredura	64
3.3 Alterações anatômicas em microscopia de luz.....	65
3.4 Alterações histoquímicas	66
4. Discussão	67
5. Conclusão	72
Referências	73
Figuras	79
Morfoanatomia, histoquímica, ultraestrutura e análise do néctar de nectários extraflorais de <i>Joannesia princeps</i> Vell. (Euphorbiaceae), uma espécie não alvo, em resposta ao herbicida glifosato	86
Resumo	86
1. Introdução	87
2. Materiais e métodos.....	90
2.1 Obtenção das mudas e cultivo em casa de vegetação	90
2.2 Aplicação do herbicida	90
2.3 Caracterização de danos visuais nos NEFs	91
2.4 Quantificação do volume de néctar e análise de açúcares	91
2.5 Caracterização dos NEFs em microscopia eletrônica de varredura	92
2.6 Caracterização dos NEFs em microscopia eletrônica de transmissão	92
2.7 Caracterização anatômica e histoquímica dos NEFs em microscopia de luz	93
2.8 Análise estatística	93
3. Resultados	94
3.1 Caracterização de danos visuais em NEFs	94
3.2 Quantificação do néctar e análise de açúcares.....	95
3.3 Caracterização de danos micromorfológicos	95
3.4 Caracterização de danos anatômicos em microscopia de luz	95

<i>3.5 Alterações histoquímicas em microscopia de luz</i>	97
<i>3.6 Caracterização de alterações ultraestruturais</i>	97
4. Discussão	98
5. Conclusão	106
Referências	106
Figuras	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS	122

1. INTRODUÇÃO GERAL

O glifosato [*N*- (fosfonometil) glicina] é o herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo devido a seu custo-benefício e eficiência no controle de plantas daninhas (Dupont et al., 2018; IBAMA, 2023). Este herbicida é classificado como não-seletivo, sistêmico e pertence ao grupo químico das glicinas substituídas (Franz, 1985). Após a aplicação na porção aérea de plantas daninhas em pós-emergência, o glifosato é absorvido via cutícula e translocado, preferencialmente, pelo floema no fluxo dos fotoassimilados, para tecidos de reserva e em desenvolvimento, tais como ápices caulinares, radiculares e primórdios foliares, folhas e flores em desenvolvimento, os quais atuam como dreno (Gomes et al., 2014; Singh et al., 2020).

O mecanismo de ação do glifosato se dá pela inibição da enzima cloroplastídica 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), que afeta diretamente a rota do ácido chiquímico (Finley e Duke, 2020). Consequentemente, ocorre inibição da síntese de corismato e dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina, os quais são essenciais para a síntese de proteínas e precursores de compostos secundários, incluindo vitaminas, lignina e hormônios vegetais (Gomes et al., 2014; Freitas-Silva et al., 2022). Apesar de ser um produto destinado ao controle de plantas daninhas, espécies não alvo que ocorrem próximas de áreas agrícolas podem ser afetadas pelo do glifosato (Rezende-Silva et al., 2019; Cruz et al., 2021).

Em regiões agrícolas onde o controle químico é adotado, e um manejo inadequado é empregado, parte do herbicida aplicado pode ser transportado da área de interesse para áreas próximas por meio de diferentes vias, promovendo a contaminação do solo, da água e organismos não alvo (Correia, 2018; Mendes et al., 2022). Dessa forma, os herbicidas, principalmente os não-seletivos como aqueles à base de glifosato, podem ocasionar danos tanto à cultura de interesse quanto à vegetação nativa em áreas próximas ao local de aplicação (Hasanuzzaman et al., 2020; Freitas-Silva et al., 2022). No entanto, existem relativamente poucos estudos e informações sobre os efeitos do glifosato em espécies não agricultáveis tendo em vista a grande diversidade vegetal em ambientes tropicais (Rezende-Silva et al., 2019; Freitas-Silva et al., 2020, 2022).

Apesar dos avanços na compreensão do efeito do glifosato em plantas não alvo, a maioria dos estudos se limita a análises da porção aérea durante a fase vegetativa, por meio de análises fisiológicas e bioquímicas (Hoagland e Duke, 1982; Freitas-Silva et al., 2022). No entanto, diversos aspectos da fitotoxicidade desse herbicida permanecem pouco explorados em plantas nativas tropicais. Em especial, o conhecimento sobre os efeitos do glifosato no sistema subterrâneo ainda é limitado, embora o herbicida possa atingir raízes pela translocação e

promover alterações morfológicas e funcionais (Araújo et al., 2024). Da mesma forma, a interferência do glifosato durante o estágio reprodutivo em plantas é pouco compreendida, apesar da importância dessa fase para manutenção das populações em ambientes naturais. Os poucos estudos que abordam os efeitos deste herbicida na reprodução de plantas não alvo são limitados a espécies de ambientes temperados (Carpenter et al., 2020; Strandberg et al., 2021). Outro ponto ainda desconhecido diz respeito ao efeito do glifosato em estruturas secretoras relacionadas à defesa, como os nectários extraflorais, que desempenham papel importante na proteção das plantas ao mediar interações planta-inseto (Nepi et al., 2018; Del-Claro et al., 2016; Pereira et al., 2020). Desse modo, persistem lacunas significativas de conhecimento sobre os impactos multidimensionais do glifosato em espécies nativas, sobretudo em ambientes como o Cerrado e na Mata Atlântica, onde a expansão da agricultura e o uso de herbicidas tem destaque (Colli et al., 2020; MapBiomass, 2024; Sindiveg, 2024).

O Cerrado e a Mata Atlântica são *hotspots* em termos de biodiversidade (Myers, 2000). No entanto, devido à intensa atividade agrícola, muitas espécies nativas podem ser expostas a doses não letais de pesticidas como o herbicida glifosato. Nesse contexto, espécies vegetais nativas não alvo que ocorrem naturalmente próximas de áreas agrícolas como *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilg. (Bixaceae), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae) e *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae), podem ser afetadas negativamente por este herbicida. Considerando a ampla distribuição no Cerrado e Mata Atlântica, estas espécies são modelos adequados para avaliar os efeitos morfoanatômicos e metabólicos do glifosato. A investigação destes aspectos pode fornecer dados importantes sobre os impactos dos herbicidas no ambiente e em comunidades vegetais naturais, fornecendo subsídios para políticas públicas de conservação e para uso consciente dos herbicidas (Araújo et al., 2025).

A hipótese neste estudo é que o glifosato, mesmo em doses abaixo das utilizadas convencionalmente em campo, pode promover danos multidimensionais em espécies nativas não alvo comprometendo a interação entre a porção aérea e radicular, além de promover danos durante a fase reprodutiva e em estruturas secretoras relacionadas à defesa, como os nectários extraflorais. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos multidimensionais promovidos pelo glifosato em plantas nativas em três perspectivas: (i) avaliar os efeitos morfoanatômicos e metabólicos do glifosato na interação parte aérea e sistema radicular de *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae), (ii) investigar os impactos morfoanatômicos do glifosato no desenvolvimento inicial de gemas e botões florais de *Cochlospermum regium* (Bixaceae), (iii) avaliar os impactos morfoanatômicos e funcionais do glifosato nos nectários extraflorais (NEFs) de *Joannesia princeps* (Euphorbiaceae).

Desse modo, a tese foi organizada em três artigos:

- “Impactos do herbicida glifosato na porção aérea e sistema radicular de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae): Alterações morfológicas, estruturais e metabólicas em uma leguminosa arbórea não alvo”. Este artigo foi formatado nas normas do periódico *Pesticide Biochemistry and Physiology* ao qual será submetido após tradução e a incorporação das sugestões da banca avaliadora.
- “Efeitos do herbicida glifosato no desenvolvimento inicial de gemas e botões florais de *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilg. (Bixaceae), uma espécie nativa do Cerrado: Alterações visuais, micromorfológicas e estruturais”. Este artigo foi formatado nas normas do periódico *Flora* ao qual será submetido após tradução e a incorporação das sugestões da banca avaliadora.
- “Morfoanatomia, histoquímica, ultraestrutura e análise do néctar de nectários extraflorais de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae), uma espécie não alvo, em resposta ao herbicida glifosato”. Este artigo foi formatado nas normas do periódico *Environmental Science and Pollution Research* ao qual será submetido após tradução e a incorporação das sugestões da banca avaliadora.

REFERÊNCIAS

- Araújo H. H., Soares G. D. D., Dias-Pereira J., Silva L. C., & Machado V. M. (2024). Impact of saflufenacil and glyphosate-based herbicides on the morphoanatomical and development of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae): new insights into a non-target tropical tree species. *Environmental Science and Pollution Research*, 31, 61254–61269.
- Araújo, H. H., Marinato, C. S., Coelho, D. G., Oliveira, L. A., Oliveira, J. A., Clarindo, W. R., Freitas-Silva, L., & Silva, L. C. (2025). Multidimensional effects of a glyphosate-based herbicide on *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): Morphoanatomical, metabolic, and genotoxic biomarkers as indicators of damage in a non-target native tree species. *Journal of Hazardous Materials*, 492, 138038
- Carpenter, D. J., Mathiassen, S. K., Boutin, C., Strandberg, B., Casey, C. S., & Damgaard, C. (2020). Effects of herbicides on flowering. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(6), 1244–1256.
- Colli, G. R., Vieira, C. R., & Dianese, J. C. (2020). Biodiversity and conservation of the Cerrado: recent advances and old challenges. *Biodiversity and Conservation*, 29(5), 1465-1475.
- Correia, N.M. (2018) *Comportamento dos herbicidas no ambiente. Documentos - Embrapa*, ISSN 1415-2312, 160, 30p.
- Cruz, C.E.S., Freitas-Silva, L., Ribeiro, C., Silva, L.C. (2021) Physiological and morphoanatomical effects of glyphosate in *Eugenia uniflora*, a Brazilian plant species native to the Atlantic Forest biome. *Environmental Science and Pollution Research*, 5: 13-25.
- Del-Claro, K., Rico-Gray, V., Torezan-Silingardi, H.M. et al (2016) Loss and gains in ant–plant interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats, and lies. *Insects Society*, 63: 207–221.
- Dupont, Y.L., Strandberg, B., Damgaard, C. (2018) Effects of herbicide and nitrogen fertilizer on non-target plant reproduction and indirect effects on pollination in *Tanacetum vulgare* (Asteraceae). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 262: 76–82.
- Finley, J.W., Duke, S.O. (2020) Agnes Rimando, a pioneer in the fate of glyphosate and its primary metabolite in plants. *J. Agric. Food Chem*, 68(20): 5623–5630.
- Franz, J.E. (1985) Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: Grossbard E, Atkinson D, editors. *The herbicide glyphosate*. London: Butterworth & Co, p. 3–17.
- Freitas-Silva, L., Araújo, T.O., Nunes-Nesi, A., Ribeiro, C., Costa, A.C., Silva, L.C. (2020) Evaluation of morphological and metabolic responses to glyphosate exposure in two neotropical plant species. *Ecological Indicators*, 113: 1-11.
- Freitas-Silva, L., Araújo, H.H., Meireles, C.S., Silva, L.C. (2022) Plant exposure to glyphosate-based herbicides and how this might alter plant physiological and structural

processes. *Botany*, 100(6): 473-480.

Gomes, M.P., Smedbol, E., Chalifour, A., Henault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M., Juneau, P. (2014) Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 65: 4691–4703.

Hoagland, R.E., Duke, S.O. (1982) Biochemical effects of glyphosate [N –(Phosphonomethyl) glycine] D.E. Moreland, et al. (Eds.), Biochemical Responses Induced by Herbicides. *American Chemical Society*, 181: 175-205.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (2023). *Relatórios de comercialização de agrotóxicos*. Ministério do Meio Ambiente e do Clima. <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 20 fev. 2025.

MapBiomass. (2024). *Mapeamento Anual de Cobertura e Uso da Terra no Brasil - Coleção 9*. https://brasil.mapbiomas.org/wp-content/uploads/sites/4/2024/12/Factsheet-Agricultura_C9_05.12_v2.pdf. Acesso em: 16 jul. 2025.

Mendes, K. F., Inoue, M. H., & Tornisiello, V. L. (2022) *Herbicidas no ambiente: Comportamento e destino*. Editora UFV.

Myers, N.R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853–858.

Nepi, M., Grasso, D.A., Mancuso, S. (2018) Nectar in Plant–Insect Mutualistic Relationships: From Food Reward to Partner Manipulation. *Frontiers in Plant Science*, 9.

Pereira, C.C., Boaventura, M.G., Castro, G.C., Cornelissen, T. (2020) Are extrafloral nectaries efficient against herbivores? Herbivory and plant defenses in contrasting tropical species. *Journal of Plant Ecology*, 13: 423–430.

Rezende-Silva, S.L., Costa, A.C., Dyszy, F.H., Batista, P.F., Crispim-Filho, A.J., Nascimento, K.J.T., Silva, (2019) *Pouteria torta* is a remarkable native plant for biomonitoring the glyphosate effects on Cerrado vegetation. *Ecological Indicators*, 102: 497-506.

Sindiveg - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. (2024). *Levantamento dos principais números do setor de defensivos agrícolas no Brasil*. <https://sindiveg.org.br/mercado-total/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

Singh, S., Kumar, V., Datta, S., Wani, A.B., Dhanjal, D.S., Romero, R., Singh, J. (2020) Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical monitoring, toxicity and degradation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18: 663-702.

Strandberg, B., Sørensen, P. B., Bruus, M., Bossi, R., Dupont, Y. L., Link, M., & Damgaard, C. F. (2021). Effects of glyphosate spray-drift on plant flowering. *Environmental Pollution*, 280, 116953.

Impactos do herbicida glifosato na porção aérea e sistema radicular de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae): Alterações morfológicas, anatômicas e metabólicas em uma leguminosa arbórea não alvo

Hugo Humberto de Araújo^a; Graciele Daiane Diniz Soares^a; Raylla Pollyana Barbosa de Sousa^b, Jailson Sousa de Castro^b, Júlia Duarte Mendes^a; Pedro Henrique Soares Sabino^a; Vinícius Melo da Silva^c, Ana Júlia Carvalho Defeo^c, Fábio Murilo DaMatta^b, Juraci Alves Oliveira^c; Luzimar Campos da Silva^{a*}

^a Departamento de Biologia Vegetal, Laboratório de Anatomia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brasil.

^b Departamento de Biologia Vegetal, Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brasil.

^c Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Biofísica Ambiental, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brasil.

* Autor de correspondência: luzimar@ufv.br

Resumo

A maioria dos estudos sobre o efeito do glifosato em plantas não alvo foca apenas em investigações da porção aérea das plantas, desconsiderando os eventuais impactos na porção subterrânea. Portanto, avaliações multidimensionais, integrando as porções aérea e radicular de espécies nativas não alvo podem contribuir para uma melhor compreensão dos impactos do glifosato nas plantas sensíveis e identificar marcadores de fitotoxicidade. A hipótese de estudo é que o herbicida glifosato induz alterações integradas na parte aérea e no sistema radicular de *E. contortisiliquum* em diferentes escalas temporais. Nesse contexto, objetivamos investigar as alterações morfológicas, anatômicas, fisiológicas e metabólicas promovidas pelo herbicida glifosato na porção aérea e sistema radicular de mudas de *E. contortisiliquum*. Adicionalmente, buscamos identificar marcadores de fitotoxicidade a curto e longo prazo. Mudas de *E. contortisiliquum* foram submetidas a um herbicida à base de glifosato nas doses 0, 180, 360, 720 e 1440 g.ea.ha⁻¹. Decorridos 7 e 90 dias após a aplicação, foram feitas análises morfoanatômicas, fisiológicas e metabólicas em folhas e raízes. A curto prazo, os danos se concentraram em regiões jovens e metabolicamente ativas, enquanto que a longo prazo as

alterações se estenderam para toda a planta. O glifosato promoveu aumento da peroxidação lipídica, redução de pigmentos fotossintéticos, redução na assimilação de CO₂, acúmulo de amido, redução de açúcares, redução de aminoácidos e proteínas e alterações na produção de compostos fenólicos, além de danos estruturais e visuais em folhas e raízes em ambos os períodos de avaliação. Embora as folhas sejam mais responsivas em curto prazo, as raízes também são sensíveis, especialmente a longo prazo. Nosso estudo reforça a importância de avaliações multidimensionais, que integram a porção aérea e radicular em avaliações de plantas não alvo expostas ao glifosato.

Palavras-chave: Dano celular; Cerrado; Pesticidas; Planta não alvo; Raízes.

1. Introdução

Atualmente, o glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo e o produto mais comercializado no Brasil (IBAMA, 2023). O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] é um herbicida sistêmico, de pós-emergência, não seletivo e amplamente utilizado no controle de plantas daninhas (Duke e Powles, 2008). Após a aplicação na porção aérea de plantas daninhas, o glifosato é absorção via cutícula, e translocado pelo floema para regiões com alta atividade metabólica como folhas jovens, ápices caulinares e radiculares que podem estar distantes do local de aplicação (Freitas-Silva et al., 2022; Martinelli et al., 2022). Devido à alta polaridade e forte ionização, o glifosato possui elevada mobilidade pelo floema (Mendes et al., 2022). O glifosato atua na rota do ácido chiquímico ao bloquear a 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) e promover redução na biossíntese de três aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) que são precursores de proteínas, fitohormônios e metabólitos secundários, causando a morte de plantas sensíveis (Gomes et al., 2014; Freitas-Silva et al., 2022). A ação lenta e alta mobilidade no floema permitem que este herbicida seja utilizado, inclusive, no controle de plantas perenes (Duke, 2020).

Durante a pulverização do herbicida por via aérea (por exemplo, aeronaves agrícolas e drones) ou terrestre (por exemplo, tratores), devido ao manejo inadequado e uso massivo, uma parte do produto utilizado pode atingir áreas não planejadas por meio de diferentes vias de transporte (como deriva, escoamento superficial e infiltração), contaminando matrizes como solo e água (Mendes et al., 2023; Araújo et al., 2023). Plantas não alvo, (ou seja, que não são alvo intencional da aplicação) podem apresentar inúmeras alterações morfológicas e metabólicas quando expostas ao glifosato, mesmo em doses abaixo daquela comumente

aplicadas em campo (Araújo et al., 2025). Devido ao efeito negativo em espécies de plantas nativas, o glifosato pode atuar como agente de seleção de espécies e tem potencial para reduzir a diversidade florística de ecossistemas como o Cerrado (Borges et al. 2021). Esse bioma concentra grande parte das monoculturas do país com destaque para soja, milho, cana de açúcar e algodão que representam as culturas com maior consumo de agrotóxicos no Brasil (MapBiomass, 2024; Sindiveg, 2024).

Em plantas não alvo, o glifosato pode promover inúmeras alterações morfológicas, anatômicas, fisiológicas e metabólicas que podem ser utilizadas como bioindicadores da fitotoxicidade do herbicida (Freitas-Silva et al., 2020). Marcadores como acúmulo de ácido chiquímico, aumento da peroxidação lipídica, redução de pigmentos fotossintético, redução da assimilação de CO₂, alterações na produção de metabólitos primários e secundários, alterações anatômicas, além de clorose, danos foliares e redução no desenvolvimento, foram descritos em estudos com espécies não alvo expostas ao glifosato (Santos et al., 2020; Oliveira et al., 2021; Cruz et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2020, 2022; Rezende-Silva et al., 2019, 2022; Santos et al., 2023; Araújo et al., 2024, 2025). O tipo de resposta e a intensidade podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento do órgão analisado, bem como com o período após a exposição ao herbicida e entre os órgãos das plantas. No entanto, pouca atenção tem sido dada sobre efeito do glifosato no sistema subterrâneo de plantas nativas. Os poucos estudos sobre essa temática se limitam a análises morfológicas das raízes, não abordando os aspectos estruturais e metabólicos (Borges et al., 2021; Abreu et al., 2022).

Leguminosas arbóreas são componentes ecológicos importantes em ambiente tropicais como o Cerrado, pois estão associadas a serviços ecossistêmicos, como a fixação biológica de nitrogênio, por meio de associações mutualísticas e estoque de carbono, devido à elevada produção de biomassa (Dubeux et al., 2017; Nair et al., 2021). Além disso, fornecem recursos para inúmeros organismos, incluindo seres humanos (Saikia et al., 2020). Devido à sua ampla distribuição, as leguminosas arbóreas podem ocorrer naturalmente próximas às lavouras e monoculturas e podem ser afetadas negativamente pela exposição a herbicidas como o glifosato. Muitas espécies de leguminosas arbóreas não alvo como *Anadenanthera colubrina* (Abreu et al., 2022), *Bowdichia virgilioides* (Oliveira et al., 2021), *Cenostigma macrophyllum* (Santos et al., 2020), e *Enterolobium contortisiliquum* (Araújo et al., 2024) são sensíveis ao glifosato e apresentam alterações fisiológicas, anatômicas e no desenvolvimento após a exposição ao herbicida. No entanto, outras espécies são mais tolerantes como *Dipterix alata* (Abreu et al., 2022), *Hymenaea stigonocarpa* (Faria et al., 2024) e *Hymenaea courbaril* (Faria et al., 2022).

Os impactos negativos do glifosato em espécies de plantas não alvo têm sido demonstrados em estudos recentes (Cruz et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2022; Rezende-Silva et al., 2019, 2022; Araújo et al., 2024,2025). Os impactos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos deste herbicida são bem documentados em folhas e na porção aérea. No entanto, Araújo et al. (2024) destacam a importância de ampliar esse tipo de abordagem e integrar análises envolvendo porção aérea e subterrânea em plantas expostas a herbicidas sistêmicos como o glifosato, uma vez que, as raízes podem ser impactadas mesmo não sendo o alvo principal da aplicação. Ao investigarem os impactos do glifosato na morfoanatomia e desenvolvimento de mudas de *Enterolobium contortisiliquum*, estes autores destacam a necessidade de uma avaliação a longo prazo para caracterizar marcadores tardios da fitotoxicidade e uma investigação detalhada do sistema radicular (Araújo et al., 2024). Além disso, os mecanismos fisiológicos e metabólicos, envolvidos na sensibilidade de *E. contortisiliquum* ao glifosato permanecem desconhecidos e podem contribuir para entender melhor os impactos multidimensionais do herbicida nessa espécie nativa do Brasil com ampla distribuição e ocorrência no Cerrado (Morim et al., 2020).

A hipótese de estudo é que o herbicida glifosato induz alterações integradas na parte aérea e no sistema radicular de *E. contortisiliquum* em diferentes escalas temporais. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar as alterações morfológicas, anatômicas, fisiológicas e metabólicas promovidas pelo glifosato na porção aérea e sistema radicular de mudas de *E. contortisiliquum*. Adicionalmente, buscamos ampliar a investigação de Araújo et al. (2024) com a identificação de possíveis biomarcadores de sensibilidade relacionados à exposição ao herbicida, considerando respostas a curto e longo prazo após a exposição. Com esse estudo buscamos responder às seguintes perguntas: (i) Quais respostas fisiológicas e metabólicas estão envolvidas na sensibilidade de *E. contortisiliquum* ao glifosato? (ii) Quais são os biomarcadores de sensibilidade ao glifosato em curto e longo prazo após a exposição? (iii) Como os efeitos na porção aérea podem influenciar a porção radicular e vice versa?

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção das mudas e condições de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa (UFV), 20° 45' 33.8" S, 42° 51' 10.4" W, Minas Gerais, Brasil. Sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, conhecida popularmente como “Tamboril”, foram coletadas de matrizes em

estágio reprodutivo, no Horto Botânico da UFV. Após a coleta, as sementes foram escarificadas manualmente com lixa, embebidas por 24h em água destilada e, em seguida, plantadas em potes plásticos de 500ml. O substrato utilizado para o plantio e cultivo foi Topstrato HT (Vida Verde), constituído a base de casca de pinus, vermiculita, turfa e enriquecido com PG Mix 14.16.18, nitrato de potássio e superfosfato simples. Decorridos 30 dias após o plantio, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 3.8L com o mesmo substrato comercial. As mudas receberam irrigação diária e solução nutritiva de Hoagland à metade da força iônica semanalmente (Hoagland e Arnon 1950). Ao final, foram obtidas 50 mudas padronizadas, divididas em dois grupos de plantas: 25 mudas com 3 meses de idade e 25 mudas com 4 meses de idade.

2.2 Aplicação do herbicida

As mudas (n=5) foram pulverizadas com um herbicida comercial à base de glifosato: Roundup® Original Mais, com 480 g/L de equivalente ácido de N-(phosfometil-glicina). Foi feita uma única aplicação de quatro doses crescentes do herbicida: 180, 360, 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ que correspondem, respectivamente, a 12.5, 25, 50 e 100% da dose aplicada em campo. As plantas do controle não receberam pulverização. Essas doses foram definidas com base em estudos prévios envolvendo espécies arbóreas nativas em estágio juvenil expostas ao glifosato (Freitas-Silva et al., 2020; Cruz et al., 2021; Araújo et al., 2024, 2025). A pulverização foi feita a 50 cm de altura do topo das plantas, com pulverizador costal (Herbicat, Catanduva Brasil) propelido a CO₂ a uma pressão constante de 2 bar e volume de calda ajustado para 150 L/ha⁻¹. Foi utilizada uma barra de aplicação com dois bicos de aspersão tipo leque TT 11002 VP (TeeJet® -Wheaton, Illinois, EUA) com 0.5 m de distância. Durante a aplicação, as condições ambientais foram: temperatura média de 18,9 °C, umidade do ar de 88% e velocidade do vento de 0,4 m/s. Todas as análises fisiológicas e coleta de amostras para os estudos anatômicos e bioquímicos foram feitas 7 e 90 dias após a aplicação (DAA). O grupo de mudas com 4 meses de idade foi analisado 7 DAA e o grupo de mudas com 3 meses de idade foi analisado 90 DAA.

2.3 Avaliação de danos visuais em folhas e raízes

Para a análise visual foram fotografadas folhas jovens, folhas completamente desenvolvidas, raízes e ápices caulinares e radiculares. O substrato aderido às raízes foi retirado

manualmente e, em seguida, as raízes foram lavadas em água corrente. O registro fotográfico foi feito com auxílio de câmera digital (48 MP – Samsung Galaxy A34). Para a análise dos ápices radiculares foi utilizado um microscópio estereoscópio modelo Stemi 2000-C (Carl Zeiss, Alemanha).

2.4 Caracterização anatômica de folhas e raízes

Foliólulos da porção mediana de folhas completamente expandidas do terceiro nó ($n=3$), sem sintomas visuais, e fragmentos de ápices radiculares ($n=3$) de raízes laterais e raízes em crescimento secundário, foram fixados em formalina neutra tamponada (FNT) e estocadas em etanol 70% (Kraus e Arduin, 1997). Em seguida, foram segmentados fragmentos dos folíolos na porção mediana para obtenção de cortes transversais, fragmentos de raízes a cerca de 3 mm do ápice para corte transversal e ápices radiculares para cortes longitudinais. Os fragmentos foram desidratados em série etílica e incluídos em historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo (Leica RM 2255 - Leica Microsystems Inc., Deerfield, IL, USA) com 5 μ m de espessura, coradas com azul de toluidina pH 4,7 (O'Brien e McCully, 1981) e montadas entre lâmina e lamínula com Permount (Fisher Scientific). O registro fotográfico das lâminas foi feito em fotomicroscópio (AX70RF, Olympus Optical, Tóquio, Japão), equipado com sistema de captura de imagens (Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision, Alemanha), no laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

2.5 Análise de trocas gasosas

Foram utilizadas folhas ($n=4$) completamente expandidas, do terceiro nó sem sintomas de danos visuais. As leituras foram feitas em um folíolo da porção mediana da folha. As análises foram conduzidas entre 8h e 11h da manhã utilizando um analisador de gases infravermelho (LI-6400XT, LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, EUA). Para as leituras foi padronizado um fluxo de fótons de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e uma concentração de CO_2 de 425 ppm. Após a estabilização, foram realizadas três leituras em intervalos de 1 min. Os seguintes parâmetros foram avaliados: assimilação de CO_2 (A - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s - $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E), concentração interna de CO_2 (C_i) e eficiência do uso da água (EUA - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}$), obtida com base na relação A/g_s .

2.6 Análises bioquímicas e metabólicas

Foram coletados três folíolos de folhas completamente expandidas do terceiro nó, sem sintomas visuais (n=4). Também foram coletadas amostras de raízes laterais (n=4) a cerca de 1 cm do ápice radicular. Antes da coleta, as raízes foram lavadas em água corrente e secas em papel toalha. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em ultra freezer a -80 °C até o momento das análises.

2.6.1 Quantificação de pigmentos, metabólitos primários e compostos fenólicos

As amostras de folhas e raízes frescas congeladas foram submetidas à liofilização em temperatura de -48 °C por três dias, em seguida as amostras foram maceradas em moinho de bolas. Alíquotas de 10 mg do material vegetal triturado foram submetidos à extração metanólica a 70 °C por 30 min e centrifugadas a 16.200 g por 5 min (Lisec et al., 2006). A fração solúvel foi utilizada para determinação de pigmentos fotossintéticos (clorofila total, carotenoides e razão clorofila *a/b*), de acordo com a metodologia proposta por Sulpice et al. (2009); quantificação de açúcares (glicose, frutose e sacarose), de acordo com a metodologia proposta por Fernie et al. (2001); quantificação de aminoácidos de acordo com Yemm et al. (1955) e compostos fenólicos totais, pela metodologia proposta por Bieleski e Turner (1966). A fração insolúvel foi utilizada para a determinação de amido, pela metodologia descrita por Fernie et al. (2001) e quantificação de proteínas, como descrito por Bradford et al. (1951). As análises bioquímicas foram conduzidas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas da UFV.

2.7 Determinação da peroxidação lipídica

A análise da peroxidação lipídica foi feita com base na metodologia proposta por Hodges et al. (1999). Amostras de 200 mg de folhas e raízes frescas, congeladas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas em etanol 80% e centrifugadas a 3.000 g por 10 min. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi homogeneizado a 1 mL de ácido tricloroacético 20%. Em outro tubo 1 mL do sobrenadante foi homogeneizado com 1 mL de uma mistura de ácido tricloroacético 20% e ácido tiobarbitúrico 0,5%. Os tubos foram agitados e incubados por 25 min a 95 °C. A absorbância foi obtida em leitor de microplacas (Epoch, Aligent Technologies, Bio Tek Instrumensts, Santa Clara, CA) à 440, 532 e 600 nm. O equivalente de MDA (TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi calculado com base na equação proposta por Hodges et al (1999).

2.8 Análise estatística dos dados

Os dados quantitativos, referentes as análises fisiológicas e bioquímicas, foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade da distribuição. Para todas as análises foram utilizadas quatro repetições por tratamento ($n = 4$). As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA). Em seguida, os grupos de respostas foram submetidos ao teste de Tukey. Os dados também foram submetidos a análise de componentes principais (PCA) e análise de correlação de Person, com posterior construção de uma matriz de correlação e *heatmap*. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0.05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc.).

3. Resultados

3.1 Caracterização de alterações visuais em folhas e raízes

Visualmente, a aplicação do herbicida promoveu danos na porção aérea e no sistema radicular de *Enterolobium contortisiliquum* em todas as doses testadas. As plantas do controle em ambos os períodos de avaliação apresentaram folhas sem danos visuais, com aspecto saudável, e foliólulos verdes com distribuição homogênea na folha (Fig. 1 A-D).

Decorridos 7 DAA, foram observados danos principalmente nos ápices caulinares e folhas jovens em desenvolvimento a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹. Nas doses de 180 e 360 g.e.a.ha⁻¹ ocorreu clorose intensa nos ápices das folhas jovens (Fig. 1 E). Na dose de 1440 g.e.a.ha⁻¹, além da clorose intensa foi observada deformação dos foliólulos e abscisão de folíolos (Fig. 1 I). As folhas completamente expandidas, a partir do terceiro nó apresentaram aspecto íntegro no controle (Fig. 1 B) e nas menores doses (Fig. 1 F). Na dose de 1440 g.e.a.ha⁻¹ foi observado clorose e abscisão de folíolos somente na porção terminal das folhas expandidas (Fig. 1 J).

Decorridos 90 DAA, os sintomas foliares foram mais intensos, sendo que todos os indivíduos na maior dose morreram. Nas doses de 180 e 360 g.e.a.ha⁻¹, as folhas jovens apresentaram intensa redução do número de folíolos e deformação dos foliólulos (Fig. 1 G). Nas doses de 360 e 720 g.e.a.ha⁻¹, as folhas jovens apresentaram redução na expansão e desenvolvimento dos foliólulos, que apresentaram aspecto clorótico e deformação (Fig. 1 K).

As folhas completamente expandidas apresentaram clorose intensa, com abscisão de folíolos e foliólulos a partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 1 H e L). Todas as plantas na dose 1440 g.e.a.ha⁻¹ estavam mortas.

O ápice caulinar de plantas do controle, com 7 DAA apresentou coloração verde e primórdios foliares em desenvolvimento (Fig. 1 M). Na dose de 180 e 360 g.e.a.ha⁻¹ foi observado clorose discreta, e redução do desenvolvimento dos primórdios foliares (Fig. 1 N), progredindo para senescência de folhas jovens e primórdios caulinares além de epinastia do ápice caulinar nas doses de 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 1 Q e R). Decorridos 90 DAA, os ápices caulinares apresentaram redução no desenvolvimento e aspecto clorótico a partir da dose 180 (Fig. 1 P). Nas doses de 360 e 720 g.e.a.ha⁻¹ a clorose foi mais intensa nessa região (Fig. 1 S e T), os primórdios foliares estavam pouco desenvolvidos (Fig. 1 S) e formação de múltiplos brotos, cloróticos e deformados na região apical do caule (Fig. 1 T).

Em relação ao sistema radicular, as plantas do controle em ambos os períodos de avaliação (Fig. 2 A-D) apresentaram raízes densas, com inúmeros nódulos de coloração avermelhada internamente (Fig. 2 A e C). O ápice das raízes apresentou coloração clara, superfície lisa, formato cônico afilado na extremidade (Fig. 2 B e D). Decorridos 7 DAA não foram observadas alterações na densidade de raízes (Fig. 2 E). No entanto, a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 2 E-H) os ápices apresentaram contorno sinuoso e irregular (Fig. 2 F), além de ruptura da epiderme e dilatação da região subapical, adquirindo aspecto de “clava” nas doses de 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 2 J).

Decorridos 90 DAA, ocorreu redução no tamanho e densidade de raízes finas a partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 2 G e K). Os nódulos das raízes apresentaram diminuição visual na densidade com o aumento das doses do herbicida, acompanhado de redução da coloração avermelhada e aspecto necrótico nas maiores doses, em comparação ao controle (Fig. 2 C, G e K). Os ápices das raízes apresentaram aspecto dilatado, com ruptura da epiderme e necrose a partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 2 H e L).

3.2 Caracterização de alterações anatômicas em folhas e raízes

Nas plantas do controle, as folhas completamente expandidas de *E. contortisiliquum* possuem epiderme uniestratificada, mesofilo dorsiventral e parênquima clorofiliano com núcleo bem evidentes, posicionados na porção mediana na célula e cloroplastos pequenos em posição parietal (Fig. 3 A e B), não havendo diferença aos 7 e 90 DAA.

Decorridos 7 DAA, em todas as plantas submetidas ao glifosato, ocorreu aumento visual no tamanho dos cloroplastos do parênquima clorofiliano em folhas sem sintomas visuais, a partir da dose 180 g.e.a.ha⁻¹ em comparação ao controle (Fig. 3 C, E e G). Com o aumento das doses do herbicida, o citoplasma das células do parênquima clorofiliano apresentou aspecto menos denso em relação ao controle e núcleos com aspecto mais condensado (Fig. C, E e G). Não foram observadas alterações nos tecidos de condução na nervura de maior porte (Fig. I e J).

Decorridos 90 DAA, as folhas completamente expandidas de *E. contortisiliquum* submetidas ao glifosato apresentaram parênquima clorofiliano com células visualmente mais largas e com cloroplastos maiores, em relação ao controle (Fig. 3 D, F e H). A lâmina foliar teve redução visual na espessura com o aumento das doses do herbicida. A partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹, ocorreu colapso de elementos de vaso do xilema e das células do floema, além de ruptura e colapso de células epidérmicas na região do bordo e nervura dos foliólulos (Fig. 3 K e L). Nas maiores doses ocorreram alterações no formato das células do mesofilo e dos elementos de condução do xilema (Fig. 3 K e L).

As raízes em crescimento primário (Fig. 4 A-R) de plantas expostas ao herbicida glifosato (Fig. 4 G-R) apresentaram maior diferenciação dos tecidos primários e redução da porção meristemática, em comparação com o controle. Os ápices de raízes das plantas do controle em ambos os períodos de avaliação apresentaram aspecto similar, com coifa alongada, região meristemática com células de citoplasma denso (Fig. 4 A e D) e intensa divisão celular. Em corte transversal, as raízes das plantas do controle não apresentaram tecidos completamente diferenciados, apresentando apenas tecidos meristemáticos primários (Fig. 4 B, C, E e F). Decorridos 7 DAA, a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹, ocorreu redução visual no tamanho da coifa e da região meristemática, além da redução no tamanho do meristema que progrediu com o aumento das doses do herbicida (Fig. 4 G e M). Em corte transversal os tecidos primários das raízes já estavam diferenciados na altura do corte, a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 4 H e I). Nas doses de 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ ocorreram rupturas na epiderme (Fig. 4 M), colapso das células do córtex (Fig. 4 N) além de alterações no formato dos elementos de condução do xilema e colapso das células do floema (Fig. 4 O). Decorridos 90 DAA, foram observados os mesmos aspectos de lesões nos ápices radiculares de plantas expostas ao glifosato. No entanto, o colapso das células do floema surgiu a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ e foi mais intenso nas doses de 360 e 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 4 L e R). Na dose 720 g.e.a.ha⁻¹, os tecidos estavam diferenciados em corte longitudinal, sem células com aspecto meristemático no ápice radicular (Fig. 4 P-R).

Raízes em crescimento secundário (Fig. 4 S-V) de plantas do controle em ambos os períodos de avaliação, apresentaram floema secundário com acúmulo de compostos fenólicos na região próxima à periderme (Fig. 4 S e U). O xilema secundário é amplo com elementos de vaso de parede espessa e isodiamétricos em corte transversal (Fig. 4 S e U). Plantas expostas ao herbicida apresentaram alterações no formato dos elementos de condução do xilema secundário, próximo ao câmbio vascular, além de maior acúmulo visual de composto fenólicos no xilema e floema secundário a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ em ambos os períodos de avaliação (Fig. 4 S-V). Decorridos 90 DAA ocorreram necroses na região do floema secundário (Fig. 4 V).

3.3 Alterações nas trocas gasosas

Mudas de *E. contortisiliquum* expostas ao glifosato apresentaram alterações significativas nas trocas gasosas em ambos os períodos de avaliação (Fig. 5 A-E).

Decorridos 7 DAA, ocorreu redução na assimilação de CO₂ (A) nas doses de 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 5 A) em relação ao controle. De modo semelhante, com 90 DAA ocorreu redução da A, principalmente na dose de 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 5 A). A condutância estomática (g_s), 7 DAA teve redução nas doses 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 5 B). No entanto, aos 90 DAA não houve variações significativas na g_s (Fig. 5 B). A concentração interna de CO₂ (C_i) não apresentou variações significativas 7 DAA (Fig. 5 C). No entanto, aos 90 DAA ocorreu aumento significativo da C_i a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 5 C). A transpiração (E) apresentou um leve aumento na dose 180, seguida por redução significativa nas doses 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 5 D). Decorridos 90 DAA, não ocorreram variações significativas na C_i (Fig. 5 D). A eficiência do uso da água (EUA), 7 DAA teve aumento nas doses de 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 5 E). Decorridos 90 DAA, a EUA teve uma redução na dose de 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 5 E).

3.4 Quantificação de pigmentos vegetais

As plantas expostas ao glifosato apresentaram alterações nos teores pigmentos fotossintéticos somente 90 DAA (Fig. 5 F-H). Não ocorreram variações significativas nos pigmentos em folhas sem sintomas visuais de plantas 7 DAA. Decorridos 90 DAA, ocorreu redução significativa dos teores de clorofila total a partir da dose 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 5 F). Os

teores de carotenoides e razão clorofila a/b tiveram comportamento semelhante, com redução significativa nas doses 360 e 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 5 G e H).

3.5 Quantificação de metabólitos primários em folhas e raízes

O glifosato promoveu alterações na produção de metabólitos primários em folhas e raízes de *E. contortisiliquum* expostas ao herbicida em ambos os períodos de avaliação (Fig. 6 e 7).

Em folhas, aos 7 DAA, ocorreu aumento significativo na concentração de aminoácidos e proteínas somente na dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 6 A e C). No entanto, 90 DAA ocorreu redução de aminoácidos e proteínas em folhas completamente expandidas em todas as plantas expostas ao herbicida, a partir da dose 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 6 A e C). Em raízes, 7 DAA ocorreu redução significativa de aminoácidos apenas da dose 1440 g.e.a.ha⁻¹, sem variações nos teores de proteínas (Fig. 6 B e D). Decorridos 90 DAA, ocorreu redução de aminoácidos nas raízes a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 6 B e D). Os teores de proteínas nas raízes tiveram redução significativa na dose 180 g.e.a.ha⁻¹, seguido por aumento crescente nas doses 360 e 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 6 B e D).

Em folhas, 7 DAA ocorreu aumento nos teores de amido e em todas as plantas tratadas com o glifosato, a partir da dose 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 6E). De modo similar, 90 DAA os teores de amido continuaram maiores em todas as plantas expostas ao herbicida a partir da dose 180 g.e.a.ha⁻¹. No entanto, os teores de amido nas raízes não apresentaram variações estatisticamente significativas em ambos os períodos de avaliação (Fig. 6 F).

Em folhas, aos 7 DAA ocorreu redução significativa nos teores de açúcares em plantas tratadas com o herbicida (Fig. 7). Ocorreu redução de glicose a partir da 360 g.e.a.ha⁻¹, e redução de frutose e sacarose a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹. De modo semelhante, aos 90 DAA ocorreu redução nos níveis de glicose e sacarose a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ e redução de frutose a partir da dose 360 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 7 A, C e E). Nas raízes, 7 DAA ocorreu redução nos teores de glicose e sacarose a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 7 B e F). Os teores de frutose tiveram redução apenas nas doses de 180 e 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 7 D). Decorridos 90 DAA não foram observadas variações significativas nos teores de açúcares nas raízes (Fig. 7 B, D e F).

3.6 Quantificação de compostos fenólicos e peroxidação lipídica em folhas e raízes

Em plantas expostas ao glifosato ocorreram alterações nos níveis de compostos fenólicos e peroxidação lipídica.

Em folhas, aos 7 DAA ocorreu redução significativa nos teores de compostos fenólicos apenas na dose de 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 8 A). No entanto, decorridos 90 DAA, ocorreu aumento crescente de compostos fenólicos a partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 8 A). Em raízes, aos 7 DAA, ocorreu redução de compostos fenólicos nas doses 180, 360 e 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 8 B). Decorridos 90 DAA, ocorreu aumento de compostos fenólicos nas doses de 180 e 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 8 B).

Os teores de peroxidação lipídica em folhas, aos 7 DAA foram significativamente maiores nas doses 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 8 C). Decorridos 90 DAA, os níveis de peroxidação lipídica aumentaram significativamente nas doses de 360 e 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 8 C). Em raízes, 7 DAA não ocorreu variações significativas nos níveis de peroxidação lipídica (Fig. 8 D). Decorridos 90 DAA, ocorreu aumento crescente dos níveis de peroxidação lipídica que foram significativamente maiores na dose 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 8 D).

3.7 Análise de PCA e correlação

A análise de PCA das variáveis coletadas aos 7 DAA (Fig. 9 A) explicou 60,85% da variância dos dados, sendo a PC1 responsável por 40.61% e PC2 por 20.24%. Na PC1, foi possível observar um gradiente de respostas de acordo com as doses. O controle e a dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ ficaram agrupados na extremidade negativa à esquerda, junto com altos valores de assimilação de CO₂, condutância estomática, transpiração além de proteínas, aminoácidos, sacarose, glicose e frutose foliares. As doses 360, 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ ficaram agrupadas no lado positivo à direita, junto com amido foliar, peroxidação lipídica foliar e eficiência do uso da água. Na PC2, houve tendência de separação entre parâmetros foliares agrupados na extremidade negativa, com maior influência da razão clorofila a/b, clorofila total, proteínas e amido foliares e parâmetros radiculares localizados na extremidade positiva, com maior influência de compostos fenólicos, peroxidação lipídica, glicose, frutose e sacarose radiculares (Fig. 9A).

Decorridos 90 DAA, a análise de PCA (Fig. 9B) explicou 62.83% da variância dos dados, sendo PC1 responsável por 50.81% e PC2 por 12.02%. A PC1 explicou a maior parte da variância dos dados, com um gradiente de respostas de acordo com as doses. O controle ficou agrupado na extremidade negativa à esquerda, que foi fortemente influenciada por variáveis de folhas como assimilação de CO₂, eficiência do uso da água, clorofila total,

carotenoides, razão clorofila *a/b*, proteínas aminoácidos, glicose, frutose e sacarose foliares. Na extremidade positiva, à direita foram agrupadas as doses 360 e 720 g.e.a.ha⁻¹, juntamente com forte influência de variáveis como peroxidação lipídica foliar e radicular, além de compostos fenólicos e amido foliar. Na PC2 ocorreu agrupamento da dose 180 g.e.a.ha⁻¹ na porção positiva, influenciada por variáveis radiculares como acúmulo de compostos fenólicos e amido nas raízes (Fig. 9B).

As matrizes de correlação em ambos os períodos (Fig. S1 e S2) indicaram forte correlação entre parâmetros fisiológicos, bioquímicos e metabólicos. Os dados de plantas coletadas 7 DAA revelam uma forte correlação entre peroxidação lipídica das folhas com parâmetros de trocas gasosas, principalmente *A*, *g_s* e *E*. O amido nas folhas tem forte correlação com frutose e sacarose foliar nas folhas e com glicose e sacarose nas raízes. Os açúcares nas folhas têm forte correlação com açúcares nas raízes, principalmente sacarose e glicose. Os dados de plantas 90 DAA revelam forte correlação entre os pigmentos foliares e os açúcares nas folhas. Os compostos fenólicos e peroxidação lipídica em folhas tiveram forte correlação com aminoácidos das raízes, pigmentos foliares e metabólitos primários nas folhas. Além de forte correlação entre assimilação de CO₂ com peroxidação lipídica de folhas e raízes.

4. Discussão

O glifosato promoveu alterações morfoanatômicas, fisiológicas e metabólicas em folhas e raízes de *E. contortisiliquum* em ambos os períodos de avaliação, confirmando nossas hipóteses iniciais. Ocorreram alterações em todas as doses avaliadas, com danos mais intensos 90 dias após a aplicação (DAA). Foi possível identificar marcadores de danos promovidos pelo glifosato a curto e longo prazo. Além disso, os parâmetros metabólicos das raízes e folhas interagem de maneira coordenada nas respostas globais de *E. contortisiliquum* ao glifosato.

Após a absorção, o glifosato é direcionado para os tecidos de condução onde é translocado, principalmente via floema, para regiões metabolicamente ativas como os ápices caulinares, radiculares e folhas em desenvolvimento, onde surgem os primeiros sintomas de toxicidade, assim como observamos em *E. contortisiliquum* (Duke et al., 2018; Freitas-Silva et al., 2022). O surgimento precoce de cloroses e alterações na morfologia de ápices caulinares, que persistem e progridem a longo prazo para senescência, e rebrota intensa, são marcadores visuais da fitotoxicidade do glifosato em plantas sensíveis, como *E. contortisiliquum* em avaliações a curto e longo prazo. De modo semelhante, danos na morfologia de folhas jovens e gemas também foram verificados em outras espécies arbóreas não alvo sensíveis como *Eugenia*

uniflora (Cruz et al., 2021) e *Cenostigma macrophyllum* (Santos et al., 2020). Curiosamente, mesmo em espécies de leguminosas arbóreas tolerantes ao glifosato como *Dipterix alata* (Abreu et al., 2022), *Hymenaea stigonocarpa* (Faria et al., 2024) e *Hymenaea courbaril* (Faria et al., 2022), foram relatados danos em folhas jovens e gemas apicais a longo prazo, nas maiores doses.

A rebrota e o reestabelecimento do crescimento em *E. contortisiliquum*, na menor dose de glifosato, sugere uma capacidade de recuperação a longo prazo quando exposta a baixas doses. Abreu et al. (2022) demonstraram que duas espécies de leguminosas arbóreas também reestabeleceram o crescimento após a exposição ao glifosato. No entanto, com redução da massa seca aérea e presença de folhas deformadas, assim como verificamos em nosso estudo. A deformidade dos foliólulos em folhas jovens de *E. contortisiliquum* é um importante marcador do efeito fitotóxico do glifosato a longo prazo e persistem mesmo após a emissão de novas folhas sem clorose. Botten et al. (2021) relataram que resíduos de glifosato podem permanecer por até 12 anos em tecidos vegetais, e que os tecidos radiculares retêm o herbicida por mais tempo em comparação à porção aérea. Desse modo, as alterações em folhas jovens após rebrota podem ser decorrentes de efeito residual do glifosato, mesmo a longo prazo após a exposição.

A redução no desenvolvimento, deformações e perda da dominância apical em *E. contortisiliquum*, em ambos os períodos de avaliação, estão relacionados aos múltiplos danos promovidos pelo glifosato no metabolismo vegetal, como evidenciado em nosso estudo. Além da peroxidação lipídica e redução do metabolismo primário, o glifosato pode promover alterações na regulação hormonal, mesmo em baixas doses, comprometendo o desenvolvimento de plantas sensíveis (Fuchs et al., 2022). O glifosato pode diminuir a produção de auxinas, como ácido indol-3-acético (AIA), que são sintetizadas a partir do triptofano na rota do ácido chiquímico e são importantes reguladores do crescimento e desenvolvimento vegetal (Freitas-Silva et al., 2022; Fuchs et al., 2021, 2022). Além disso, o glifosato pode interferir indiretamente em diferentes hormônios do estresse, mesmo aqueles que não são derivados diretamente da rota do ácido chiquímico, devido à interação hormonal (Fuchs et al., 2022). Em *Euphorbia esula*, a aplicação de glifosato promoveu alterações no balanço entre etileno, auxinas e giberelinas, promovendo fenótipos atrofiados com múltiplas gemas e brotos devido à perda da dominância apical (Doğramacı et al., 2014; 2015), similar ao observado em nosso estudo. Alterações nas gemas e deformidade de folhas jovens também foram verificadas a longo prazo em plantas não alvo de interesse agrícola como *Citrus sinensis* (Martinelli et al., 2022), *Coffea arabica* (Schrübbbers et al., 2014; Castanheira et al., 2019) e *Solanum lycopersicon* (Soares et al., 2020).

Anatomicamente, folhas de *E. contortisiliquum* expostas ao glifosato apresentaram, em ambos os períodos de avaliação, cloroplastos com aumento visual no tamanho e aspecto arredondado nas células do parênquima clorofiliano. O surgimento precoce de alterações nos cloroplastos, mesmo em folhas sem sintomas visuais, sugere que este é um marcador prognóstico do efeito do glifosato em plantas sensíveis. Alterações semelhantes foram descritas em folhas de *Joannesia princeps* (Araújo et al., 2025) e *Eugenia dysenterica* (Azevedo et al., 2023) expostas ao glifosato e podem estar associadas a alterações ultraestruturais ou mesmo ao acúmulo de amido, como verificamos pela análise bioquímica. Neste trabalho, os danos anatômicos mais intensos nas folhas, a longo prazo, estão de acordo com as observações de Araújo et al. (2024) em *E. contortisiliquum*. Estes autores também relataram que, 12 DAA, ocorreram alterações do formato de células do mesofilo, alteração na espessura da lâmina foliar, e danos na epiderme e nos tecidos de condução, semelhante às nossas observações. Outras espécies nativas expostas ao glifosato também apresentaram danos semelhantes e foram associados ao estresse oxidativo decorrente das alterações metabólicas promovidas pelo herbicida (Freitas-Silva et al., 2020; Cruz et al., 2021; Azevedo et al., 2023; Araújo et al., 2025).

Borges et al. (2021) avaliaram mudas de diferentes espécies arbóreas do Cerrado e da Caatinga expostas ao glifosato e relataram que os danos no desenvolvimento da porção aérea são mais severos em comparação à porção radicular na maioria das espécies avaliadas 35 DAA. No entanto, nossos dados demonstram que o sistema radicular de *E. contortisiliquum* pode ser afetado negativamente a curto e longo prazo. Nossos dados estão de acordo com as observações de Araújo et al., (2024) que verificaram redução do comprimento, massa seca e danos visuais em raízes de *E. contortisiliquum* 90 DAA. A redução no desenvolvimento radicular, principalmente a longo prazo, é um indicativo da sensibilidade de *E. contortisiliquum* ao glifosato, que pode ser translocado para raízes e promover danos, mesmo este não sendo o local alvo de aplicação (Freitas-Silva et al., 2022). Raízes são órgãos heterotróficos na maioria das plantas terrestres e funcionam como um dreno, pois dependem da importação de nutrientes de órgãos aéreos fotossintetizantes (Wegner et al., 2022). Ao avaliar duas espécies de leguminosas arbóreas, Abreu et al., (2022) verificaram que somente *Anadenanthera colubrina*, a espécie mais sensível, apresentou redução da biomassa e comprimento do sistema radicular após 80 dias de exposição.

A redução do comprimento e densidade de raízes observados em *E. contortisiliquum*, principalmente a longo prazo, pode estar associada aos efeitos fitotóxicos nos meristemas e limitação na produção e translocação de metabólitos primários provenientes da porção aérea de plantas expostas ao glifosato. Anatomicamente, o glifosato promoveu redução da zona

meristemática a completa diferenciação das células meristemáticas, cessando o alongamento das raízes de *E. contortisiliquum* a longo prazo, nas maiores doses. A redução na produção de proteínas e açúcares na parte aérea pode limitar a disponibilidade desses compostos para a porção radicular, limitando a divisão celular e alongamento das raízes. Os meristemas são sensíveis ao estresse oxidativo e danos metabólicos promovidos por diferentes tipos de estresse abiótico que comprometem a viabilidade das células meristemáticas e o processo de divisão celular (Zhang et al., 2023). Plantas expostas ao glifosato podem apresentar danos no genoma e redução do índice mitótico, acarretando em redução no crescimento e alongamento das raízes, como demonstrado em raízes de *Allium cepa* (Mercado e Caleño, 2020) e de leguminosas como *Glycine max* (Moraes et al., 2024), *Vigna radiata* (Singh et al., 2021) e *Vigna mungo* (Khan et al., 2021).

A dilatação na região do ápice e formato sinuoso das raízes de *E. contortisiliquum* ocorre pela hipertrofia de células do córtex que eventualmente promovem a ruptura da epiderme que pode ser um efeito secundário no balanço hormonal. Apesar de não termos analisado os perfis endógenos de fitohormônios neste estudo, respostas similares a estas foram atribuídas a alterações hormonais em plantas submetidas à seca (Hongtao et al., 2014; Ji e Li, 2014) e a estresse salino (Huang et al., 2021). Os autores descreveram alterações nos níveis de ácido abscísico (ABA) e auxinas, que promoveram o aspecto dilatado das raízes devido aos estímulos no crescimento e diferenciação precoce de células corticais. Além disso, o desenvolvimento e a manutenção da arquitetura radicular dependem da interação de uma série de hormônios vegetais que coordenam processos como o alongamento das raízes, manutenção da identidade meristemática, diferenciação e expansão celular (Zhang et al., 2023; Nittis et al., 2025). Em especial, as auxinas interagem com outros hormônios e estão relacionadas ao processo de desenvolvimento e manutenção da arquitetura radicular (Zhang et al., 2023; Jan et al., 2024).

As alterações no formato e deformidade dos elementos de vaso do xilema em folhas e raízes de *E. contortisiliquum* podem ser uma resposta relacionada com a redução na deposição de lignina nas paredes secundárias. O glifosato interfere na biossíntese de fenilalanina, um precursor das ligninas nas plantas (Fuchs et al., 2021). A redução de ligninas é uma resposta comum em plantas tratadas com glifosato e pode comprometer a capacidade de defesa das plantas contra patógenos, promover distúrbios nutricionais e reduzir a eficiência na condução hídrica (Gomes et al., 2014). Em contrapartida, os danos nas células do floema estão associados com alta atividade metabólica destes tecidos, o que o torna mais susceptível à ação do herbicida. O glifosato pode promover danos estruturais no floema mesmo durante a translocação, como reportado em outros estudos com plantas nativas não alvo (Freitas-Silva et al., 2020; Araújo et

al., 2024). Os danos no floema em *E. contortisiliquum* podem limitar o fluxo de fotoassimilados entre órgãos fontes e dreno, alterando o balanço de carbono nas plantas.

Além das alterações na arquitetura radicular, a longo prazo, ocorreu a redução visual na densidade nódulos nas raízes com o aumento das doses do herbicida. Os nódulos radiculares em leguminosas arbóreas são associações mutualistas com rizóbios e desempenham um importante papel no processo de fixação biológica de nitrogênio, melhoria nas condições nutricionais de solos e na aquisição de nitrogênio pelas plantas (Raza et al., 2020; Nair et al., 2022). O processo de nodulação bem sucedido em leguminosas depende de metabólitos como os flavonoides que são produzidos na rota dos fenilpropanoides, a partir da fenilalanina, dentro da rota do ácido chiquímico (Subramanian et al., 2007; Fuchs et al., 2021). A redução da nodulação e senescência precoce dos nódulos em leguminosas expostas ao glifosato pode alterar o metabolismo de nitrogênio devido à redução na fixação biológica e assimilação de nitrogênio (Zobiolo et al., 2012, Gomes et al., 2014; Mohamed et al., 2021). Desse modo, as alterações na nodulação em *E. contortisiliquum* podem potencializar a redução no desenvolvimento e os danos visuais na porção aérea e radicular de plantas expostas ao glifosato.

A aplicação do glifosato em *E. contortisiliquum* promoveu alterações nas trocas gasosas em ambos os períodos de avaliação, no entanto a redução foi mais intensa a longo prazo. A curto prazo, o glifosato promove redução da assimilação de CO₂ (*A*), redução na condutância estomática (*g_s*) e transpiração (*E*), sem variações na concentração interna de CO₂ (*C_i*), o que sugere uma limitação majoritariamente estomática. De fato, Araújo et al. (2024) observaram danos micromorfológicos em estômatos de *E. contortisiliquum* 12 DAA. De modo semelhante, Araújo et al. (2025) verificaram redução da fotossíntese associada à limitação estomática em *Joannesia princeps* exposta ao glifosato 12 DAA. A longo prazo, a redução de *A* em *E. contortisiliquum* acompanhada do aumento de *C_i* podem indicar uma limitação bioquímica, possivelmente devido à redução na atividade da RubisCO (ribulose 1,5 bifosfato carboxilase-oxigenase) durante a fase de carboxilação do ciclo de Calvin. Além disso, a forte correlação entre a redução de *A*, a redução de pigmentos fotossintéticos e o aumento da peroxidação lipídica, sugerem que o estresse oxidativo pode ter comprometido as membranas dos cloroplastos (Oliveira et al., 2021). Estes danos estruturais, associados com a redução da clorofila, reduzem a captação de luz e a fixação de carbono em mudas de *E. contortisiliquum* expostas ao glifosato. Resultados semelhantes foram descritos para outras espécies de leguminosas arbóreas sensíveis ao glifosato, como *Bowdichia virgilioides* 14 DAA (Oliveira et al., 2021) e *Cenostigma macrophyllum* 15 DAA (Santos et al., 2020). No entanto, em espécies tolerantes como *Hymenaea courbaril* foi verificado um aumento da taxa fotossintética nas

menores doses de glifosato e redução na maior dose, 24 h após a exposição mesmo na ausência de sintomas visuais (Faria et al., 2022). A avaliação de trocas gasosas pode ser um parâmetro avaliativo importante na distinção de plantas nativas sensíveis ou tolerantes ao glifosato (Freitas-Silva et al., 2020; Rezende-Silva et al., 2022), inclusive a curto prazo como demonstramos em nosso estudo.

Alterações nos teores dos pigmentos em folhas completamente expandidas ocorreram apenas a longo prazo em mudas de *E. contortisiliquum*. Devido a translocação direcionada do glifosato, os primeiros sintomas, como a clorose, surgem em folhas jovens e, posteriormente, se estendem para folhas completamente expandidas (Duke et al., 2025). De modo semelhante, Rezende-Silva et al. (2022) verificaram que em *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* os teores de clorofila total diminuíram apenas na avaliação a longo prazo, respectivamente 13 e 72 DAA. A forte correlação entre redução dos pigmentos fotossintéticos e o aumento da peroxidação lipídica e alterações estruturais na morfologia dos cloroplastos em folhas de *E. contortisiliquum*, sugere que a redução de clorofila e carotenoides pode ocorrer devido ao aumento do estresse oxidativo, degradação da clorofila e danos nessa organela (Gomes et al., 2014; Araújo et al., 2025). Além disso, o glifosato possui propriedades quelantes e pode diminuir o conteúdo de Mg em espécies florestais não alvo (Wood et al., 2024), além de interferir na produção de ácido δ -aminolevulínico (ALA) e, consequentemente, reduzir a biossíntese da clorofila (Gomes et al., 2014).

O acúmulo de amido em folhas completamente expandidas de *E. contortisiliquum*, fortemente correlacionado com a redução dos teores de sacarose, glicose e frutose foliares indica uma alteração na alocação de fotoassimilados. Além disso, o acúmulo excessivo de amido nos cloroplastos pode comprimir o estroma e alterar a organização dos tilacoides e dos fotossistemas, contribuindo para a inibição da fotossíntese. Folhas jovens, ápices caulinares e radiculares apresentaram danos visuais intensos induzidos pelo glifosato, que promove alterações metabólicas reduzindo a demanda energética dessas regiões dreno. Além disso, os danos estruturais no floema, em folhas e raízes, podem limitar a translocação de carboidratos. Consequentemente, os fotoassimilados se acumulam na forma de amido em folhas completamente expandidas, em ambos os períodos de avaliação, antes da redução líquida da fotossíntese e redução nos teores de pigmentos fotossintéticos. De modo semelhante, o acúmulo de amido e a redução de açúcares também foi relatado em folhas de *Paullinia cupana* 7 DAA de glifosato (Santos et al., 2023). No entanto, essas respostas metabólicas podem variar entre diferentes espécies vegetais e de acordo com o período de avaliação. Araújo et al. (2025) verificaram redução de grãos de amido no mesofilo de mudas de *Joannesia princeps* 12 DAA

do glifosato, enquanto Faria et al., (2022) verificaram o aumento de grãos de amido em folhas de *Hymenea courbaril*, 60 DAA.

A redução inicial dos teores de glicose, frutose e sacarose nas raízes de *E. contortisiliquum* expostas ao glifosato reflete a diminuição da produção de fotoassimilados devido à queda na assimilação de CO₂ e acúmulo de amido nas folhas, como verificada pela forte correlação entre essas variáveis. Além disso, os danos estruturais no floema podem contribuir para uma menor translocação de açúcares da parte aérea até o sistema radicular. Em ambos os períodos de avaliação não verificamos alterações significativas nos teores de amido em raízes o que é esperado considerando que utilizamos raízes jovens, próximo da região apical onde não ocorre acúmulo de amido em grandes quantidades. No entanto, as raízes em crescimento secundário podem desempenhar papel ativo no acúmulo de amido em espécies de leguminosas arbóreas, especialmente no xilema secundário (Pereira et al., 2025). Os danos anatômicos a longo prazo em raízes de *E. contortisiliquum* em crescimento secundário podem comprometer o acúmulo de amido nas plantas expostas ao glifosato. Futuras investigações bioquímicas são necessárias para avaliar melhor o impacto no acúmulo de carboidratos no sistema subterrâneo dessa espécie e suas possíveis implicações metabólicas e ecológicas.

A redução nos teores de proteínas e aminoácido em folhas de *E. contortisiliquum* a longo prazo também foi verificada em outras espécies arbóreas nativas, como *Pouteroa torta* (Rezende-Silva et al., 2019). Em raízes de *E. contortisiliquum*, a redução de aminoácidos ocorreu tanto a curto quanto a longo prazo. Essa resposta está associada com a ação do glifosato na rota do ácido chiquímico, reduzindo a produção de aminoácidos aromáticos como triptofano, fenilalanina e tirosina (Fuchs et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2022). A produção de aminoácidos alifáticos (que não dependem da rota do ácido chiquímico) pode ser estimulada em resposta ao glifosato, justificando o aumento de proteínas em raízes nas maiores doses a longo prazo. Por outro lado, o aumento de proteínas pode ser reflexo do aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidativo, comum em plantas submetidas ao glifosato (Freitas-Silva et al., 2020; Araújo et al., 2025). Nossos dados sugerem que a análise de proteínas, e especialmente aminoácidos, pode ser um marcador útil da avaliação da fitotoxicidade do glifosato em folhas e raízes de *E. contortisiliquum* a curto e a longo prazo. Além disso, a redução de proteínas pode limitar o desenvolvimento da porção aérea radicular de plantas expostas ao herbicida.

Curiosamente, na menor dose do herbicida a curto prazo, ocorreu um aumento nos teores de proteínas, aminoácidos e amido em folhas completamente expandidas de *E. contortisiliquum*. Esses resultados podem indicar um efeito de estimulação metabólica

temporária nessa dose, devido ao estresse promovido pelo herbicida. O glifosato em baixas doses pode estimular o metabolismo vegetal, favorecendo o crescimento e desenvolvimento até um certo limiar onde os efeitos da fitotoxicidade começam (Belz e Duke, 2014; Khan et al., 2020; Costa et al., 2023; Duke et al., 2025). No entanto, esse feito se restringe a folhas completamente expandidas, pois nas folhas jovens correram alterações visuais que são indicativos de sensibilidade ao glifosato (Freitas-Silva et al., 2022; Cruz et al., 2021). A longo prazo, o efeito de estímulo nessa dose não é mais observado, refletindo os danos generalizados do glifosato no metabolismo de *E. contortisiliquum*.

A redução inicial nos teores de compostos fenólicos e posterior aumento a longo prazo indicam resposta integrada entre a porção aérea e a radicular em mudas de *E. contortisiliquum* exposta ao glifosato. Os compostos fenólicos incluem uma ampla classe de metabólitos secundários como lignina, taninos condensados, antocianinas, flavonoides, cumarinas e fenólicos alelopáticos que desempenham importante papel estrutural, na defesa antioxidante, e modulam interações bióticas nas plantas (Fuchs et al., 2021). A curto prazo, o glifosato pode reduzir a biossíntese de compostos fenólicos ao inibir a produção de fenilalanina, principal precursor desses metabólitos na rota do ácido chiquímico (Freitas-Silva et al., 2022). No entanto, a longo prazo, o aumento de fenólicos pode estar associado a metabólitos como taninos hidrossolúveis, que são produzidos a partir do ácido gálico, que é derivado de intermediários formados antes do ponto de bloqueio da EPSPS na rota do ácido chiquímico (Fuchs et al., 2022; Iqbal e Poór, 2025). Além disso, os compostos fenólicos podem atuar como importantes antioxidantes não enzimáticos e sua biossíntese pode ser estimulada pelo estresse oxidativo em plantas (Parvin et al., 2022; Araújo et al., 2025). Nossos resultados corroboram essa afirmação, devido à forte correlação positiva entre o aumento de compostos fenólicos e aumento da peroxidação lipídica em folhas e raízes de *E. contortisiliquum* a longo prazo. Além disso, verificamos acúmulo de compostos fenólicos em raízes em crescimento secundário após exposição do glifosato.

O aumento da peroxidação lipídica em *E. contortisiliquum* teve forte correlação com a maioria das variáveis foliares e radiculares e influenciou fortemente a redução das trocas gasosas, pigmentos fotossintéticos, metabólitos primários e, a longo prazo, aumento dos compostos fenólicos. Araújo et al. (2025) demonstraram que o estresse oxidativo induzido pelo glifosato é o resultado de alterações fisiológicas, metabólicas e bioquímicas, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e, conseqüentemente, a danos celulares. Estes autores destacam a importância das análises multidimensionais em plantas não alvo expostas ao glifosato (Araújo et al., 2025). De modo

semelhante, muitos estudos demonstraram o aumento da peroxidação lipídica em espécies arbóreas não alvo expostas ao glifosato (Rezende-Silva et al., 2019; Freitas-Silva et al., 2020; Araújo et al., 2025). Dada a detecção precoce em folhas a curto prazo e em raízes a longo prazo, a quantificação da peroxidação lipídica é um importante marcador da toxicidade do glifosato em folhas e raízes de *E. contortisiliquum*, inclusive na ausência de sintomas visuais.

E. contortisiliquum é uma espécie promissora para estudos de sensibilidade ao glifosato, devido ao surgimento precoce de marcadores visuais de toxicidade, inclusive nas menores doses, além de alterações fisiológicas e metabólicas que progridem e persistem a longo prazo em folhas e raízes. Embora as folhas sejam mais responsivas a curto prazo, nosso estudo demonstrou que as raízes também são sensíveis, especialmente a longo prazo, reforçando a importância de avaliações integradas da parte aérea e subterrânea em estudos com glifosato. Danos radiculares podem comprometer a absorção de água e nutrientes, potencializando os efeitos fitotóxicos na porção aérea, como clorose, redução do desenvolvimento foliar, além das alterações na fotossíntese, produção de metabólitos primários e secundários que dependem de água e nutrientes direta ou indiretamente. A interferência no metabolismo de carbono e nitrogênio pode impactar negativamente o crescimento de *E. contortisiliquum* além de comprometer importantes serviços ecossistêmicos, como a fixação biológica de nitrogênio, capacidade de estoque de carbono e a resistência a estresses bióticos e abióticos. Nesse contexto, sugere-se avaliações em campo para compreender melhor os impactos do glifosato nessa espécie em condições não controladas, além de investigações mais detalhadas sobre os impactos do glifosato nos serviços ecossistêmicos associados a esta espécie.

5. Conclusão

Tomados juntos, nossos resultados demonstram que a exposição ao glifosato promove danos morfológicos e anatômicos associados ao estresse oxidativo e múltiplos impactos em processos fisiológicos e metabólicos em mudas de *E. contortisiliquum*, com respostas distintas a curto e longo prazo em folhas e raízes. A curto prazo, os danos se concentraram em regiões jovens e metabolicamente ativas, enquanto a longo prazo as alterações se estenderam a toda a planta, com redução da assimilação de CO₂, redução dos teores de pigmentos fotossintéticos, aumento da peroxidação lipídica e alterações na síntese de metabólitos primários e secundários, além de alterações anatômicas em folhas e raízes. Essas alterações são importantes marcadores da fitotoxicidade do glifosato em *E. contortisiliquum* e podem ser agravadas por danos no sistema radicular, como a redução da densidade e comprimento de raízes laterais e alterações

nos tecidos vasculares, comprometendo a absorção e condução de água e nutrientes para a porção aérea. Nossos dados reforçam a necessidade de maior atenção ao sistema radicular e reforçam a necessidade da avaliação conjunta de aspectos visuais, fisiológicos e metabólicos na avaliação do efeito do glifosato em espécies arbóreas não alvo.

Referências

Abreu, K. M., Santos, D. C., Pennacchi, J. P., Calil, F. N., Moura, T. M., Alves, E. M., Oliveira, T. C., Silva, F. G., Ferreira, J. B. G., Fialho, A. R., & Souza, S. O. (2022). Differential tolerance of four tree species to glyphosate and mesotrione used in agrosilvopastoral systems. *New Forests*, 53, 831-850. <https://doi.org/10.1007/s11056-021-09889-4>.

Araújo H. H., Soares G. D. D., Dias-Pereira J., Silva L. C., & Machado V. M. (2024). Impact of saflufenacil and glyphosate-based herbicides on the morphoanatomical and development of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae): new insights into a non-target tropical tree species. *Environmental Science and Pollution Research*, 31, 61254–61269. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-35223-4>.

Araújo, H. H., Marinato, C. S., Coelho, D. G., Oliveira, L. A., Oliveira, J. A., Clarindo, W. R., Freitas-Silva, L., & Silva, L. C. (2025). Multidimensional effects of a glyphosate-based herbicide on *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): Morphoanatomical, metabolic, and genotoxic biomarkers as indicators of damage in a non-target native tree species. *Journal of Hazardous Materials*, 492, 138038. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.138038>.

Araújo, L. G., Zordan, D. F., Celzard, A., & Fierro, V. (2023). Glyphosate uses, adverse effects and alternatives: focus on the current scenario in Brazil. *Environmental Geochemistry and Health*, 45, 9559-9582. <https://doi.org/10.1007/s10653-023-01763-w>.

Azevedo, L. P. N., Rocha, T. B., Gonçalves, F. B., Ribeiro, A. B. N., Aires, V. B., Erasmo, E. A. L., & Silva, K. L. F. (2023). Physiological and anatomical responses of *Eugenia dysenterica* to glyphosate. *Rodriguésia*, 74, e01172022. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202374036>.

Belz, R. G., & Duke, S. O. (2014). Herbicides and plant hormesis. *Pest management science*, 70(5), 698-707. <https://doi.org/10.1002/ps.3726>.

Bieleski, R. I., & Turner N. A. (1966). Separation and estimation of aminoacids in crude plants extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry*, 17(2), 278–293. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90206-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90206-5).

Borges, M. P. S., Silva, D. V., Souza, M. F., Silva, T. S., Teófilo, T. M. S., Silva, C. C., Pavão, Q. S., Passos, A. B. R. J., & Santos, J. B. (2021). Glyphosate effects on tree species natives from Cerrado and Caatinga Brazilian biome: Assessing sensitivity to two ways of contamination. *Science of The Total Environment*, 769, 144113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144113>.

Botten, N., Wood, L. J., & Werner, J. R. (2021). Glyphosate remains in forest plant tissues for a decade or more. *Forest Ecology and Management*, 493, 119259. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119259>.

- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Castanheira, D. T., Alecrim, A. O., Voltolini, G. B., Rezende, T. T., Netto, P. M., & Guimarães, R. J. (2019). Growth, anatomy and physiology of coffee plants intoxicated by the herbicide glyphosate. *Coffee Science*, 14(1), 76-82. <https://doi.org/10.25186/cs.v14i1.1530>.
- Costa, R. N., Bevilaqua, N. C., Krenchinski, F. H., Giovanelli, B. F., Pereira, V. G. C., Velini, E. D., & Carbonari, C. A. (2023). Hormetic Effect of Glyphosate on the Morphology, Physiology and Metabolism of Coffee Plants. *Plants*, 12(12), 2249. <https://doi.org/10.3390/plants1212224>.
- Cruz, C. E. S., Freitas-Silva, L., Ribeiro, C., & Silva, L. C. (2021). Physiological and morphoanatomical effects of glyphosate in *Eugenia uniflora*, a Brazilian plant species native to the Atlantic Forest biome. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 21334–21346. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12003-4>.
- Doğramacı, M., Anderson, J. V., Chao, W. S., & Foley, M. E. (2014). Foliar application of glyphosate affects molecular mechanisms in underground adventitious buds of leafy spurge (*Euphorbia esula*) and alters their vegetative growth patterns. *Weed science*, 62(2), 217-229. <https://doi.org/10.1614/WS-D-13-00156.1>.
- Doğramacı, M., Foley, M. E., Horvath, D. P., Hernandez, A. G., Khetani, R. S., Fields, C. J., Keating, K. M., Mikel, M. A., & Anderson, J. V. (2015). Glyphosate's impact on vegetative growth in leafy spurge identifies molecular processes and hormone cross-talk associated with increased branching. *BMC genomics*, 16, 395. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1627-9>.
- Dubeux, J. C. B. J., Muir, J. P., Apolinário, V. X. O., Nair, P. K. R., Lira, M. A., & Sollenberger, L. E. (2017). Tree legumes: an underexploited resource in warm-climate silvopastures. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(8), 689-703. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902017000800010>.
- Duke, S. O. (2020a). Glyphosate: environmental fate and impact. *Weed Science*, 68(3), 201-207. <https://doi.org/10.1017/wsc.2019.2>.
- Duke, S. O. (2020b). Glyphosate: uses other than in glyphosate-resistant crops, mode of action, degradation in plants, and effects on non-target plants and agricultural microbes. In Knaak, J. B. (Ed.), *Reviews of environmental contamination and toxicology*, volume 255. Springer Nature. https://doi.org/10.1007/398_2020_53.
- Duke, S. O., Belz, R. G., Carbonari, C. A., & Velini, E. D. (2025). Understanding herbicide hormesis: Evaluating its positive and negative aspects with emphasis on glyphosate. *Advances in Weed Science*, 43, e020250104. <https://doi.org/10.51694/AdvWeedSci/2025;43:00006>.
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319–325. <https://doi.org/10.1002/ps.1518>.
- Faria, G. S., Carlos, L., Vasconcelos-Filho, S. C., Freitas, S. T. F., Lourenço, L. L., Sousa, A. C. D., Bessa, L. A., & Vitorino, L. C. (2024). Tolerance of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne. to glyphosate. *Brazilian Journal of Biology*, 84, e279984. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.279984>.

Faria, G. S., Carlos, L., Jakelaitis, A., Filho, S. C. V., Lourenço, L. L., Costa, A. M., & Gonçalves, I. A. (2022). Tolerance of *Hymenaea courbaril* L. to glyphosate. *Ecotoxicology*, 31, 168–177. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02499-y>.

Fernie A. R., Roscher A., Ratcliffe R. G., & Kruger N.J. (2001). Fructose 2,6- biphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*, 212, 250-263. <https://doi.org/10.1007/s004250000386>.

Freitas-Silva, L., Araújo, H. H., Meireles, C. S., & Silva, L.C. (2022). Plant exposure to glyphosate-based herbicides and how this might alter plant physiological and structural processes. *Botany*, 100(6), 473-480. <https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0033>.

Freitas-Silva, L., Araújo, T. O., Nunes-Nesi, A., Ribeiro, C., Costa, A. C., & Silva, L. C. (2020). Evaluation of morphological and metabolic responses to glyphosate exposure in two neotropical plant species. *Ecological Indicators*, 113, 106246. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106246>.

Fuchs, B., Laihonon, M., Muola, A., Saikkonen, K., Dobrev, P. I., Vankova, R., & Helander, M. (2022). A Glyphosate-Based Herbicide in Soil Differentially Affects Hormonal Homeostasis and Performance of Non-target Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 787958. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.787958>.

Fuchs, B., Saikkonen, K., & Helander, M. (2021). Glyphosate-modulated biosynthesis driving plant defense and species interactions. *Trends in plant science*, 26(4), 312-323. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.11.004>.

Gomes, M. P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M., & Juneau, P. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), 4691–4703. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru269>.

Hoagland D. R., & Arnon D. I. (1950). The waterculture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, 347(2). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19500302257>.

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>.

Hongtao J., Ling, L., Kexue, L., Qingen, X., Zhijuan, W., Xuhua, Z., & Xia, L. (2014). PEG-mediated osmotic stress induces premature differentiation of the root apical meristem and outgrowth of lateral roots in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), 4863–4872. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru255>.

Huang, Y., Zhou, J., Li, Y., Quan, R., Wang, J., Huang, R., & Qin, H. (2021). Salt Stress Promotes Absciscic Acid Accumulation to Affect Cell Proliferation and Expansion of Primary Roots in Rice. *International Journal of Molecular Science*, 22(19), 10892. <https://doi.org/10.3390/ijms221910892>.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (2024). *Relatórios de comercialização de agrotóxicos*. Ministério do Meio Ambiente e do Clima.

<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 20 fev. 2025.

Iqbal, N., & Poór, P. (2025). Plant Protection by Tannins Depends on Defence-Related Phytohormones. *Journal of Plant Growth Regulation*, 44, 22–39. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11291-1>.

Jan, M., Muhammad, S., Jin, W., Zhong, W., Zhang, S., Lin, Y., Zhou, Y., Liu, J., Liu, H., Munir, R., Yue, Q., Afzal, M., & Wang, G. (2024). Modulating root system architecture: cross-talk between auxin and phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1343928. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1343928>.

Ji, H., & Li, X. (2014). ABA mediates PEG-mediated premature differentiation of root apical meristem in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 9(11), e977720. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.977720>.

Khan, A., Kumar, V., Srivastava, A., Saxena, G., & Verma, P. C. (2021). Biomarker-based evaluation of cytogenotoxic potential of glyphosate in *Vigna mungo* (L.) Hepper genotypes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193, 73. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08865-x>.

Khan, S., Zhou, J. L., Ren, L., & Mojiri, A. (2020). Effects of glyphosate on germination, photosynthesis and chloroplast morphology in tomato. *Chemosphere*, 258, 127350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127350>.

Kraus, J. E., & Arduin, M. (1997). *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR.

Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1, 387–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>.

MapBiomias. (2024). *Mapeamento Anual de Cobertura e Uso da Terra no Brasil - Coleção 9*. https://brasil.mapbiomas.org/wp-content/uploads/sites/4/2024/12/Factsheet-Agricultura_C9_05.12_v2.pdf. Acesso em: 16 jul. 2025.

Martinelli, R., Rufino, L. R., Jr., Melo, A. C., La Cruz, R. A., Silva, M. F. G. F., Silva, J. R., Boaretto, R. M., Monquero, P. A., Mattos, D., Jr., & Azevedo, F. A. (2022). Glyphosate excessive use chronically disrupts the shikimate pathway and can affect photosynthesis and yield in citrus trees. *Chemosphere*, 308, 136468. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136468>.

Mendes, K. F., Sousa, R. N., Lima, A. C., & Godoi, M. A., Jr. (2023). Understanding the Environmental Behavior of Herbicides: A Systematic Review of Practical Insights. In Mendes, K. F. (Ed.), *Pesticides - Agronomic Application and Environmental Impact*. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1002280>.

Mendes, K.F., Mielke, K.C., D'Antonino, L., Silva, A. A. (2022). Retention, Absorption, Translocation, and Metabolism of Herbicides in Plants. In Mendes, K. F., Silva, A. A. (Eds.), *Applied Weed and Herbicide Science*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-01938-8_5.

Mercado, S. A. S., & Caleño, J. D. Q. (2020). Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. *Science of the Total Environment*, 700, 134452. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134452>.

- Mohamed, M., Aliyat, F. Z., Messaoud, B. B., Simone, C., Marina, M., Filippo, G., Laila, N., & Jamal, I. Effects of Pesticides Use (Glyphosate & Paraquat) on Biological Nitrogen Fixation. *Water Air Soil Pollut*, 232, 419. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05367-x>.
- Moraes, I. C., Novais, H. O., Techio, V. H., & Pereira, W. A. (2024). Effects of glyphosate on the morphology and cell cycle of soybean seedlings tolerant and sensitive to the herbicide. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 59, e03432. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2024.v59.03432>.
- Morim, M. P., Mesquita, A. L., Bonadeu, F. (2020). *Enterolobium*. Flora do Brasil/Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB83154>. Acesso em: 15 jul. 2025.
- Nair, P. R., Kumar, B. M., & Nair, V. D. (2022). Biological nitrogen fixation and nitrogen fixing trees. In *An Introduction to Agroforestry: Four Decades of Scientific Developments* (pp. 413-443). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-75358-0_17.
- Nittis, M., Vivo, M., Ioio, R. D., & Sabatini, S. (2025). Hormonal regulation of primary root development. *Cell Reports*, 44(6), 115751. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.115751>.
- O'Brien, T. P., & McCully, M. E. (1981). *The study of plant structure: principles and selected methods*. Termarcarphi.
- Oliveira, A. P. A., Crispim-Filho, A. J., Santos, V. R. S., Costa, A. C., & Silva, K. L. F. (2021). Physiological and morphoanatomic responses of *Bowdichia virgilioides* kunth. (Fabaceae) to glyphosate. *Revista Árvore*, 45, e4528. <https://doi.org/10.1590/1806-908820210000028>.
- Parvin, K., Nahar, K., Mohsin, S.M., Al Mahmud, J., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2022). Plant Phenolic Compounds for Abiotic Stress Tolerance. In Hasanuzzaman, M., Ahammed, G.J., Nahar, K. (Eds.), *Managing Plant Production Under Changing Environment* (pp. 193–237). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5059-8_8.
- Pereira, T. C., Marrega, J. O., Araújo, M. A., Martins, A. R. (2025). Stem base and root anatomy of four young legumes from the Cerrado: implications for fire resilience. *Flora*, 152801. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2025.152801>.
- Raza, A., Zahra, N., Hafeez, M. B., Ahmed, M., Iqbal, S., Shaukat, K., & Ahmad, G. (2020). Nitrogen Fixation of Legumes: Biology and Physiology. In Hasanuzzaman, M., Araújo, S., Gill, S. (Eds.), *The Plant Family Fabaceae* (pp. 43–74). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2_3.
- Rezende-Silva, S. L., Costa, A. C., Dyszy, F. H., Batista, P. F., Crispim-Filho, A. J., Nascimento, K. J. T., & Silva, A. A. (2019). *Pouteria torta* is a remarkable native plant for biomonitoring the glyphosate effects on Cerrado vegetation. *Ecological indicators*, 102, 497-506. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.03.003>.
- Rezende-Silva, S. L., Costa, A. C., Pedroso, A. N. V., Batista, P. F., Crispim-Filho, A. J., Almeida, G. M., Nascimento, K. J. T., Ferreira, L. L., Domingos, M., & Silva, A. A. (2022). Morphophysiological indicators of the glyphosate action on Brazilian savanna plants: a multivariate analysis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44, 73. <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03409-3>.

- Saikia, P., Nag, A., Anurag, S., Chatterjee, S., & Khan, M. L. (2020). Tropical legumes: Status, distribution, biology and importance. In Hasanuzzaman, M., Araújo, S., Gill, S. (Eds.), *The Plant Family Fabaceae* (pp. 27-41). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2_2.
- Santos, G. A. N., Filho, C. S., Schimpl, F. C., Souza, S. C. R., Junior, A. R. N., Garcia, R. P. O., & Silva, J. F. (2023). Metabolism of guarana (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis*) plants and fruit production subjected to glyphosate doses. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 58(1), 69-79. <https://doi.org/10.1080/03601234.2023.2172275>.
- Santos, V. R. S., Crispim-Filho, A. J., Santana, M. M., Costa, A. C., & Silva, K. L. F. (2020). Análises fisiológicas e morfoanatômicas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Fabaceae) submetida a diferentes concentrações de glifosato. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 11(5), 159–173. <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2020.005.0017>.
- Schrübbbers, L. C., Valverde, B. E., Sørensen, J. C., & Cedergreen, N. (2014). Glyphosate spray drift in *Coffea arabica* – Sensitivity of coffee plants and possible use of shikimic acid as a biomarker for glyphosate exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 115, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.08.003>.
- Sindiveg - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. (2024). *Levantamento dos principais números do setor de defensivos agrícolas no Brasil*. <https://sindiveg.org.br/mercado-total/>. Acesso em: 15 jul. 2025.
- Singh, N., Bansal, P., & Srivastava, A. (2021). Effect of glyphosate on morphological, physiological and mitotic parameters of *Vigna radiata* varieties IPM 02-03 and IPM 02-14. *Brazilian Journal of Botany*, 44, 837-847. <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00766-0>.
- Soares, C., Pereira, R., Martins, M., Tamagnini, P., Serôdio, J., Moutinho-Pereira, J., Cunha, A., & Fidalgo, F. (2020). Glyphosate-dependent effects on photosynthesis of *Solanum lycopersicum* L. — An ecophysiological, ultrastructural and molecular approach. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122871. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122871>.
- Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science*, 12(7), 282-285. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.006>.
- Sulpice, R., Pyl, E. -T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M. C., von Korff M., Steinhauser, M. C., Keurentjes, J. J. B., Guenther, M., Hoehne, M., Selbig, J., Fernie, A. R., Altmann, T., & Stitt, M. (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Science*, 106(25), 10348-10353. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903478106>.
- Wegner, L. H. (2022). Empowering roots - Some current aspects of root bioenergetics. *Frontiers in Plant Science*, 13, 853309. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.853309>.
- Wood, L. J., Botten, N., Fredeen, A. L., & Werner, J. R. (2024). Glyphosate-based herbicide contributes to nutrient variability in forest plants. *Frontiers in Forests and Global Change*, 7, 1463454. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2024.1463454>.
- Yemm, E. W., Cocking, E. C., Ricketts, E. R. (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 80(948), 209-214. <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>.

Zhang, H., Mu, Y., Zhang, H., & Yu, C. (2023). Maintenance of stem cell activity in plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1302046. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1302046>.

Zobiolo, L. H. S., Kremer, R. J., Oliveira, R. S., Jr., & Constantin, J. (2012). Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *175*(2), 319–330. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000434>.

Figuras

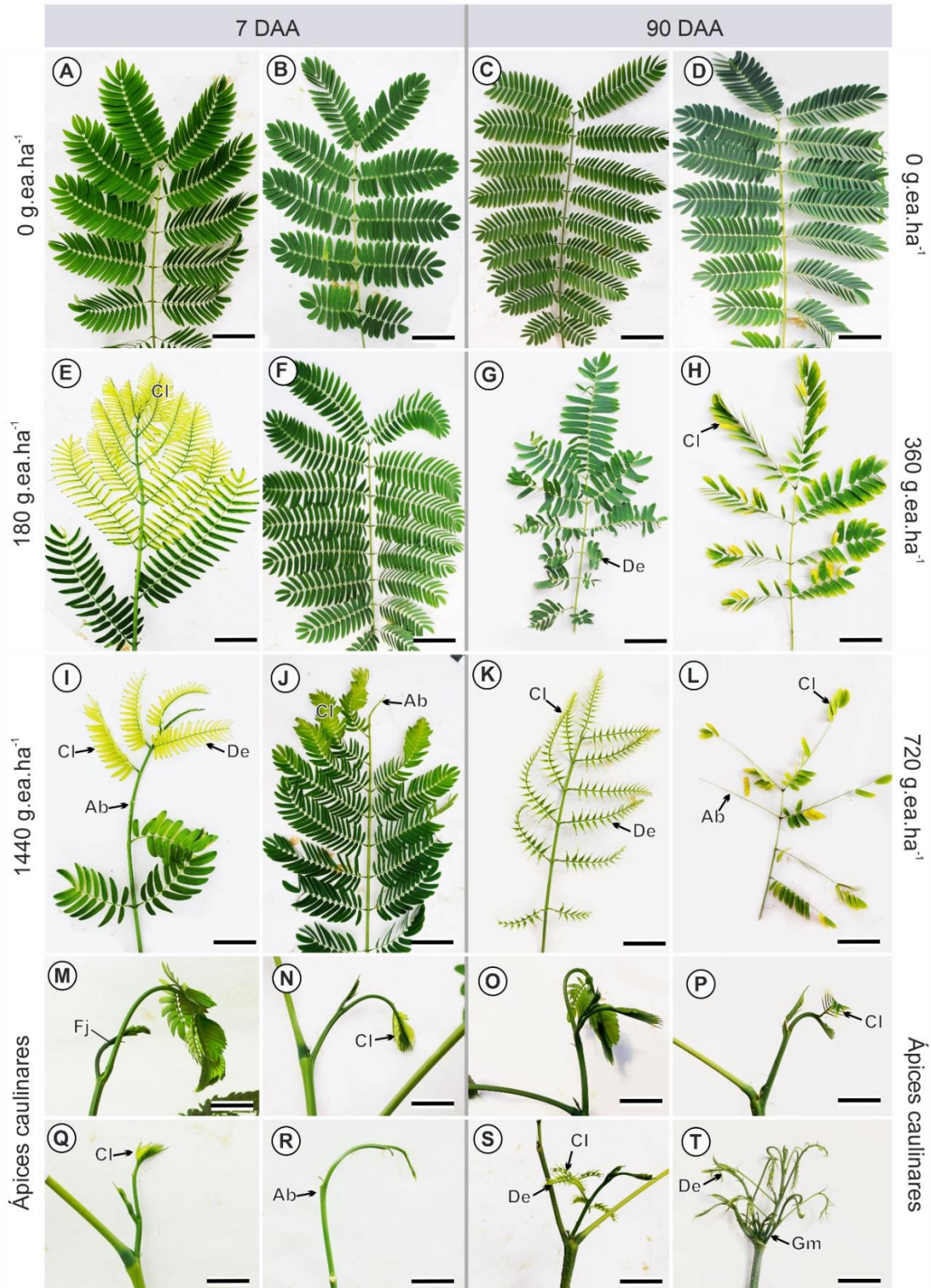


Figura 1. Caracterização visual das folhas (A-L) e ápices caulinares (M-T) de *Enterolobium contortisiliquum* 7 e 90 dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. Folhas jovens (A, E, I e C, G, K) e folhas expandidas (B, F, J e D, H, L). Controle (A-D, M e O), dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (E, F, N e P), 360 g.e.a.ha⁻¹ (G, H e S), 720 g.e.a.ha⁻¹ (K, L, Q e T) e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (I, J e R). Abreviações: Ab - abscisão de folíolos e foliólulos, Cl - clorose, De - deformação

dos foliólulos, Gm - gemas e brotos múltiplos na porção apical, Fj – folha jovem em desenvolvimento na região apical. Barras: A-L (5 cm), M -T (1 cm).



Figura 2. Caracterização visual das raízes (A, C, E, G, I e K) e ápices radiculares (B, D, F, H, J e L) de *Enterolobium contortisiliquum* 7 e 90 dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. Controle (A-D), dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (E e F), 360 g.e.a.ha⁻¹ (G e H), 720 g.e.a.ha⁻¹ (K e L) e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (I-J). Abreviações: Ap – ápice radicular, Di – dilatação da porção terminal da raiz, Ru – ruptura da epiderme e lesão do tecido, No – nódulos radiculares e detalhe em maior aumento, linhas tracejadas representam o contorno das raízes. Barras: A-I (10 cm), J e L (0,25 cm).

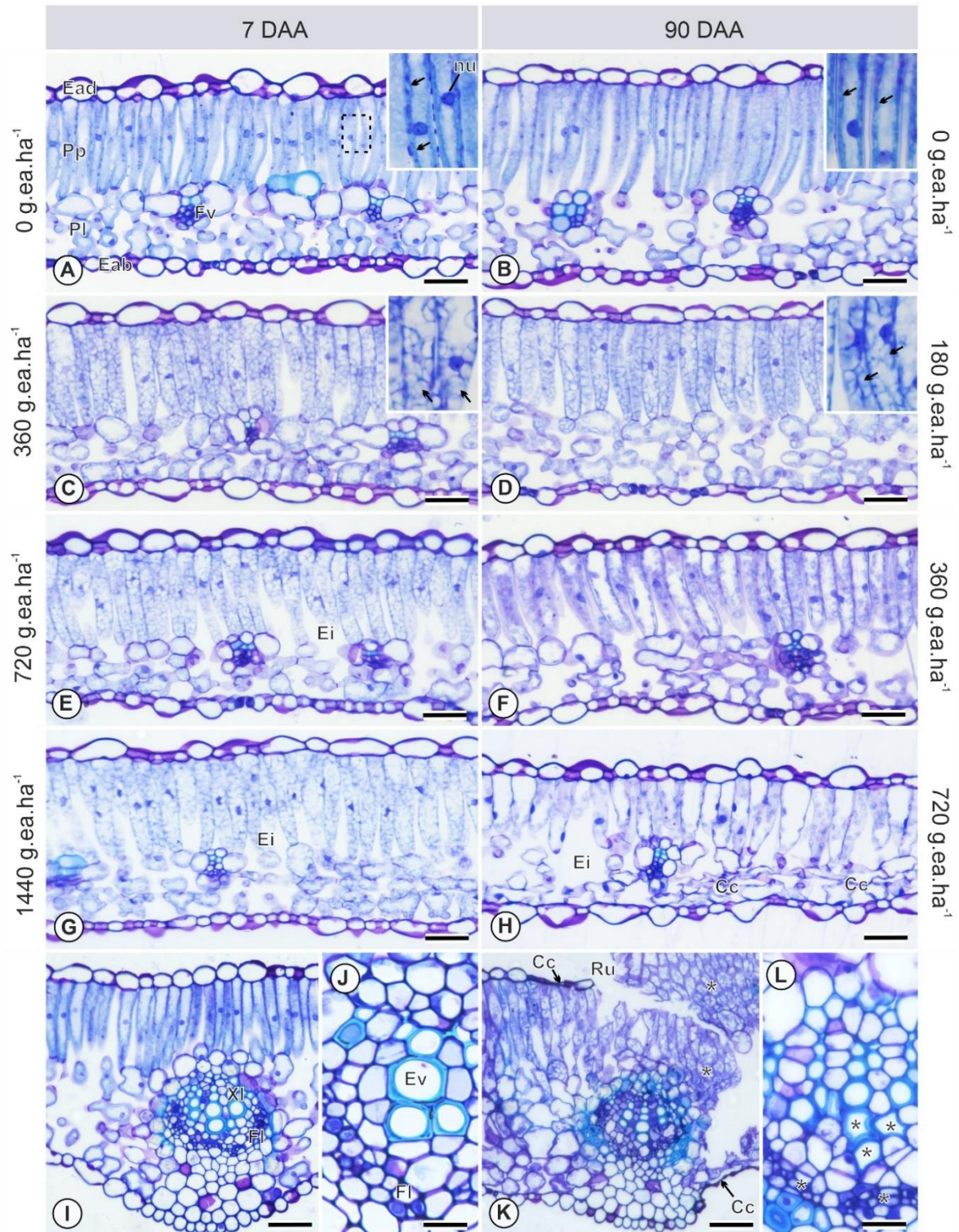


Figura 3. Caracterização anatômica das folhas completamente expandidas de *Enterolobium contortisiliquum*, 7 e 90 dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. Controle (A, B, I e K), dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (D), 360 g.e.a.ha⁻¹ (C), 720 g.e.a.ha⁻¹ (E, H, K e L) e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (G e J). Abreviações: Cc - colapso celular, Eab - epiderme da face abaxial, Ead - epiderme da face adaxial, Ei - espaço intercelular, Ev - elemento de vaso, Fl - floema, Fv - feixe vascular, Nu - núcleo, Pl - parênquima lacunoso, Pp - parênquima paliçádico, Ru - ruptura da epiderme, Xi - xilema, Asterisco - alteração no formato das células de condução, Seta preta cloroplastos. Barras: A-I e K (30 µm), J e L (10 µm).

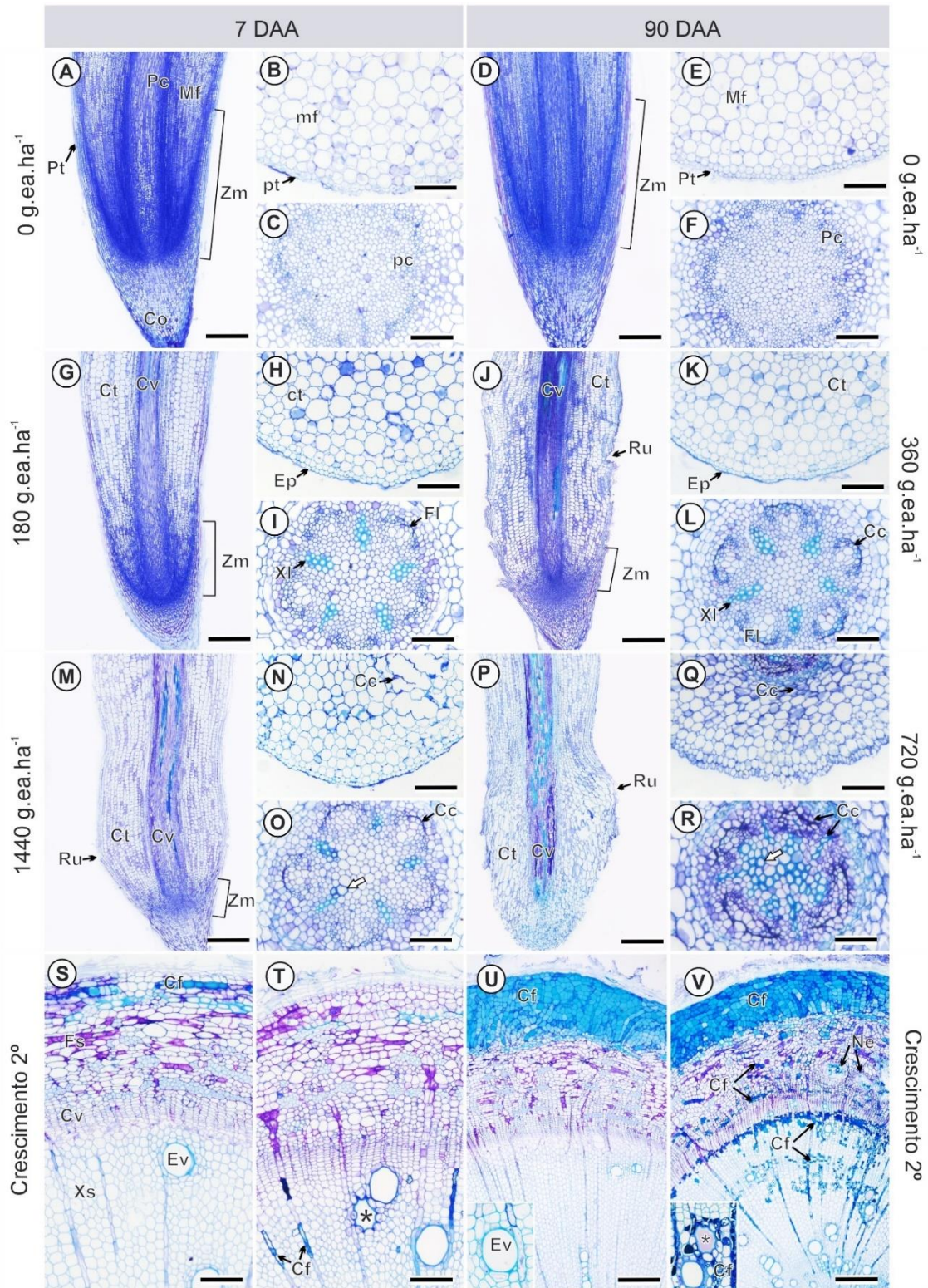


Figura 4. Caracterização anatômica das raízes de *Enterolobium contortisiliquum*, sem sintomas visuais, 7 e 90 dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. Raízes em crescimento primário (A-R) e crescimento secundário (S-V). Controle (A-F, S e U), dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (G-I), 360 g.e.a.ha⁻¹ (J-L), 720 g.e.a.ha⁻¹ (P-R) e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (M-O, T e V). Abreviações: Cc - colapso celular, Cf - compostos fenólicos, Co - coifa, Ct - córtex, Cv - câmbio vascular, Cv - cilindro vascular, Ev - elemento de vaso, Fl - floema, Fs- floema secundário, Mf - meristema fundamental, Ne - necrose, Pc - procâmbio, Pt - protoderme, Ru - ruptura da

epiderme, XI – xilema, Xs Xilema secundário, Zm - zona meristemática, asterisco - alteração do formato dos elementos de vaso, seta branca - células com aspecto pouco lignificado. Barras: A, D, G, J, M e P (300 μm), B, C, E, F, H, I, K, L, N, O, Q, R (75 μm), S e T (100 μm), U e V (250 μm).

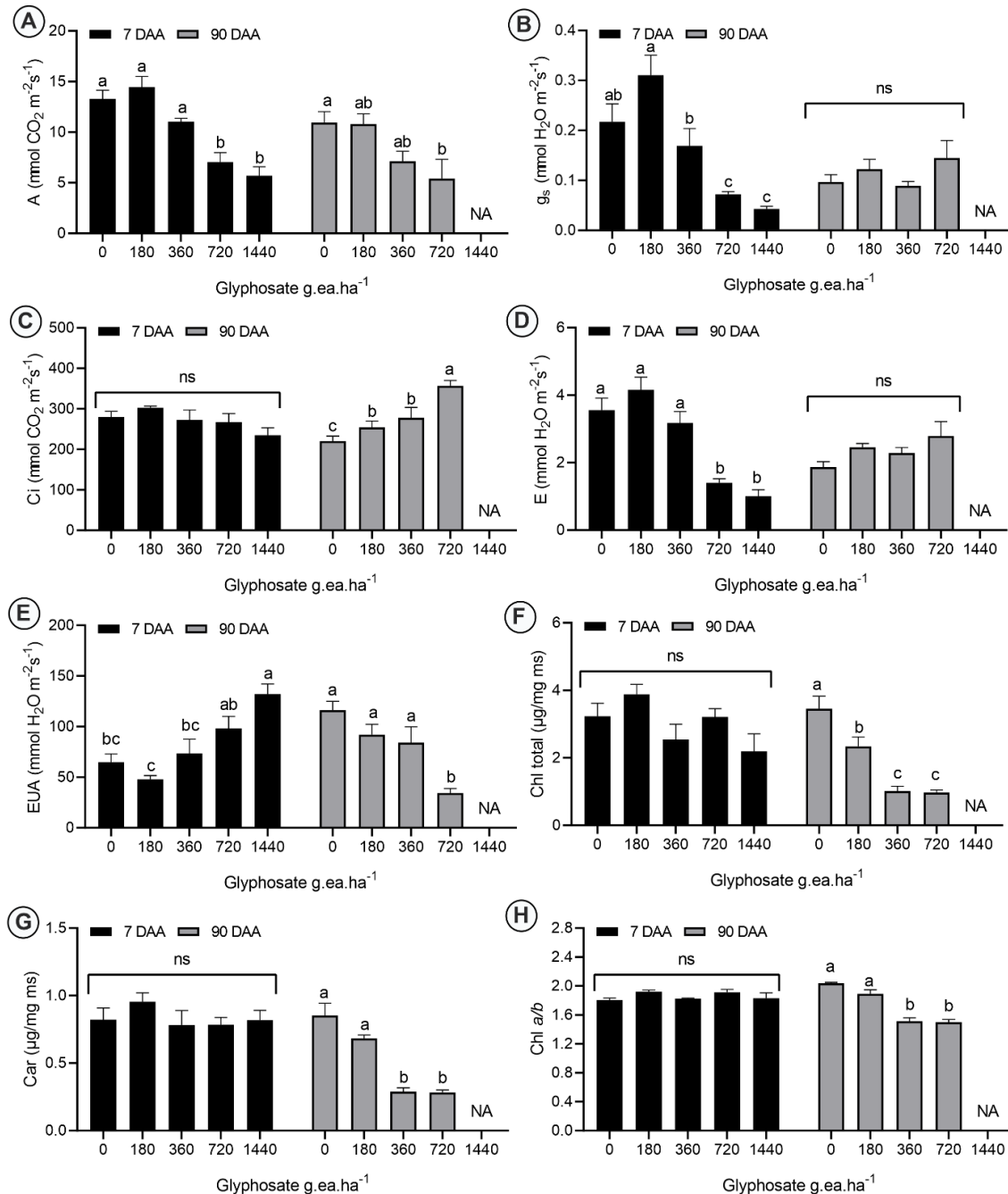


Figura 5. Trocas gasosas (A-E) e quantificação de pigmentos (F-H) em folhas de *Enterolobium contortisiliquum* 7 e 90 dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. A – assimilação de CO₂ (A), gs – condutância estomática (B), Ci – concentração interna de CO₂ (C), E – transpiração (D), EUA – eficiência do uso da água (E), Chl total – clorofila total (F), Car – carotenoides (G) e Chl a/b – razão entre clorofila a e b (H). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (p<0,05). ns – sem diferença estatística significativa. NA – não amostrado (indivíduos mortos). Barras verticais representam o desvio padrão (n=4).

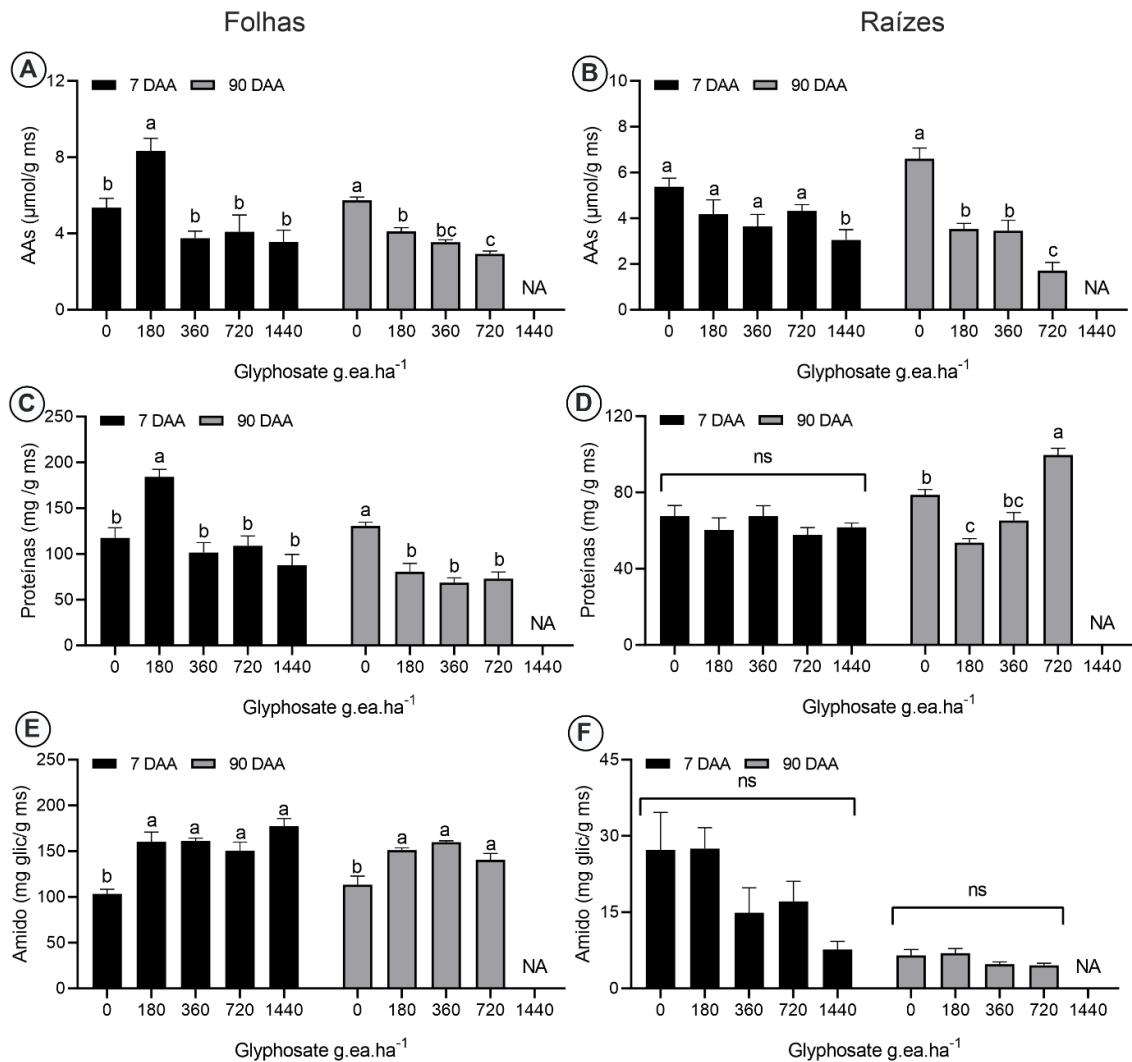


Figura 6. Quantificação de aminoácidos (A e B), proteínas (C e D), amido (E e F) em folhas e raízes de *Enterolobium contortisiliquum* 7 e 90 dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. AAs - aminoácidos. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ns – sem diferença estatística significativa. NA – não amostrado (indivíduos mortos). Barras verticais representam o desvio padrão ($n=4$).

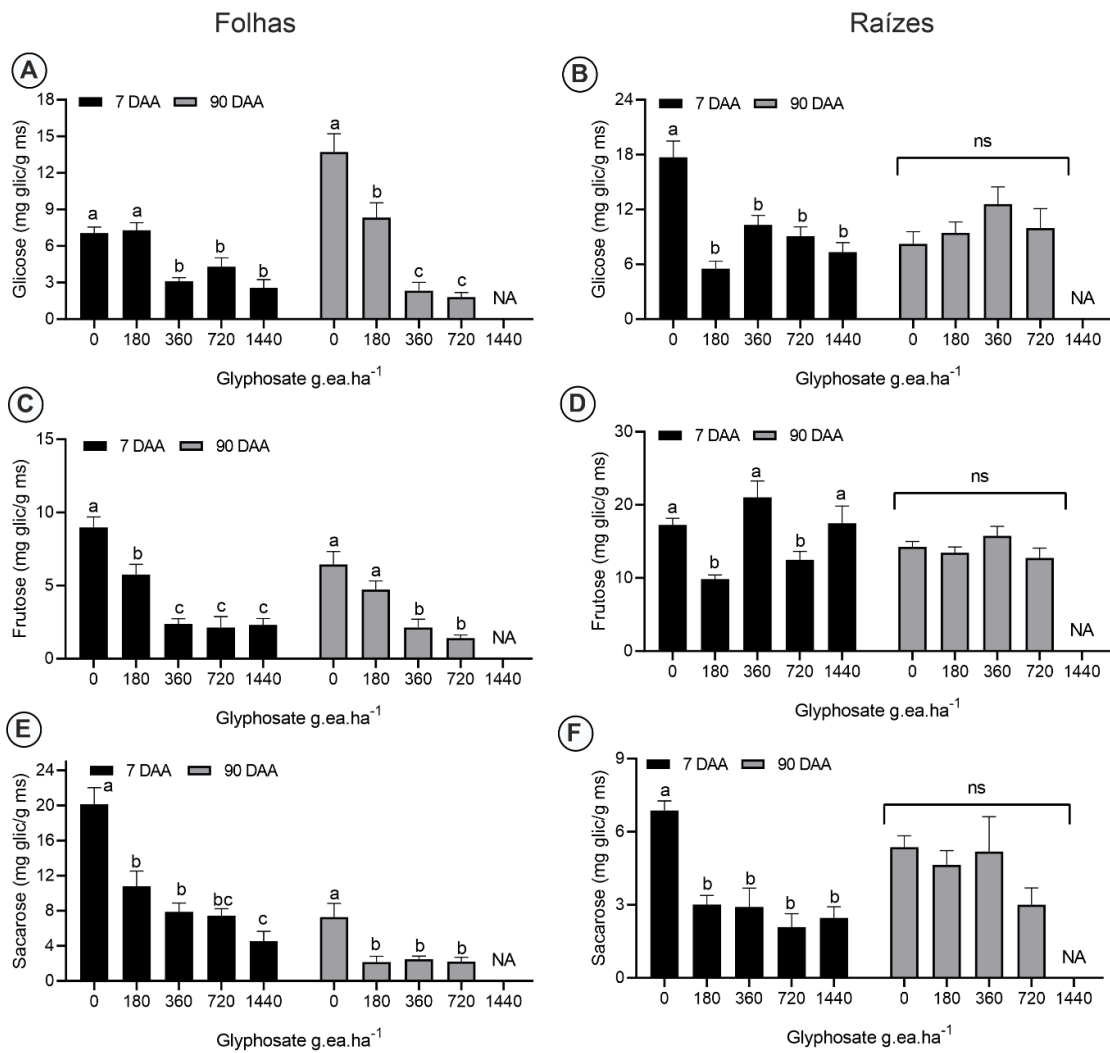


Figura 7. Quantificação de glicose (A e B), frutose (C e D) e sacarose (E e F) folhas e raízes de *Enterolobium contortisiliquum* 7 e 90 dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ns – sem diferença estatística significativa. NA – não amostrado (indivíduos mortos). Barras verticais representam o desvio padrão ($n=4$).

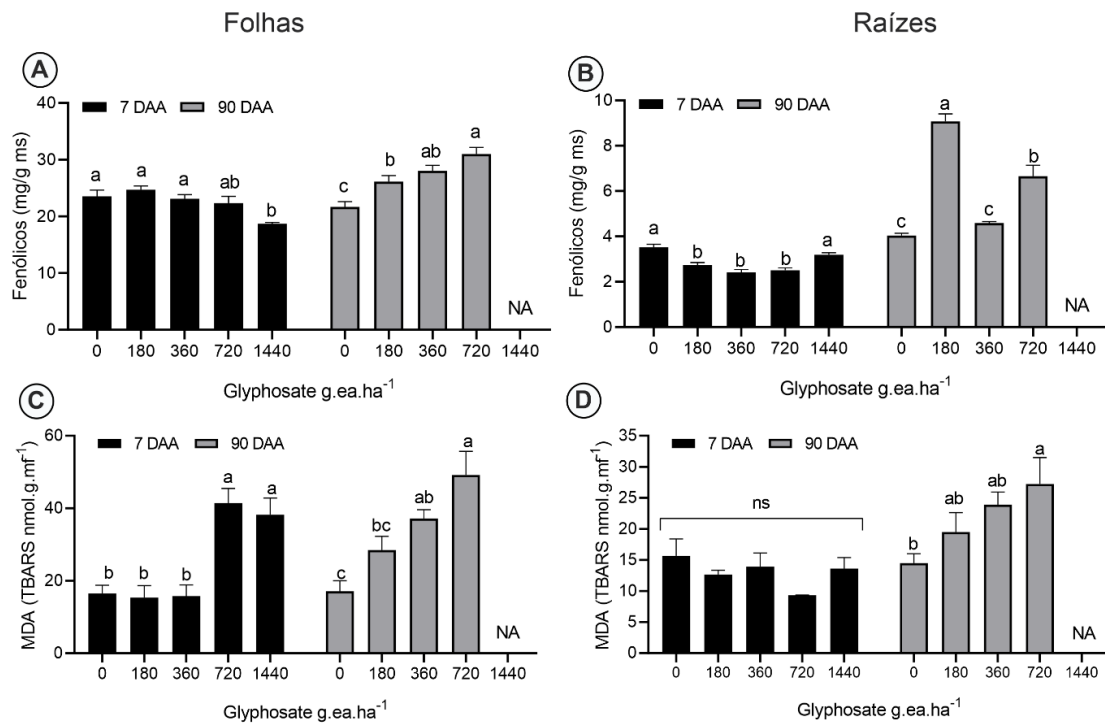


Figura 8. Quantificação de compostos fenólicos (A e B) e peroxidação lipídica (C e D) em folhas e raízes de *Enterolobium contortisiliquum* 7 e 90 dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ns – sem diferença estatística significativa. NA – não amostrado (indivíduos mortos). Barras verticais representam o desvio padrão ($n=4$).

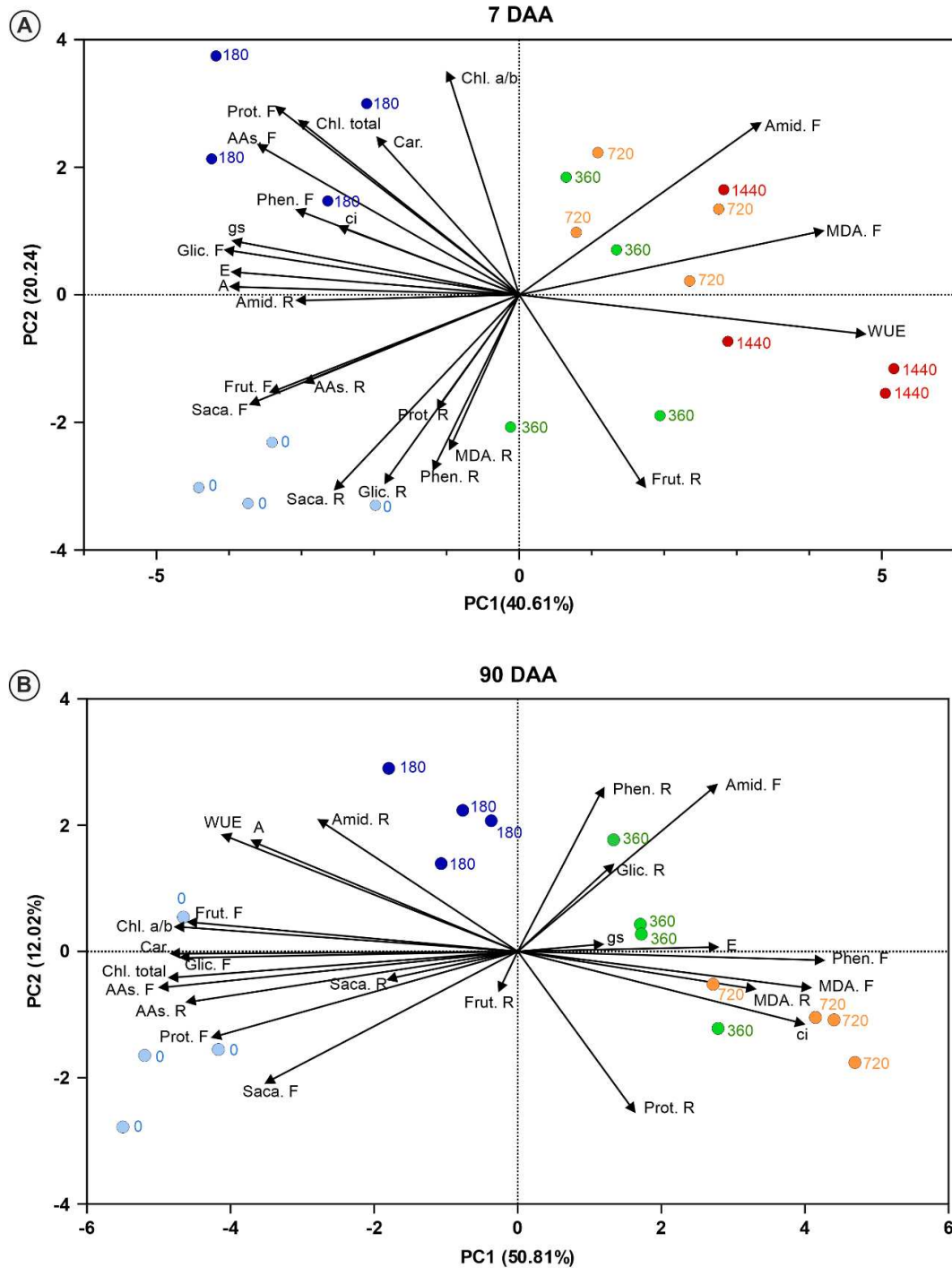


Figura 9. Análise de componentes principais (PCA) das variáveis fisiológicas e bioquímicas de folhas e raízes de *Enterolobium contortisiliquum* aos 7 (A) e 90 (B) dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. A – assimilação de CO₂, g_s – condutância estomática, C_i – concentração interna de CO₂, E – transpiração, WUE – eficiência do uso da água, Chl. Total – clorofila total, Car. - carotenoides, Chl. a/b – razão clorofila a/b, Prot. F – proteínas em folhas, AAs F– aminoácidos em folhas, Phen. F – compostos fenólicos em folhas, Amid. F – amido em folhas, Glic. F – glicose em folhas, Frut. F – frutose me folhas, Saca. F – sacarose em folhas, MDA. F – peroxidação lipídica em folhas, Prot. R – proteínas em raízes, AAs. R – aminoácidos em raízes, Phen. R – compostos fenólicos em raízes, Amid. R – amido em raízes, Glic. R – glicose em raízes, Frut. R – frutose em raízes, Saca. R em raízes, MDA. R – peroxidação lipídica em raízes.

Material suplementar

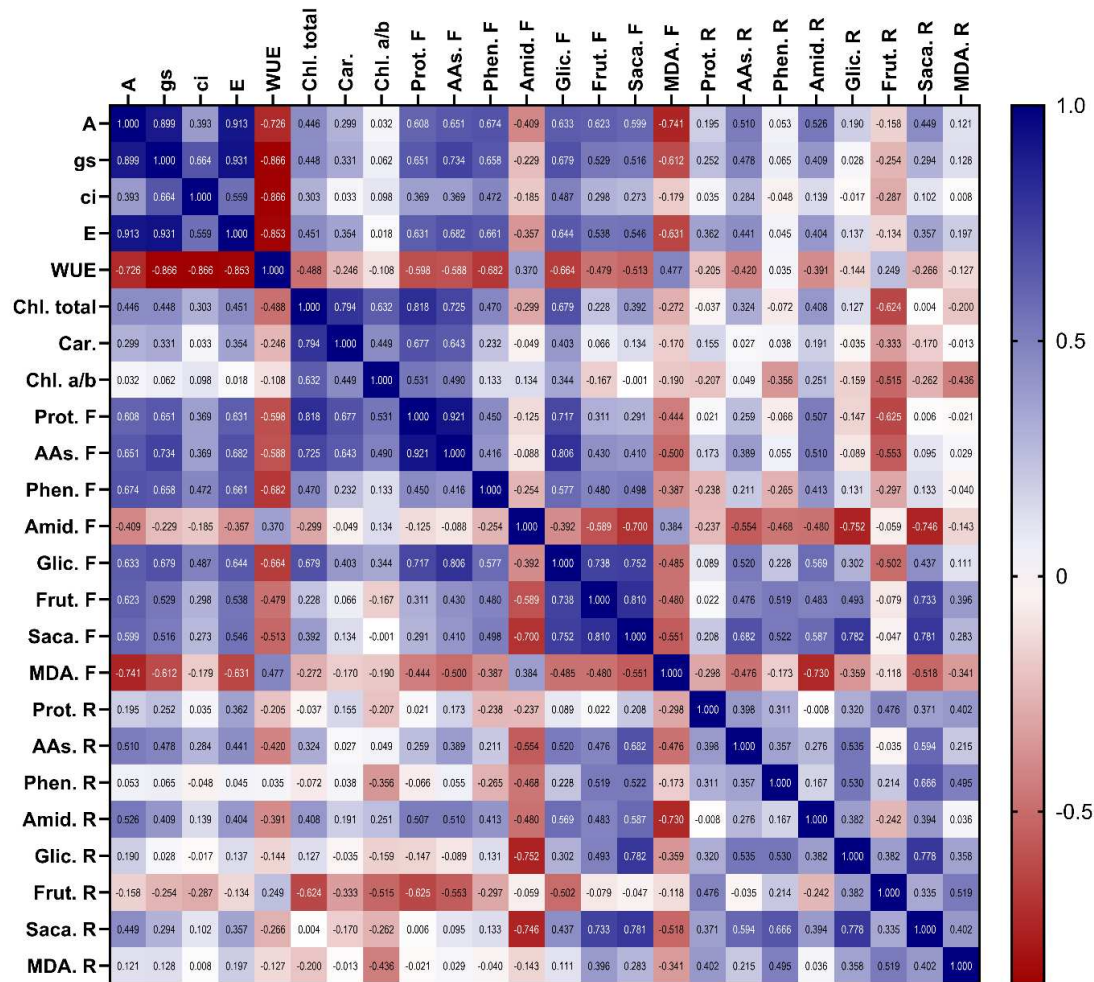


Figura S1. Matrix de correlação de Pearson para as variáveis fisiológicas e bioquímicas de folhas e raízes de *Enterolobium contortisiliquum* 7 dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. Correlação positiva é representada em azul, negativa em vermelho e correlação neutra em branco. A – assimilação de CO₂, g_s – condutância estomática, C_i – concentração interna de CO₂, E – transpiração, WUE – eficiência do uso da água, Chl. Total – clorofila total, Car. - carotenoides, Chl. a/b – razão clorofila a/b, Prot. F – proteínas em folhas, AAs F– aminoácidos em folhas, Phen. F – compostos fenólicos em folhas, Amid. F – amido em folhas, Glic. F – glicose em folhas, Frut. F – frutose me folhas, Saca. F – sacarose em folhas, MDA. F – peroxidação lipídica em folhas, Prot. R – proteínas em raízes, AAs. R – aminoácidos em raízes, Phen. R – compostos fenólicos em raízes, Amid. R – amido em raízes, Glic. R – glicose em raízes, Frut. R – frutose em raízes, Saca. R em raízes, MDA. R – peroxidação lipídica em raízes. A barra lateral indica o nível de contribuição de cada parâmetro analisado para a PC1.

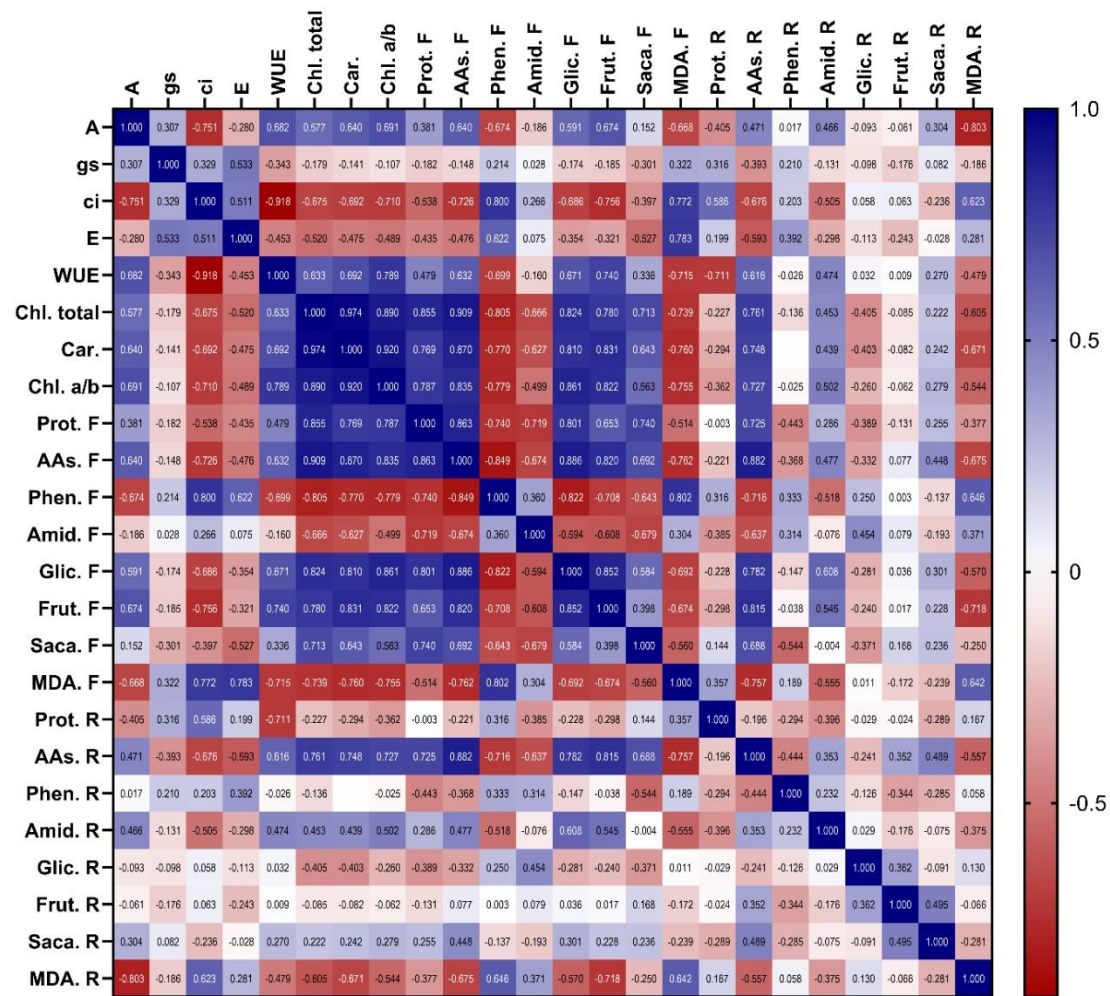


Figura S2. Matrix de correlação de Pearson para as variáveis fisiológicas e bioquímicas de folhas e raízes de *Enterolobium contortisiliquum* 90 dias após a aplicação (DAA) do herbicida glifosato. A – assimilação de CO₂, gs – condutância estomática, ci – concentração interna de CO₂, E – transpiração, WUE – eficiência do uso da água, Chl. Total – clorofila total, Car. - carotenoides, Chl. a/b – razão clorofila a/b, Prot. F – proteínas em folhas, AAs F– aminoácidos em folhas, Phen. F – compostos fenólicos em folhas, Amid. F – amido em folhas, Glic. F – glicose em folhas, Frut. F – frutose me folhas, Saca. F – sacarose em folhas, MDA. F – peroxidação lipídica em folhas, Prot. R – proteínas em raízes, AAs. R – aminoácidos em raízes, Phen. R – compostos fenólicos em raízes, Amid. R – amido em raízes, Glic. R – glicose em raízes, Frut. R – frutose em raízes, Saca. R em raízes, MDA. R – peroxidação lipídica em raízes. A barra lateral indica o nível de contribuição de cada parâmetro analisado para a PC1.

Efeitos do herbicida glifosato no desenvolvimento inicial de gemas e botões florais de *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilg. (Bixaceae), uma espécie nativa do Cerrado: Alterações visuais, micromorfológicas e estruturais

Hugo Humberto de Araújo^a; Graciele Daiane Diniz Soares^a; Vanessa de Carvalho Harthman^b; Luzimar Campos da Silva^{a*}

^a Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brasil.

^b Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus do Pantanal, Av. Rio Branco, 1270, Bairro Universitário, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil.

* Autor de correspondência: luzimar@ufv.br

Resumo

Os danos em resposta ao glifosato se estendem para além da fase vegetativa e podem interferir na reprodução de plantas não alvo próximas a campos agrícolas. No entanto, existem muitas lacunas sobre os impactos do glifosato na fase reprodutiva de espécies nativas, em ecossistemas tropicais como o Cerrado. Nossa hipótese é que o glifosato mesmo em concentrações inferiores às utilizadas nas aplicações convencionais em campo, pode promover alterações no desenvolvimento inicial de gemas apicais e botões florais de *Cochlospermum regium*, uma espécie não alvo nativa, com ampla distribuição no Cerrado. Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do glifosato na morfoanatomia e no desenvolvimento inicial de botões e gemas florais de *C. regium*. Mudanças foram submetidas à pulverização com um herbicida comercial à base de glifosato. As doses utilizadas foram 0, 180, 360, 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ que correspondem, respectivamente, a 0, 12.5, 25, 50 e 100% da dose aplicada convencionalmente em campo. A caracterização visual foi feita aos 7, 45 e 90 dias após a aplicação do herbicida. Decorridos 90 DAA, ápices caulinares e botões florais foram coletados para análises anatômicas, micromorfológicas e histoquímicas. O glifosato promoveu alterações morfoanatômicas e no desenvolvimento inicial de gemas apicais e botões florais de *C. regium*, mesmo em doses abaixo das utilizadas em campo convencionalmente. Somente plantas do controle chegaram à fase de antese durante o período de avaliação. Nas menores doses, o herbicida promoveu alterações morfoanatômicas e atraso no desenvolvimento de botões florais. Nas maiores doses, o herbicida promoveu a formação de gemas múltiplas, inibição no

desenvolvimento de gemas florais, senescência das estípulas e danos nos ápices caulinares. Além disso, o herbicida promoveu colapso de tricomas secretores e tectores, alteração na densidade visual e formato dos laticíferos e idioblastos secretores de mucilagem. Em conjunto, essas alterações podem comprometer a reprodução de *C. regium* por meio do atraso no pico de floração, redução do desenvolvimento e proteção de botões florais. Este é o primeiro estudo a descrever os impactos morfoanatômicos do glyphosate no desenvolvimento de gemas e botões florais em uma espécie tropical perene nativa do Cerrado.

Palavras-chave: Anatomia floral. Biomarcadores. Estruturas secretoras. Pesticidas. Plantas nativas.

1. Introdução

O uso de pesticidas em larga escala é uma prática cada vez mais comum para garantir a alta produtividade agrícola. Dentre os pesticidas, os herbicidas apresentaram o maior volume de produto comercializado no Brasil em 2024 (Sindiveg, 2024). Herbicidas são produtos utilizados no controle de plantas daninhas que podem comprometer o desenvolvimento e produtividade das culturas de interesse. Devido ao manejo inadequado e uso recorrente, uma parte dos herbicidas pulverizados pode alcançar áreas não planejadas por diferentes vias (deriva, escoamento superficial, lixiviação, volatilização) e pode contaminar o solo, a água e atingir plantas não alvo (Boutin e Rogers, 2000; Barroso et al., 2023; Mendes et al., 2023). A deriva ocorre quando parte do produto pulverizado, principalmente pela ação do vento e volatilização, é transportado para áreas não planejadas adjacentes às lavouras (Mendes et al., 2023). A deriva de herbicidas pode representar um risco para a população de plantas nativas que ocorrem em áreas próximas a campos agrícolas (Carpenter et al., 2020; Albaseer et al., 2025).

O glifosato é o herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo (Duke, 2018; IBAMA et al., 2023). O crescimento do uso desse herbicida é justificado pela eficiência no controle de diferentes tipos de plantas daninhas, baixo custo e ao desenvolvimento das culturas resistentes ao glifosato (Duke, 2018). O glifosato é um herbicida sistêmico, de pós-emergência, que atua na rota do ácido chiquímico, inibindo a biossíntese de aminoácidos essenciais (triptofano, fenilalanina e tirosina) e, conseqüentemente, provoca danos no metabolismo, reduz o desenvolvimento e leva a morte de plantas sensíveis (Gomes et al., 2017; Fuchs et al., 2021). Após a aplicação na parte aérea, o glifosato é translocado pelo floema, no fluxo dos

fotoassimilados, para regiões metabolicamente ativas, como ápices caulinares, folhas, flores e frutos em desenvolvimento (Gomes et al., 2017; Freitas-Silva et al., 2022). Apesar dos efeitos do glifosato serem bem documentados em plantas daninhas e culturas de interesse agrícola, os impactos em plantas nativas não alvo ainda são pouco estudados. A maioria das pesquisas com espécies não alvo limitam-se à avaliação de parâmetros fisiológicos, metabólicos e morfoanatomia de órgãos vegetativos, especialmente folhas (Rezende-Silva et al., 2019; Freitas-Silva et al. 2020; Santos et al., 2023; Cruz et al. 2021; Araújo et al., 2025). No entanto, devido ao mecanismo de translocação e à ação sistêmica, órgãos reprodutivos, como as flores, podem ser negativamente afetados pela ação desse herbicida.

Mesmo em baixas doses, os herbicidas podem afetar aspectos da reprodução de plantas não alvo (Boutin et al., 2014; Dupont et al., 2018). Alguns estudos tem demonstrado os diferentes efeitos negativo do glifosato na floração e reprodução de espécies não alvo. Carpenter et al. (2020) demonstraram que, entre cinco herbicidas, o glifosato foi o que causou a maior redução no número total de flores em plantas não alvo. De modo semelhante, Strandberg et al. (2021) relataram atraso no período de floração e redução no número cumulativo de flores em plantas submetidas à deriva de glifosato numa faixa de 20 m do local de aplicação. Golt et al. (2021) descreveram alterações na morfologia das pétalas, redução na deiscência das anteras e na viabilidade dos grãos de pólen em flores de *Rosa aciculares* expostas ao glifosato, tanto em condições simuladas quanto em campo. Olszyk et al., (2024) demonstraram que o glifosato pode alterar a fenologia da floração com implicações na produção de sementes em espécies nativas não alvo.

Apesar do avanço no entendimento sobre os efeitos do glifosato na reprodução de espécies não alvo, a maioria dessas investigações teve como foco espécies da América do Norte e Europa (Boutin et al., 2014; Olszyk et al., 2017; Dupont et al., 2018; Carpenter et al., 2020; Strandberg et al., 2021; Golt et al., 2021; Olszyk et al., 2024). Em contrapartida, o impacto do glifosato na reprodução de plantas nativas de ecossistemas tropicais como o Cerrado, onde o uso de glifosato é recorrente, ainda é extremamente subestimado. O Cerrado ocupa cerca de 24% do território brasileiro e é responsável por grande parte da produção agrícola nacional (Rodrigues, 2024). A região contribui significativamente na produção de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar (Rodrigues, 2024), que são algumas das culturas que demandam o maior volume de aplicação de glifosato, devido ao desenvolvimento de cultivares resistentes a este herbicida. O cerrado é um dos ecossistemas mais biodiverso com status de *hotspot* de biodiversidade (Myers et al. 2000). Além disso, o Cerrado faz conexão com outros biomas

como Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e Amazônia, onde a agricultura também está em processo de expansão (Colli et al., 2020; MapBiomas, 2024).

Cochlospermum regium (Bixaceae), conhecida popularmente como algodãozinho-do-cerrado, é uma espécie subarborescente, nativa, com folhas alternas, simples, palmatilobadas (Fig. 1 A), com ampla distribuição no Brasil e ocorrência comum no Cerrado (Silva et al., 2020). Durante a estação seca, a espécie perde as folhas e inicia a floração (Fig. 1 B), com posterior rebrota das folhas na estação chuvosa (Ferri et al., 1971). O sistema subterrâneo de reserva é utilizado na medicina popular para o tratamento de diversas doenças (Camillo et al., 2018). As flores amarelas vistosas estão dispostas em inflorescência tipo panícula (Fig. 1 B e C), possuem potencial ornamental além de fornecerem recursos para polinizadores (Silva et al., 2020) e possuírem propriedades medicinais (Menezes-Filho et al., 2020). No Cerrado, a redução das populações naturais dessa espécie é reflexo da expansão agrícola, que promove a perda de muitas áreas de vegetação nativa (Silva et al., 2020). Tendo em vista a ampla distribuição de *C. regium* nas áreas de Cerrado, que representam uma significativa porção do território destinado à agricultura de alta produtividade (Rodrigues, 2024), esta espécie frequentemente se encontra nas proximidades de áreas agrícolas (Fig. 1 A) o que a torna suscetíveis à deriva de herbicidas, como o glifosato.

A hipótese deste trabalho é que, mesmo em concentrações inferiores às utilizadas nas aplicações convencionais em campo, o glifosato promove alterações morfoanatômicas no desenvolvimento inicial de gemas apicais e botões florais de *C. regium*. Desse modo, o objetivo neste estudo foi avaliar o efeito da aplicação do herbicida glifosato na morfoanatomia e desenvolvimento inicial de botões e gemas florais em mudas de *C. regium*. Adicionalmente, buscamos responder às seguintes perguntas: (i) A aplicação do herbicida glifosato em diferentes doses, na fase vegetativa, pode promover alterações a longo prazo na fase reprodutiva de *C. regium*? (ii) Quais são as alterações visuais, micromorfológicas e estruturais promovidas pelo glifosato no desenvolvimento inicial das estruturas reprodutivas de *C. regium*? (iii) Quais possíveis impactos do glifosato na floração e reprodução de *C. regium*?

2. Materiais e métodos

2.1 Condições de cultivo e aplicação do herbicida

Sementes de *Cochlospermum regium* foram coletadas, em outubro de 2023, de plantas matrizes em um fragmento de Cerrado *sensu stricto* no município de Carmo do Paranaíba –

MG, coordenadas 19° 00' 03" S, 46° 18' 57" O. As sementes tiveram o tegumento rompido por escarificação, foram submersas em água destilada por 24h e em seguida semeadas em bandejas plásticas com substrato comercial Topstrato HT® (Vida Verde). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa (20° 45' 33.8" S, 42° 51' 10.4" W), Viçosa, MG. Decorridos 30 dias após o plantio, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 3,8 L com o mesmo substrato utilizado no plantio. Foi feita a aplicação de solução nutritiva de Hoagland ½ força iônica semanalmente (Hoagland e Arnon, 1950). Quatro meses após o plantio, 25 mudas foram padronizadas quanto ao tamanho, número de folhas e submetidas ao glifosato.

As mudas (n = 5) foram expostas a diferentes doses de um herbicida à base de glifosato sendo o controle, sem aplicação do herbicida, e três doses crescentes que correspondem a 180, 360, 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹. A maior dose corresponde a 100% da dose utilizada convencionalmente no controle de plantas daninhas em campo. As demais doses correspondem respectivamente a 0, 12.5, 25 e 50% da dose de campo. Foi utilizado o produto comercial Roundup Original Mais (480 g/L de equivalente ácido de N- (phosfometil-glicina)). A aplicação foi feita uma única vez, durante o período da manhã e direcionada à porção aérea das plantas em estágio vegetativo a uma distância de 50 cm do topo das mudas. A pulverização foi feita com auxílio de um pulverizador costal (Herbicat, Catanduva Brasil) propelido a CO₂, acoplado a uma barra com duas pontas de pulverização (Teejet, model XR11002VP) com espaçamento de 0,5m. A aplicação foi feita a uma pressão constante de 150 kPa e volume de calda ajustado para 150 L/ha⁻¹. As mudas permaneceram em casa de vegetação por 90 dias após a aplicação, sob as mesmas condições de cultivo.

2.2 Caracterização visual

O registro fotográfico dos ápices caulinares foi feito aos 7, 45 e 90 dias após a aplicação do herbicida (DAA) com auxílio da câmera digital de um smartphone (modelo Galaxy A34 – 48 MB, Samsung Electronics). A caracterização das alterações visuais promovidas pelo glifosato foi direcionada a análise de possíveis alterações no desenvolvimento inicial de folhas jovens, gemas e botões florais de *C. regium*.

2.3 Análise anatômica, histoquímica e micromorfologia

Decorridos 90 DAA, foram coletadas amostras de botões florais e ápices caulinares ($n = 3$) para o processamento anatômico. Para o controle e dose $180 \text{ g.e.a.ha}^{-1}$ foram padronizados botões florais em estágio inicial de desenvolvimento com cerca de 0,5 cm de comprimento. Para as demais doses, foram coletadas amostras de gemas da região do ápice caulinar, com 0,5 cm. As amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada e estocadas em etanol 70% (Kraus e Arduin 1997).

Para a análise estrutural em microscopia de luz, as amostras foram desidratadas em série etílica, incluídas em historesina conforme recomendações do fabricante (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Em seguida, cortes longitudinais com $7 \mu\text{m}$ de espessura foram realizados em micrótomo rotativo automático (Leica RM 2255, Leica Microsystems, Deerfield, USA) e depositados em lâminas de vidro. Parte das lâminas foi corada com azul de toluidina (O'Brien e McCully, 1964) e montada com Permount (Fisher Scientific) para a caracterização anatômica. A outra parte das lâminas foram submetidas à solução de cloreto férrico (Johansen, 1940) para detecção de compostos fenólicos não estruturais e solução de corifosfina sob luz UV (Weis et al., 1988) para detecção de pectinas. A análise de cristais foi feita em lâminas sob luz polarizada. O registro fotográfico foi feito em fotomicroscópio (AX70RF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o software Axio Vision Release 4.8.1 (Carl Zeiss Vision, Alemanha), localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Para a caracterização micromorfológica as amostras de botões florais e ápices caulinares foram desidratadas em série etílica e submetidas a secagem com CO_2 líquido em um secador de ponto crítico (CPD 030, 15 Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Em seguida, as amostras foram fixadas em *stubs* de metal e revestidas com ouro em um metalizador (FDU 010, Balzers, Liechtenstein). A análise e o registro fotográfico foram realizados em um microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra), localizado no Núcleo de Microscopia e Microanálises da UFV.

3. Resultados

3.1 Alterações visuais

Visualmente 7 DAA, as plantas do controle (Fig. 2 A) apresentaram gemas apicais com aspecto saudável e com folhas jovens em desenvolvimento. Nas doses de 180 e $360 \text{ g.e.a.ha}^{-1}$ as folhas jovens apresentaram aspecto clorótico e redução no desenvolvimento (Fig. 2 B e C).

Nas doses 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ ocorreram cloroses, necroses e redução do desenvolvimento de folhas jovens além da necrose e senescência do ápice caulinar (Fig. 2 D e E).

Decorridos 45 DAA, as plantas do controle apresentavam o eixo da inflorescência já diferenciado, com nós e entrenós bem definidos, estípulas alongadas e botões florais em desenvolvimento (Fig. 2 F). Nas doses de 180 e 360 g.e.a.ha⁻¹ as mudas apresentaram cloroses, necroses em folhas jovens e estavam em início da formação das gemas florais. As gemas apresentaram um aspecto congesto e com estípulas senescentes (Fig. 2 G e H). Nas doses de 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ ocorreu senescência do ápice caulinar e necrose das folhas jovens (Fig. 2 I e J).

Ao final do experimento, 90 DAA, as mudas do controle estavam em fase de antese e pré-antese (Fig. 3 A). Na fase de pré-antese os botões florais adquiriram coloração que varia do vermelho/ arroxeada (Fig. 3 A). Os botões florais em estágios iniciais de desenvolvimento, anterior à pré-antese, apresentam coloração verde clara, tricomas abundantes no eixo da inflorescência e sépalas (Fig. 3 B). Na base do pedicelo de cada botão floral foram observadas estípulas com coloração que varia do verde ao avermelhado e folhas jovens em início de desenvolvimento (Fig. 3 B). Além disso, nessa fase o eixo da inflorescência apresentou os nós e entrenós bem evidentes. Na dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 3 C), os botões florais apresentaram redução visual do tamanho, coloração verde escuro / avermelhado. As estípulas eram mais curtas, com alteração no formato e a maioria apresentou aspecto senescente. O eixo da inflorescência era congesto em comparação com o controle e os entrenós eram pouco visíveis. Na dose de 360 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 3 D), as gemas florais não diferenciaram botões florais na maioria das plantas. As gemas florais eram congestas, os primórdios foliares não se desenvolveram na região apical, e os entrenós não estavam bem definidos. As estípulas eram curtas, todas apresentaram aspecto senescente e muitas vezes estavam ausentes. Na dose de 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 3 E) não ocorreu diferenciação de gemas florais. A porção terminal do caule apresentou inúmeras gemas congestas, com aspecto clorótico, estípulas senescentes, sem a delimitação de nós e entrenós. Na dose de 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 3 F) o ápice caulinar estava completamente senescente, com aspecto necrótico.

3.2 Alterações em microscopia eletrônica de varredura

Em microscopia eletrônica de varredura os botões florais de plantas do controle, 90 DAA (Fig. 4 A) não apresentam nenhum tipo de dano. A superfície das sépalas possui tricomas tectores e glandulares (Fig. 4 B e C). A borda das sépalas possui vários tricomas tectores

aderidos uns aos outros deixando um pequeno espaço entre as sépalas adjacentes (Fig. 4 B e C). Estômatos na superfície das sépalas e pétalas apresentam cristas bem evidentes (Fig. 4 D). As estípulas apresentam numerosos tricomas tectores e glandulares (Fig. 4 E).

Na dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 4 F), os botões florais apresentaram aspecto similar ao controle porém pedicelo mais alongado. Os tricomas das sépalas, visualmente, apresentaram menor densidade e eram mais curtos, deixando um maior espaço entre as sépalas adjacentes (Fig. 4 G e H). Os estômatos apresentam cristas com danos (Fig. 4 I) e as estípulas apresentam visualmente menor densidade e tamanho de tricomas (Fig. 4 J).

Na dose de 360 g.e.a.ha⁻¹, as gemas florais apresentam primórdios foliares e folhas jovens pouco desenvolvidos, abscisão das estípulas, redução visual no comprimento e densidade de tricomas (Fig. 4 K e L). Além disso, tricomas tectores e glandulares apresentam aspecto colapsado (Fig. 4 M).

Na dose de 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 3 N) ocorreram múltiplas gemas com porção meristemática reduzida, redução no comprimento e densidade de tricomas além de verticilos pouco desenvolvidos. Ocorrem fissuras epidérmicas na região da base que se estenderam para próximo da região meristemática (Fig. 4 N e O). A estípulas eram curtas e apresentam tricomas colapsados, além de células epidérmicas com aspecto flácido e com rupturas (Fig. 4 P).

3.3 Alterações anatômicas em microscopia de luz

Estruturalmente, em microscopia de luz, as plantas do controle (Fig. 5 A) apresentam botão floral com os verticilos vegetativos (sépalas e pétalas) sobrepostos de maneira justaposta e bem organizados. Na região do receptáculo e pedicelo ocorrem idioblastos secretores de mucilagem que, nos estágios finais de diferenciação podem coalescer, formando estruturas alongadas longitudinalmente (Fig. 5A). Nessa região ocorreram também laticíferos com aspecto alongado (Fig. 5 A). Na região central do botão floral, ocorreram primórdios estaminais em início do alongamento dos estiletos e primórdio do carpelo em início da diferenciação do ovário e alongamento do estigma (Fig. 5B). As pétalas apresentam epiderme com compostos fenólicos, mesófilo em processo avançado de diferenciação, com presença de laticífero e feixes vasculares diferenciados (Fig. 5 C). A epiderme da sépala possui tricomas tectores e glandulares abundantes (Fig. 5 D e E). A estípula é alongada e com aspecto delgado (Fig. 5 F).

Na dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 5G), os botões florais eram visualmente menores e apresentaram aspecto arredondado em comparação ao controle (Fig. 5G). Os verticilos vegetativos eram curtos e sobrepostos de maneira desorganizada (Fig. 5 H). Os primórdios dos

verticilos reprodutivos são mais curtos e menos desenvolvidos em relação ao controle (Fig. 5 H). As pétalas estão em estágio inicial de diferenciação, com células justapostas e de aspecto meristemático (Fig. 5I). A epiderme da sépala apresentou tricomas com aspecto colapsado (Fig. 5 J). As estípulas apresentam uma zona de abscisão em início da diferenciação (Fig. 5 L).

Na dose de 360 g.e.a.ha⁻¹, as gemas apresentaram a porção meristemática curta e folhas não desenvolvidas, próximas ao meristema (Fig. 5 M e N). Na porção abaixo do meristema ocorreram inúmeros idioblastos secretores de mucilagem com grande extensão e acúmulo de conteúdo (Fig. 5 N). Visualmente ocorreu menor densidade de tricomas na região epidérmica e aumento visual de drusas na base das gemas (Fig. 5 O). Os tricomas glandulares apresentaram, visualmente, redução no tamanho e retração do protoplasto nas células da cabeça secretora (Fig. 5 P). As estípulas apresentaram área de abscisão bem delimitada e estípulas senescentes (Fig. 5 Q).

Na dose de 720 g.e.a.ha⁻¹, as gemas apresentaram a região meristemática reduzida, sem o desenvolvimento de primórdios foliares (Fig. 5 R). Os idioblastos e laticíferos apresentaram aspecto tendendo ao formato isodiamétrico, foram mais numerosos e localizados próximos à região meristemática (Fig. 5 R e S). Ocorreu redução da densidade de tricomas na região epidérmica e acúmulo de compostos fenólicos, além de ruptura da epiderme na região da base da gema (Fig. 5 T). Os tricomas glandulares apresentaram redução no tamanho, retração do protoplasto e colapso de células da cabeça secretora (Fig. 5 U). As estípulas foram mais curtas, com aspecto senescente e colapso celular (Fig. 5 V).

3.4 Alterações histoquímicas

O teste com corifosfina para detecção de pectinas evidenciou a natureza mucilagínosa dos idioblastos secretores (Fig. 6 A). Por auto fluorescência, sob luz UV, os laticíferos apresentaram coloração verde/azulada brilhante (Fig. 6 A). Os idioblastos secretores de mucilagem e laticíferos foram predominantemente alongados nas plantas do controle e na dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 6 A e D) em comparação às doses de 360 e 720 g.e.a.ha⁻¹, onde apresentam, visualmente, maior densidade e formato tendendo ao isodiamétrico (Fig. 6 G e J). O teste com cloreto férrico evidenciou o aumento visual no acúmulo de compostos fenólicos não estruturais nas plantas tratadas com glifosato (Fig. 6 E, H e K) em comparação com o controle (Fig. 6 B). Sob luz polarizada observou-se o aumento na densidade de cristais nas plantas tratadas com herbicida (Fig. 6 F, I e L) em comparação com o controle (Fig. 6C), sendo o maior aumento visual nas doses de 360 e 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 6 I e L).

4. Discussão

As mudas de *C. regium* expostas ao glifosato apresentaram alterações na floração e desenvolvimento inicial de botões e gemas florais, mesmo nas menores doses do herbicida, confirmando nossas hipóteses iniciais. O glifosato promoveu danos e alterações morfológicas nos ápices caulinares, resultando, a longo prazo, em atraso no desenvolvimento de botões florais, inibição do desenvolvimento de gemas florais, além de danos micromorfológicos e estruturais. Os impactos negativos do glifosato sobre a floração de plantas não alvo foram relatados anteriormente em outras espécies vegetais (Boutin et al., 2014; Olszyk et al., 2017; Dupont et al., 2018; Carpenter et al., 2020; Strandberg et al., 2021; Golt et al., 2021; Olszyk et al., 2024). Nosso estudo, entretanto, é o primeiro a descrever os impactos morfoanatômicos do glifosato na floração e desenvolvimento de gemas florais em uma espécie tropical perene nativa do Cerrado.

O surgimento precoce de danos visuais em folhas jovens e ápices caulinares de *C. regium* exposta ao glifosato, está associado ao mecanismo de translocação do herbicida. Após a absorção, o herbicida é translocado pelo floema, até regiões metabolicamente ativas como ápices meristemáticos, folhas e flores em desenvolvimento e, mesmo a curto prazo, pode promover danos nessas regiões (Freitas-Silva et al., 2022). As alterações no desenvolvimento de folhas jovens, acompanhadas de clorose e necrose, observadas em nosso estudo, são os primeiros sintomas de toxicidade do glifosato e foram descritos em estudos anteriores com outras espécies nativas não alvo (Cruz et al., 2021; Araújo et al., 2024). Estes danos foram relacionados com as alterações promovidas pelo herbicida no metabolismo, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (Gomes et al., 2017; Araújo et al., 2025). Curiosamente, alterações visuais nos ápices caulinares e folhas jovens também foram reportadas em espécies do Cerrado descritas como potencialmente tolerantes, expostas às maiores doses de glifosato (Abreu et al., 2022; Faria et al., 2024; Faria et al., 2022).

Somente as plantas do controle chegaram a fase de pré-antese e antese durante o período de avaliação, evidenciando atraso na floração em plantas expostas ao glifosato. De modo semelhante, Dupont et al. (2018) relataram redução na densidade floral e atraso na floração de plantas não alvo mesmo quando as plantas foram expostas dois meses antes do período de floração. Outros estudos também demonstraram que plantas não alvo podem ter o período de floração alterado pela aplicação de herbicidas, mesmo em baixas doses (Golt e Wood, 2021; Strandberg et al., 2021; Olszyk et al., 2024). Em nosso estudo, demonstramos que o glifosato promove alterações no desenvolvimento de gemas e botões florais a longo prazo, mesmo na

menor dose aplicada 90 DAA. A pulverização do herbicida ocorreu no estágio vegetativo de *C. regium*, cerca de 45 dias antes do início do desenvolvimento floral. O glifosato pode permanecer nos tecidos das plantas por uma década ou mais, após a exposição (Botten et al., 2021). Espécies de plantas perenes (ciclo de vida longo) que perdem as folhas em algum período do ano podem acumular o herbicida em sistemas subterrâneos e posteriormente, no período de rebrota, este composto ainda pode ser detectado em brotações novas (Botten et al., 2021) e tecidos reprodutivos (Golt et al., 2021). De modo semelhante, *C. regium* possui órgãos subterrâneos de reserva e a floração ocorre após a senescência das folhas, no início da fase reprodutiva (Camillo et al., 2018; Silva et al., 2020). Desse modo, as alterações nas gemas e botões florais podem ser danos indiretos dos resíduos de glifosato acumulados no sistema subterrâneo. Futuras investigações com quantificação química de glifosato no sistema subterrâneo de reserva podem averiguar essa hipótese.

Na menor dose, ocorreu a redução do alongamento do eixo da inflorescência, alterações morfoanatômicas nos botões florais, incluindo alterações no tamanho e menor desenvolvimento dos primórdios dos verticilos estéreis e reprodutivos. O glifosato promove alterações multidimensionais no metabolismo vegetal, envolvendo alterações na alocação de recursos, redução da atividade fotossintética, estresse oxidativo e desbalanços hormonais em plantas sensíveis (Araújo et al., 2025; Fuchs et al., 2021, 2022). O glifosato inibe a produção de triptofano, um precursor na biossíntese das auxinas que tem um importante papel na regulação do desenvolvimento floral e no alongamento celular (Gomes et al., 2017; Freitas-Silva et al., 2022). As alterações nos botões florais e a redução no desenvolvimento dos primórdios dos verticilos estéreis e reprodutivos em *C. regium*, podem estar associadas com possíveis alterações nos níveis de auxinas. As auxinas estão relacionadas com a atividade de diversos genes envolvidos com o crescimento e desenvolvimento dos verticilos estéreis e reprodutivos, além de ser um importante sinalizador para a diferenciação dos meristemas florais (Cucinotta et al., 2021). Mesmo em doses baixas, o desbalanço hormonal promovido pelo glifosato pode promover alterações na morfologia das pétalas, reduzir a viabilidade dos grãos de pólen e inibir total ou parcialmente a deiscência de anteras em plantas expostas ao herbicida, como demonstrado em *Rosa acicularis* (Golt et al., 2021) e *Gossypium barbadense* (Qin et al., 2023). Apesar dos efeitos bem documentados na produção de auxinas, outros hormônios vegetais podem ser alterados indiretamente pela exposição ao glifosato (Fuchs et al., 2022). Dessa forma, futuras investigações sobre os impactos do glifosato no balanço hormonal na fase reprodutiva podem ajudar a compreender melhor os impactos no desenvolvimento floral de *C. regium*.

A redução visual da densidade e comprimento dos tricomas tectores nas sépalas e ápices caulinares nas plantas expostas ao glifosato pode ser um efeito indireto do herbicida. A regulação da densidade e do desenvolvimento de tricomas é um processo complexo, que envolve a ação coordenada de fatores de transcrição mediados por diferentes hormônios, incluindo as auxinas (Li et al., 2021; Yasin et al., 2025). Além disso, foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* que a floração e o desenvolvimento de tricomas compartilham hormônios e fatores de transcrição relacionados (Matías-Hernández et al., 2016). A redução na densidade e comprimento dos tricomas podem reduzir o nível de proteção das estruturas reprodutivas internas nos botões florais e dos meristemas nos ápices caulinares. Os tricomas nas sépalas de *C. regium*, nos estágios iniciais de desenvolvimento do botão floral, podem desempenhar papel de proteção dos verticilos florais em desenvolvimento contra ataques de herbívoros e estresses abióticos como, altas temperaturas e intensa radiação solar (Kaur e Kariyat, 2020). Além disso, a alteração no formato dos botões e a separação precoce entre as sépalas nas plantas expostas ao glifosato, pode estar relacionada com a redução dos tricomas. Tan et al., (2016) demonstram que os tricomas tectores nas flores de *Gossypium hirsutum* são responsáveis por evitar a antese precoce e atuam na manutenção do formato dos botões.

A inibição do desenvolvimento de gemas florais e o surgimento de gemas múltiplas nas doses intermediárias de glifosato (360 e 720 g.e.a.ha⁻¹) também podem estar relacionadas à interferência do herbicida no balanço hormonal. A auxina exerce um papel fundamental no processo de iniciação e diferenciação do meristema floral, sendo um hormônio-chave durante a morfogênese floral em plantas (Cucinotta et al., 2021). O desenvolvimento de gemas múltiplas e a perda da dominância apical observados em *C. regium* são respostas comuns, a longo prazo, em plantas expostas ao glifosato (Martinelli et al., 2022; Araújo et al., 2024), e estão associadas a alterações no balanço de hormônios como auxina, etileno e giberelinas (Doğramacı et al., 2015; Wang et al., 2020). Além disso, o glifosato promoveu a redução no desenvolvimento dos meristemas e a redução do estoque de células meristemáticas nos ápices caulinares de *C. regium* nas maiores doses. Os meristemas são especialmente sensíveis às alterações metabólicas e aos danos oxidativos causados por estressores ambientais, os quais podem comprometer o processo de diferenciação celular e a viabilidade celular (Zhang et al., 2023).

Nas maiores doses de glifosato em *C. regium*, ocorreram danos e alterações anatômicas nos ápices caulinares, incluindo colapso de células e surgimento de áreas necróticas. Na maior dose (1440 g.e.a.ha⁻¹) ocorreu a completa senescência do ápice caulinar. Esses danos são semelhantes aos descritos em folhas de espécies nativas não alvo expostas ao glifosato (Cruz et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2022; Araújo et al., 2024). Tais alterações são frequentemente

associadas a distúrbios metabólicos induzidos pelo herbicida, como estresse oxidativo e peroxidação lipídica, que comprometem a integridade celular e levam, a longo prazo, a morte das plantas sensíveis (Gomes et al., 2017; Freitas-Silva et al., 2022; Araújo et al., 2024). Também ocorreu o aumento no acúmulo de compostos fenólicos e drusas em plantas de *C. regium* expostas ao glifosato. Os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes não enzimáticos em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo herbicida (Parvin et al., 2022; Araújo et al., 2025). No entanto, nas doses mais elevadas, esse acúmulo pode estar associado a processos de senescência e morte celular (Tyagi et al., 2020). De modo semelhante, o aumento na formação de drusas é comum em plantas submetidas a diferentes tipos de estresses abióticos e pode estar relacionado a mecanismos de defesa induzidos e regulação do metabolismo vegetal (Paiva et al., 2019; He et al., 2024). Além disso, o aumento de drusas pode estar relacionado com o maior estoque de cálcio em áreas metabolicamente susceptíveis, como regiões meristemáticas, de modo a garantir a homeostase nessas regiões.

As estípulas de *C. regium* são altamente responsivas ao glifosato, apresentando alterações morfológicas e senescência precoce a partir da menor dose e em todos os períodos de avaliação. A senescência está associada à formação de zona de abscisão precoce, além de danos em tricomas e estômatos, marcadores típicos da fitotoxicidade do glifosato e de alterações no metabolismo vegetal (Freitas-Silva et al., 2020; Cruz et al., 2021; Araújo et al., 2024). As estípulas são estruturas amplamente distribuídas em várias famílias de Angiospermas e estão associadas com a proteção de folhas jovens e brotos (Ye et al., 2024). Em *C. regium*, a presença de compostos fenólicos, tricomas tectores e glandulares, além de laticíferos, reforça o papel defensivo dessas estruturas contra o ataque de herbívoros, patógenos e na manutenção de um microclima favorável na região dos meristemas e botões florais em desenvolvimento. Durante a floração, *C. regium* perde as folhas e os ápices caulinares e botões florais ficam completamente expostos (Silva et al., 2020). Desse modo, a senescência precoce das estípulas em plantas expostas ao glifosato pode tornar os meristemas e botões florais de *C. regium* mais vulneráveis.

As alterações visuais na morfologia e densidade dos laticíferos e idioblastos secretores de mucilagem podem ser um efeito indireto do glifosato em *C. regium*. A interferência na atividade meristemática e os danos metabólicos promovidos pelo herbicida podem afetar a morfogênese dos laticíferos e idioblastos secretores, que dependem da integridade dos meristemas e da regulação mediada por fitohormônios (Johnson et al., 2021; Medina et al., 2022; Hu et al., 2024). Além disso, o desenvolvimento, a atividade secretora e a composição da secreção das estruturas secretoras em plantas podem ser influenciadas por fatores ambientais e

estresse abiótico. Pereira et al. (2025) relataram o aumento na densidade e área de canais secretores em caules e folhas jovens de *Protium heptaphyllum* em resposta ao fogo, além de alterações no perfil químico da espécie, evidenciando a plasticidade do sistema secretor. De modo semelhante ao observado em *C. regium*, Gomes et al. (2025) relataram alteração do formato dos laticíferos em folhas de *Bixa orellana* exposta ao flúor. Considerando que laticíferos e idioblastos secretores desempenham papel fundamental na defesa contra herbivoria e patógenos (Prado e Demarco, 2018), as alterações anatômicas induzidas pelo glifosato podem comprometer a funcionalidade dessas estruturas e a capacidade defensiva de *C. regium*. No entanto, essa hipótese requer investigações adicionais para avaliar as alterações na atividade secretora e composição química da secreção produzida pelos laticíferos e idioblastos secretores.

Em nosso estudo, demonstramos que o glifosato promove alterações no desenvolvimento inicial de botões florais e danos nos meristemas apicais em mudas de *C. regium* expostas ao glifosato. O atraso e a alteração no período de floração podem contribuir para mudanças no fluxo gênico com potenciais impactos ecológicos e funcionais nas comunidades vegetais (Londo et al., 2014). Especialmente no Cerrado, onde a sazonalidade climática é bem definida, a redução no período de floração pode comprometer a viabilidade reprodutiva das espécies. Apesar de *C. regium* ter um período de floração com duração de 3-4 meses, as populações geralmente ocorrem isoladas, com pequeno número de indivíduos (Camillo et al., 2018; Silva et al., 2020). Desse modo, atrasos no pico de floração podem comprometer a viabilidade da polinização cruzada e reduzir a eficiência reprodutiva da espécie. Além disso, em *C. regium*, assim como outras espécies de Cerrado, é comum observar intensa rebrota com emissão de gemas reprodutivas e floração algumas semanas após o fogo (Ott et al., 2019). Logo, nessas espécies, o desenvolvimento floral depende de recursos alocados no sistema subterrâneo. Alterações na alocação de recursos e danos nos sistemas subterrâneos induzidos pelo glifosato podem afetar o desenvolvimento floral e devem ser alvo de estudos futuros.

Além dos danos no desenvolvimento de botões e gemas florais, outros aspectos reprodutivos podem ser afetados pelo glifosato. Olszyk et al., (2024) demonstraram que o glifosato pode alterar a fenologia de espécies herbáceas nativas ao promover atraso na floração e redução na produção de sementes. Alterações visuais, redução do tamanho e massa dos frutos de *Rosa roxburghii* foram acompanhados por danos fisiológicos e alterações no desenvolvimento em plantas expostas ao glifosato (Chao et al., 2024). Além disso, alterações na morfologia das pétalas e anteras foram verificados em *Rosa acicularis* (Golt et al., 2021). Embora não tenhamos avaliado potenciais danos morfológicos nas flores, frutos e sementes de

C. regium, nosso estudo serve de base para futuras investigações abordando esses aspectos reprodutivos em plantas nativas expostas ao glifosato e outros herbicidas. Tendo em vista a grande diversidade de espécies vegetais que ocorrem próximas de áreas agrícola, é fundamental expandir essas avaliações para outras espécies nativas.

As alterações visuais marcantes em plantas expostas ao herbicida, mesmo em baixas doses, como os danos no ápice caulinar, alterações na morfologia e desenvolvimento de botões florais, senescência precoce das estípulas, inibição no desenvolvimento de gemas reprodutivas e surgimento de gemas múltiplas podem ser marcadores morfológicos de fitotoxicidade ao glifosato. Estes marcadores são especialmente úteis em monitoramento de campo, pois muitas espécies do Cerrado, assim como *C. regium*, são decíduas e perdem as folhas em determinados períodos do ano, limitando a avaliação clássica de biomarcadores morfológicos, anatômicos e metabólicos em estruturas vegetativas.

Nossos resultados demonstram que o glifosato pode interferir em estruturas associadas à proteção de gemas e botões florais, especialmente nas fases iniciais de desenvolvimento. As alterações na morfologia e desenvolvimento de estípulas, tricomas tectores e glandulares, laticíferos e idioblastos sugerem potenciais impactos na defesa vegetal, um aspecto pouco explorado em estudos com herbicidas, embora possam influenciar diretamente a resistência, a sobrevivência e o sucesso reprodutivo de espécies nativas. Além disso, os compostos bioativos e metabólitos responsáveis pelas propriedades medicinais de *C. regium*, inclusive nas flores (Menezes-Filho et al., 2020), estão associados às estruturas secretoras. Estudos futuros devem abordar mais detalhadamente aspectos relacionados com o desenvolvimento, distribuição, e atividade secretora dessas estruturas em plantas expostas a herbicidas como o glifosato.

5. Conclusão

A aplicação do herbicida glifosato promoveu alterações morfoanatômicas no desenvolvimento inicial de gemas apicais e botões florais de *C. regium*, mesmo em doses abaixo das utilizadas convencionalmente em campo, confirmando nossa hipótese inicial. Apesar da aplicação ter ocorrido no estágio vegetativo, os efeitos do glifosato se estenderam para a fase reprodutiva. Em baixas doses, o herbicida promoveu alterações morfoanatômicas e atraso no desenvolvimento de botões florais. Nas maiores doses ocorreu formação de gemas múltiplas, inibição no desenvolvimento de gemas florais e danos nos meristemas, além de alterações micromorfológicas em tricomas e estruturas secretoras. Em conjunto, essas alterações podem comprometer a reprodução de *C. regium* por meio do atraso no pico de floração, redução do

desenvolvimento e proteção de botões florais. Futuras investigações devem analisar possíveis alterações na morfologia floral, desenvolvimento de frutos e sementes ampliando o entendimento sobre o efeito do glifosato em todo o ciclo reprodutivo de *C. regium*. Estes dados reforçam a necessidade do manejo adequado de herbicidas, em especial devido ao potencial impacto na reprodução e manutenção de população de espécies nativas não alvo que ocorrem próximas de áreas agrícolas, mesmo em doses abaixo das comumente aplicadas em campo para controle de plantas daninhas.

Referências

- Abreu, K. M., Santos, D. C., Pennacchi, J. P., Calil, F. N., Moura, T. M., Alves, E. M., Oliveira, T. C., Silva, F. G., Ferreira, J. B. G., Fialho, A. R., & Souza, S. O. (2022). Differential tolerance of four tree species to glyphosate and mesotrione used in agrosilvopastoral systems. *New Forests*, 53, 831-850. <https://doi.org/10.1007/s11056-021-09889-4>.
- Albaseer, S. S., Jaspers, V. L. B., Orsini, L., Vlahos, P., Al-Hazmi, H. E., & Hollert, H. (2025). Beyond the field: How pesticide drift endangers biodiversity. *Environmental Pollution*, 366, 125526. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.125526>.
- Araújo H. H., Soares G. D. D., Dias-Pereira J., Silva L. C., & Machado V. M. (2024). Impact of saflufenacil and glyphosate-based herbicides on the morphoanatomical and development of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae): new insights into a non-target tropical tree species. *Environmental Science and Pollution Research*, 31, 61254–61269. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-35223-4>.
- Araújo, H. H., Marinato, C. S., Coelho, D. G., Oliveira, L. A., Oliveira, J. A., Clarindo, W. R., Freitas-Silva, L., & Silva, L. C. (2025). Multidimensional effects of a glyphosate-based herbicide on *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): Morphoanatomical, metabolic, and genotoxic biomarkers as indicators of damage in a non-target native tree species. *Journal of Hazardous Materials*, 492, 138038. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.138038>.
- Barroso, G. M., Santos, E. A., Pires, F. R., Galon, L., Cabral, C. M., & Santos, J. B. (2023). Phytoremediation: a green and low-cost technology to remediate herbicides in the environment. *Chemosphere*, 334, 138943. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138943>.
- Botten, N., Wood, L. J., & Werner, J. R. (2021). Glyphosate remains in forest plant tissues for a decade or more. *Forest Ecology and Management*, 493, 119259. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119259>.
- Boutin, C., & Rogers, C. A. (2000). Pattern of sensitivity of plant species to various herbicides — an analysis with two databases. *Ecotoxicology*, 9, 255–272. <https://doi.org/10.1023/A:1026518027350>.
- Boutin, C., Strandberg, B., Carpenter, D., Mathiassen, S. K., & Thomas, P. J. (2014). Herbicide impact on non-target plant reproduction: what are the toxicological and ecological implications?. *Environmental Pollution*, 185, 295-306. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.009>.

- Camillo, J., Martins, R. C., Guarim Neto, G., Gulias, A. P. S. M., Filgueiras, A. D., Costa, L. C., & Silva, D. B. (2018). *Cochlospermum regium* (Algodão-do-campo). In Vieira, R. F., Camillo, J., & Coradin, L. (Eds.), *Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – região Centro-Oeste*. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1073502>.
- Carpenter, D. J., Mathiassen, S. K., Boutin, C., Strandberg, B., Casey, C. S., & Damgaard, C. (2020). Effects of herbicides on flowering. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(6), 1244–1256. <https://doi.org/10.1002/etc.4712>.
- Colli, G. R., Vieira, C. R., & Dianese, J. C. (2020). Biodiversity and conservation of the Cerrado: recent advances and old challenges. *Biodiversity and Conservation*, 29(5), 1465–1475. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-01967-x>.
- Cruz, C. E. S., Freitas-Silva, L., Ribeiro, C., & Silva, L. C. (2021). Physiological and morphoanatomical effects of glyphosate in *Eugenia uniflora*, a Brazilian plant species native to the Atlantic Forest biome. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 21334–21346. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12003-4>.
- Cucinotta, M., Cavalleri, A., Chandler, J. W., & Colombo, L. (2021). Auxin and flower development: a blossoming field. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13, a039974. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039974>.
- Chao, Z., Yun, L., Yumei, F., Lina, G., Kai, Y., & Yue, L. (2024). Evaluating the effect of glyphosate on the growth and photosynthetic characteristics of *Rosa roxburghii* seedlings on Yunnan Guizhou Plateau. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 53(5), 1773–1791. <https://doi.org/10.1080/01140671.2024.2409776>.
- Doğramacı, M., Foley, M. E., Horvath, D. P., Hernandez, A. G., Khetani, R. S., Fields, C. J., Keating, K. M., Mikel, M. A., & Anderson, J. V. (2015). Glyphosate's impact on vegetative growth in leafy spurge identifies molecular processes and hormone cross-talk associated with increased branching. *BMC genomics*, 16, 395. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1627-9>.
- Dupont, Y. L., Strandberg, B., & Damgaard C. (2018). Effects of herbicide and nitrogen fertilizer on non-target plant reproduction and indirect effects on pollination in *Tanacetum vulgare* (Asteraceae). *Agriculture Ecosystems & Environment*, 262, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.04.014>.
- Faria, G. S., Carlos, L., Vasconcelos-Filho, S. C., Freitas, S. T. F., Lourenço, L. L., Sousa, A. C. D., Bessa, L. A., & Vitorino, L. C. (2024). Tolerance of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne. to glyphosate. *Brazilian Journal of Biology*, 84, e279984. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.279984>.
- Faria, G. S., Carlos, L., Jakelaitis, A., Filho, S. C. V, Lourenço, L. L., Costa, A. M., & Gonçalves, I. A. (2022). Tolerance of *Hymenaea courbaril* L. to glyphosate. *Ecotoxicology*, 31, 168–177. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02499-y>.
- Ferri, M. G. (1971). Modificação do hábito floral de *Cochlospermum regium* (Mart.) Pilger. In *III Simpósio sobre o cerrado* (pp. 164-166). Editora Edgard Blücher Ltda/ Editora da Universidade de São Paulo - Edusp.

Freitas-Silva, L., Araújo, H. H., Meireles, C. S., & Silva, L.C. (2022). Plant exposure to glyphosate-based herbicides and how this might alter plant physiological and structural processes. *Botany*, 100(6), 473-480. <https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0033>.

Freitas-Silva, L., Araújo, T. O., Nunes-Nesi, A., Ribeiro, C., Costa, A. C., & Silva, L. C. (2020). Evaluation of morphological and metabolic responses to glyphosate exposure in two neotropical plant species. *Ecological Indicators*, 113, 106246. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106246>.

Fuchs, B., Laihonon, M., Muola, A., Saikkonen, K., Dobrev, P. I., Vankova, R., & Helander, M. (2022). A Glyphosate-Based Herbicide in Soil Differentially Affects Hormonal Homeostasis and Performance of Non-target Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 787958. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.787958>.

Fuchs, B., Saikkonen, K., & Helander, M. (2021). Glyphosate-modulated biosynthesis driving plant defense and species interactions. *Trends in plant science*, 26(4), 312-323. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.11.004>.

Golt, A. R., & Wood, L. J. (2021). Glyphosate-based herbicides alter the reproductive morphology of *Rosa acicularis* (Prickly Rose). *Frontiers in Plant Science*, 12, 698202. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.698202>.

Gomes, M. P., Le Manac'h, S. G., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lucotte, M., & Juneau, P. (2017). Glyphosate-dependent inhibition of photosynthesis in willow. *Frontiers in Plant Science*, 8, 207. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00207>.

Gomes, T. F., Rezende, F. P., Lima, A. M., Souza, G. A., Miranda, J. D. B., Barbosa, A. P., & Silva, L. C. (2025). Morphoanatomical and metabolic changes in *Bixa orellana* L. (Bixaceae) exposed to atmospheric fluorine. *Environmental Science and Pollution Research*, 32, 9541–9554. <https://doi.org/10.1007/s11356-025-36293-8>.

He, H., Li, D., Li, X., & Fu, L. (2024). Research progress on the formation, function, and impact of calcium oxalate crystals in plants. *Crystallography Reviews*, 30(1), 31-60. <https://doi.org/10.1080/0889311X.2024.2309486>.

Hoagland D. R., & Arnon D. I. (1950). The waterculture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, 347(2), 32.

Hu, B., Yang, N., Zhou, Z., Shi, X., Qin, Y., Fang, Y., & Long, X. (2024). Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms of rubber biosynthesis and laticifer differentiation during rubber seed germination. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1337451. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1337451>.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (2023). *Relatórios de comercialização de agrotóxicos*. Ministério do Meio Ambiente e do Clima. <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 20 fev. 2025.

Johansen, D. A. (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill.

Johnson, A. R., Moghe, G. D., & Frank, M. H. (2021). Growing a glue factory: open questions in laticifer development. *Current Opinion in Plant Biology*, 64, 102096. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102096>.

- Kaur, J., & Kariyat, R. (2020). Role of Trichomes in Plant Stress Biology. In Núñez-Farfán, J., Valverde, P. (Eds.), *Evolutionary Ecology of Plant-Herbivore Interaction* (pp. 15–35). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46012-9_2.
- Kraus, J. E., & Arduin, M. (1997). *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR.
- Li, J., Wang, X., Jiang, R., Dong, B., Fang, S., Li, Q., Lv, Z., & Chen, W. (2021). Phytohormone-based regulation of trichome development. *Frontiers in Plant Science*, 12, 734776. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.734776>.
- Londo, J. P., McKinney, J., Schwartz, M., Bollman, M., Sagers, C., & Watrud, L. (2014). Sub-lethal glyphosate exposure alters flowering and phenology and causes transient male-sterility in *Brassica* spp. *BMC Plant Biology*, 14, 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-70>.
- MapBiomás. (2024). *Mapeamento Anual de Cobertura e Uso da Terra no Brasil - Coleção 9*. https://brasil.mapbiomas.org/wp-content/uploads/sites/4/2024/12/Factsheet-Agricultura_C9_05.12_v2.pdf. Acesso em: 16 jul. 2025.
- Martinelli, R., Rufino, L. R., Jr., Melo, A. C., La Cruz, R. A., Silva, M. F. G. F., Silva, J. R., Boaretto, R. M., Monquero, P. A., Mattos, D., Jr., & Azevedo, F. A. (2022). Glyphosate excessive use chronically disrupts the shikimate pathway and can affect photosynthesis and yield in citrus trees. *Chemosphere*, 308, 136468. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136468>.
- Matías-Hernández, L., Aguilar-Jaramillo, A. E., Cigliano, R. A., Sanseverino, W., & Pelaz, S. (2016). Flowering and trichome development share hormonal and transcription factor regulation. *Journal of Experimental Botany*, 67(5), 1209-1219. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv534>.
- Medina, M. C., Sousa-Baena, M. S., Van Sluys, M. A., & Demarco, D. (2022). Laticifer growth pattern is guided by cytoskeleton organization. *Frontiers in Plant Science*, 13, 971235. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.971235>.
- Mendes, K. F., Sousa, R. N., Lima, A. C., & Godoi, M. A., Jr. (2023). Understanding the Environmental Behavior of Herbicides: A Systematic Review of Practical Insights. In Mendes, K. F. (Ed.), *Pesticides - Agronomic Application and Environmental Impact*. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1002280>.
- Menezes-Filho, A. C. P., Santos, M. C., & Castro, C. F. S. (2020). Estudo fitoquímico, bioativo, fotoprotetor e físico-químico do extrato floral do algodãozinho do Cerrado [*Cochlospermum regium* Schrank. (Pilg.)] – Bixaceae. *Revista Arquivos Científicos*, 3(2), 59-71. <http://dx.doi.org/10.5935/2595-4407/rac.immes.v3n2p59-71>.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>.
- O'Brien, T. P., Feder, N., & McCully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59, 368–373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>.
- Olszyk, D., Pflieger, T., Shiroyama, T., Blakeley-Smith, M., Lee, E. H., Nash, M. S., & Plocher, M. (2024). Simulated herbicide drift alters native plant flowering phenology. *Ecotoxicology*, 33, 1009–1025. <https://doi.org/10.1007/s10646-024-02795-3>.

- Olszyk, D., Pflieger, T., Shiroyama, T., Blakeley-Smith, M., Lee, E. H., & Plocher, M. (2017). Plant reproduction is altered by simulated herbicide drift to constructed plant communities. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(10), 2799–2813. <https://doi.org/10.1002/etc.3839>.
- Ott, J. P., Klimešová, J., & Hartnett, D. C. (2019). The ecology and significance of below-ground bud banks in plants. *Annals of Botany*, 123(7), 1099–1118. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz051>.
- Paiva, E. A. S. (2019). Are calcium oxalate crystals a dynamic calcium store in plants?. *New Phytologist*, 223(4), 1707–1711. <https://doi.org/10.1111/nph.15912>.
- Parvin, K., Nahar, K., Mohsin, S.M., Al Mahmud, J., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2022). Plant Phenolic Compounds for Abiotic Stress Tolerance. In Hasanuzzaman, M., Ahammed, G.J., Nahar, K. (Eds.), *Managing Plant Production Under Changing Environment* (pp. 193–237). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5059-8_8.
- Pereira, T. C., Martins, A. R., Oliveira, A. S. S., Sartoratto, A., & Rodrigues, T. M. (2025). Postfire Alterations of the Resin Secretory System in *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Forests*, 16(6), 923. <https://doi.org/10.3390/f16060923>.
- Prado, E., & Demarco, D. (2018). Laticifers and secretory ducts: similarities and differences. In Hufnagel, L. (Ed.), *Ecosystem Services and Global Ecology* (pp. 103–123). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75705>.
- Qin, G., Zhao, N., Wang, W., Wang, M., Zhu, J., Yang, J., Lin, F., Huang, X., Zhang, Y., Min, L., Chen, G., & Kong, J. (2023). Glyphosate-Induced Abscissic Acid Accumulation Causes Male Sterility in Sea Island Cotton. *Plants*, 12(5), 1058. <https://doi.org/10.3390/plants12051058>.
- Rezende-Silva, S. L., Costa, A. C., Dyszy, F. H., Batista, P. F., Crispim-Filho, A. J., Nascimento, K. J. T., & Silva, A. A. (2019). *Pouteria torta* is a remarkable native plant for biomonitoring the glyphosate effects on Cerrado vegetation. *Ecological indicators*, 102, 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.03.003>.
- Rodrigues, L. N. (Ed.). (2024). *Agricultura irrigada no Cerrado: subsídios para o desenvolvimento sustentável* (2nd ed.). Embrapa. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1165534>.
- Santana, N. C., Rodrigues, L. N. (2023). O Bioma cerrado. In Rodrigues, R. N. (Ed.), *Agricultura irrigada no cerrado: subsídios para o desenvolvimento sustentável* (pp. 42–65). Embrapa. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1165534>.
- Santos, G. A. N., Filho, C. S., Schimpl, F. C., Souza, S. C. R., Junior, A. R. N., Garcia, R. P. O., & Silva, J. F. (2023). Metabolism of guarana (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis*) plants and fruit production subjected to glyphosate doses. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 58(1), 69–79. <https://doi.org/10.1080/03601234.2023.2172275>.
- Silva, D. B., Vieira, R. F., Camilo, J., Melo, L. A. M. P., Costa, L. C., & Alves, R. B. N. (2020). *Cultivo de algodãozinho [Cochlospermum regium (Schrank) Pilg. - Bixaceae], no Distrito Federal – avaliação preliminar*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1124921>.

Sindiveg - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. (2024). *Levantamento dos principais números do setor de defensivos agrícolas no Brasil*. <https://sindiveg.org.br/mercado-total/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

Strandberg, B., Sørensen, P. B., Bruus, M., Bossi, R., Dupont, Y. L., Link, M., & Damgaard, C. F. (2021). Effects of glyphosate spray-drift on plant flowering. *Environmental Pollution*, 280, 116953. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116953>.

Tan, J., Walford, S. -A., Dennis, E. S., & Llewellyn, D. (2016). Trichomes control flower bud shape by linking together young petals. *Nature Plants*, 2, 16093. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.93>.

Tyagi, K., Shukla, P., Rohela, G. K., Shabnam, A. A., & Gautam, R. (2020). Plant phenolics: their biosynthesis, regulation, evolutionary significance, and role in senescence. In Lone, R., Shuab, R., Kamili, A. (Eds.), *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture: Volume 1* (pp. 431-449). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_18.

Wang, J., Su, Y., Kong, X., Ding, Z., & Zhang, X. S. (2020). Initiation and maintenance of plant stem cells in root and shoot apical meristems. *Abiotech*, 1, 194-204. <https://doi.org/10.1007/s42994-020-00020-3>.

Weis, K. G., Polito, V. S., & Labavitch, J. M. (1988). Microfluorometry of pectic materials in the dehiscence zone of almond (*Prunus dulcis* [Mill.] DA Webb) fruits. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 36(8), 1037-1041. <https://doi.org/10.1177/36.8.3392393>.

Yasin, M. U., Liu, Y., Wu, M., Chen, N., & Gan, Y. (2025). Regulatory mechanisms of trichome and root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 115, 14. <https://doi.org/10.1007/s11103-024-01534-w>.

Ye, T., & Ronse De Craene, L. (2024). Stipules in angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 205(3), 191-242. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boad076>.

Zhang, H., Mu, Y., Zhang, H., & Yu, C. (2023). Maintenance of stem cell activity in plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1302046. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1302046>.

Figuras

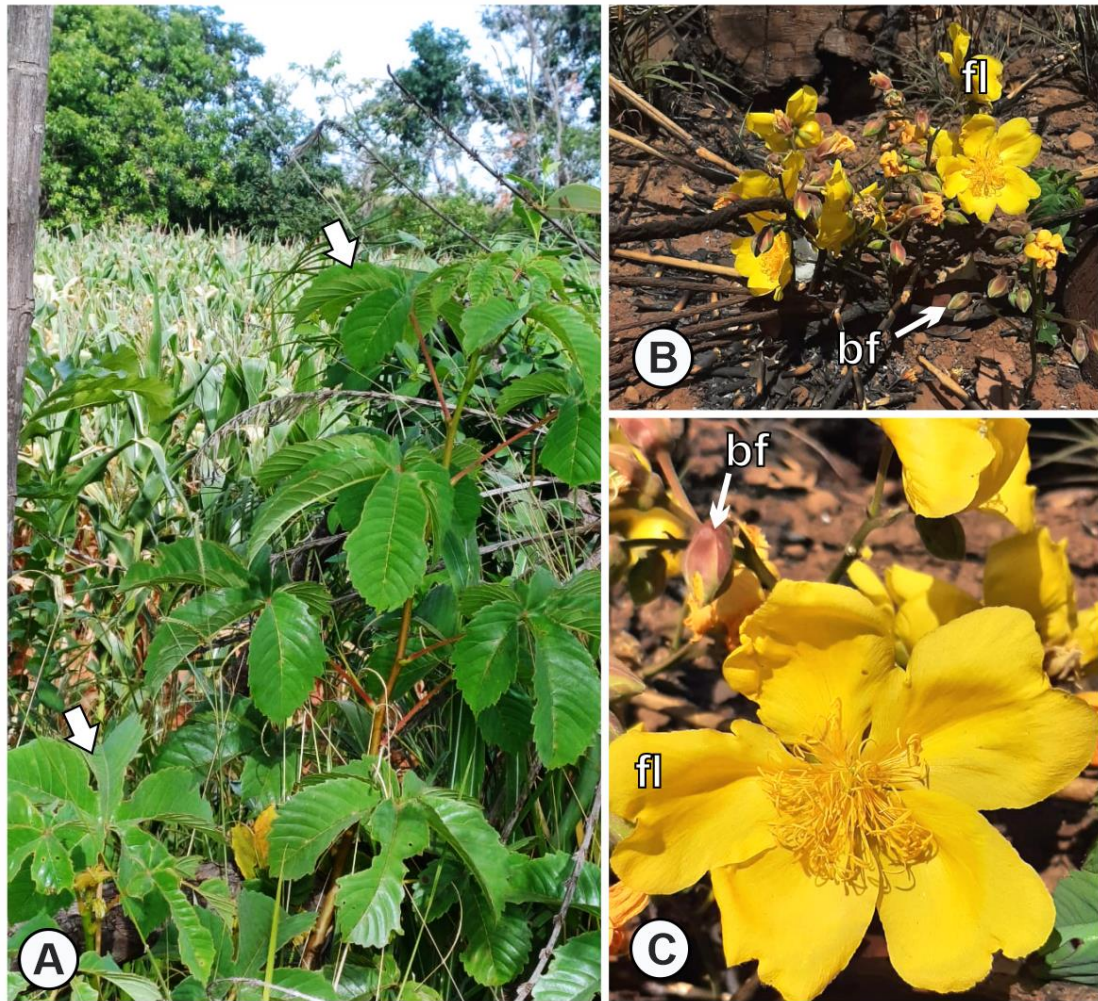


Figura 1 – Visão geral da morfologia de *Cochlospermum regium* durante a fase vegetativa (A), e na fase de floração (B e C) em campo. A - Indivíduo em estágio vegetativo, durante a estação chuvosa. Note ao fundo uma lavoura de milho. B - Rebrota e emissão de inflorescências durante a estação seca algumas semanas após queimada na região. C - Detalhe da flor em antese e botão floral em pré-antese. Abreviações: bf - botão floral, fl - flores, seta branca – indivíduo de *C. regium*.

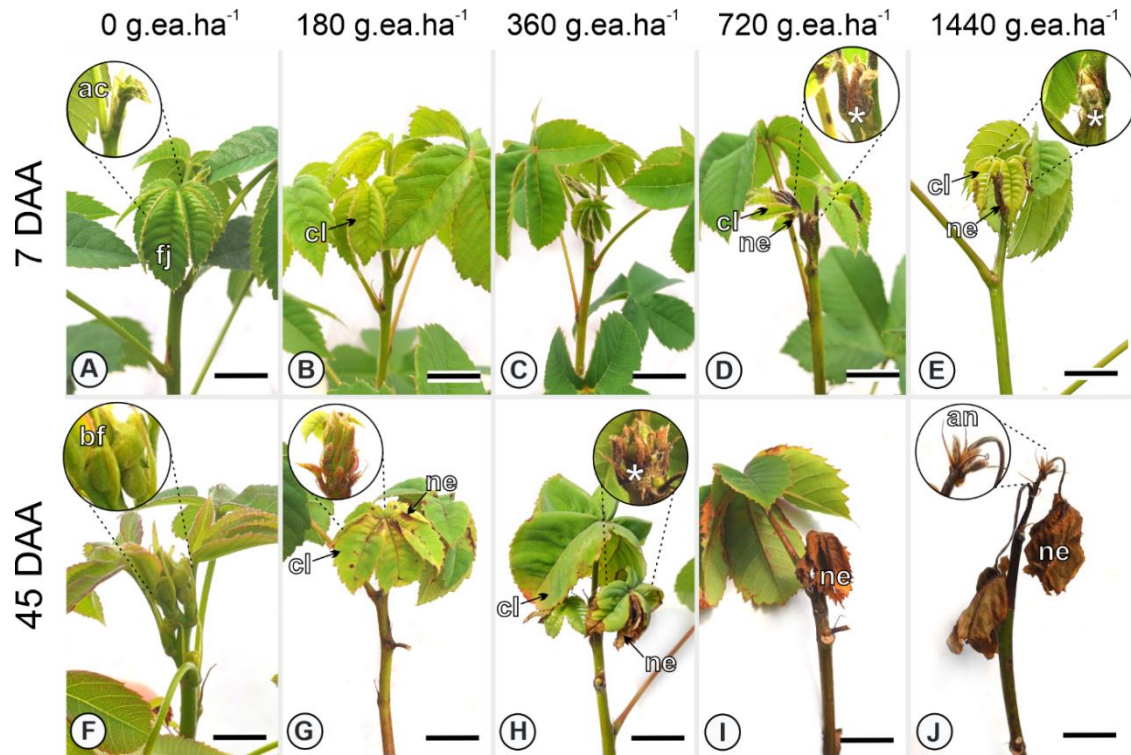


Figura 2 – Caracterização visual do ápice caulinar de mudas de *Cochlospermum regium* submetidas a diferentes doses do herbicida à base de glifosato 7 (A-E) e 45 (F-J) dias após a aplicação (DAA). Controle (A e F), dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (B e G), 360 g.e.a.ha⁻¹ (C e H), 720 g.e.a.ha⁻¹ (D e I), 1440 g.e.a.ha⁻¹ (E e J). Abreviações: ac - ápice caulinar, an - ápice necrótico, bf - botão floral, cl - clorose, fj - folha jovem, ne – necrose, asterisco - ápice com danos e estipulas senescentes. Barras: 2 cm.



Figura 3 – Caracterização visual do ápice caulinar de mudas de *Cochlospermum regium* submetidas a diferentes doses do herbicida à base de glifosato 90 dias após a aplicação (DAA). Controle (A e B), dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (C), 360 g.e.a.ha⁻¹ (D), 720 g.e.a.ha⁻¹ (E), 1440 g.e.a.ha⁻¹ (F). Abreviações: an - ápice necrótico, bf - botão floral, ca - caule, en - entrenó, es- estípula, fl - flor em antese, gf - gema floral, gm – gema com verticilos não desenvolvidos, pf - primórdios foliares, asterisco - estípula com formato alterado. Barras: A e F (2 cm), B-D (1 cm), E (0,5 cm).

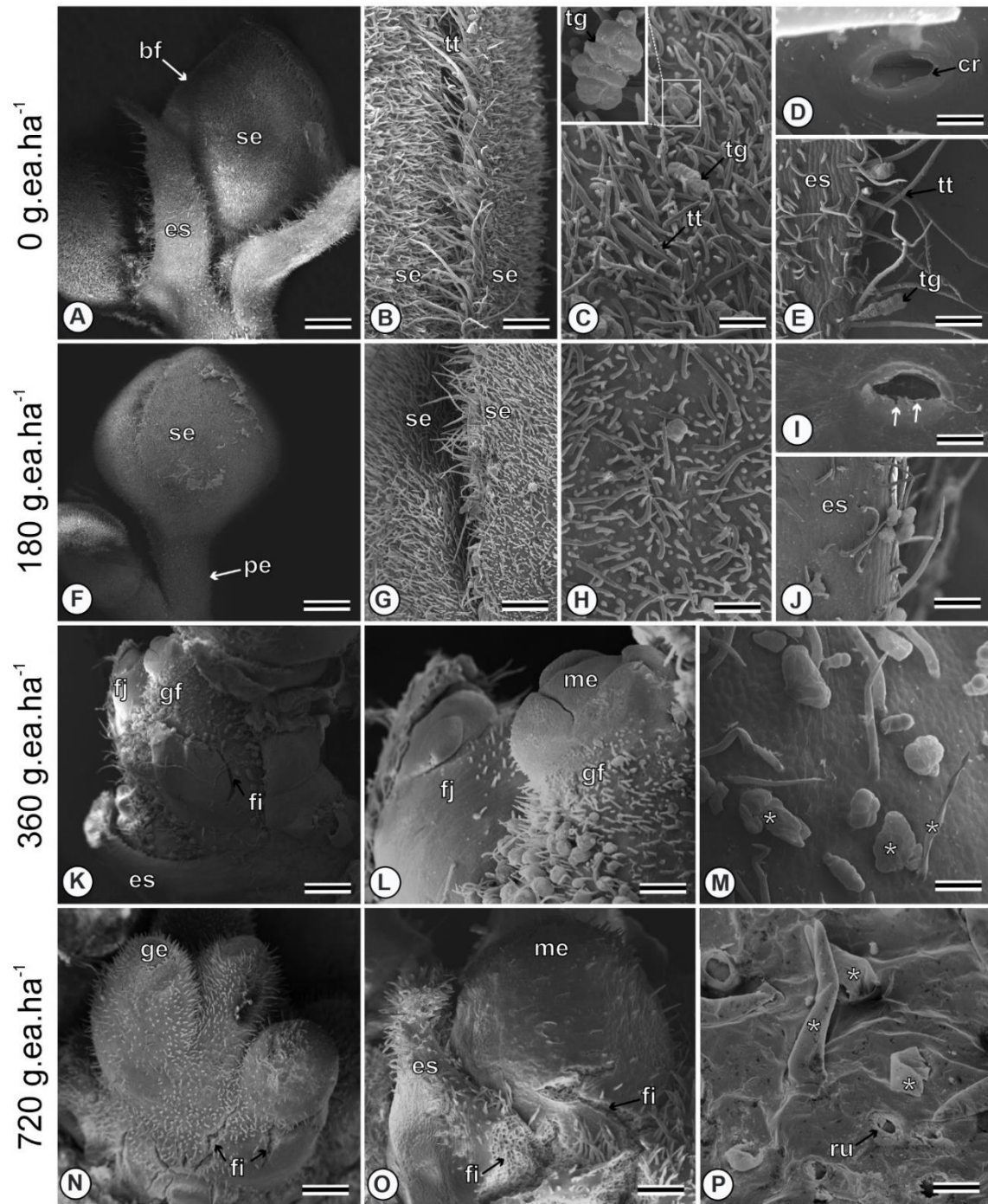


Figura 4 - Caracterização micromorfológica de botões florais (A-J) e ápice caulinar (K-P) de mudas de *Cochlospermum regium* submetidas a diferentes doses do herbicida à base de glifosato 90 dias após a aplicação. Controle (A-E), dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (F-J), 360 g.e.a.ha⁻¹ (K-M), 720 g.e.a.ha⁻¹ (N-P). Abreviações: bf- botão floral, cr - crista estomática, es - estípula, fi - fissura com ruptura da epiderme, fj - folha jovem, ge - gema, gf - gema floral, me - meristema, pe - pedúnculo, ru - ruptura da epiderme, se - sépalas, tg - tricoma glandular, tt - tricomas tectores, asterisco - tricomas glandulares e tectores colapsados. Barras: A (950μm), B, G e L (250 μm), C e H (100 μm), D e I (7 μm), E e J (80 μm), K (500 μm), M (70 μm), N (350 μm), O (200 μm) e P (20 μm).

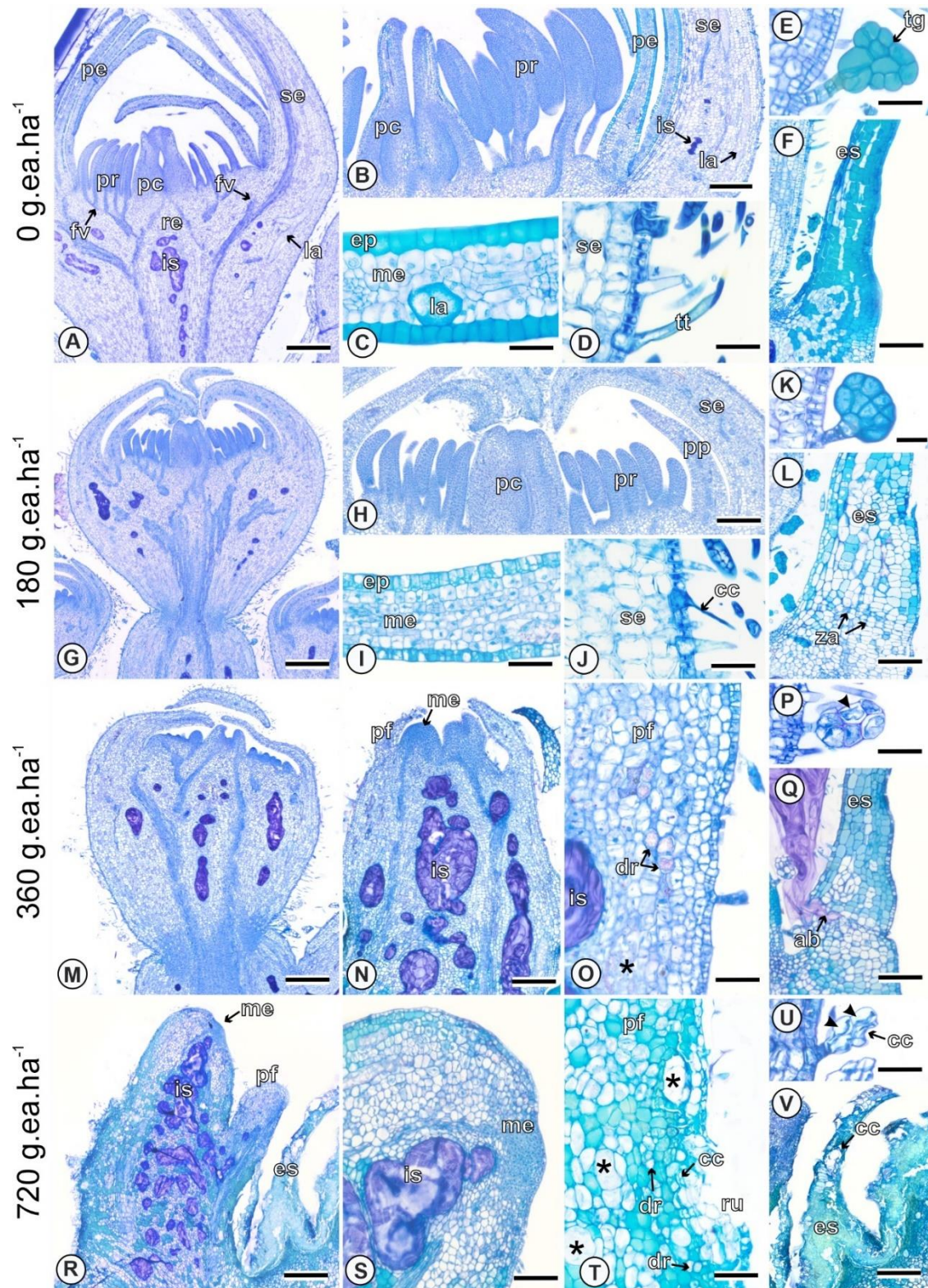


Figura 5 - Caracterização anatômica de botões florais (A-J) e ápice caulinar (K-R) de mudas de *Cochlospermum regium* submetidas a diferentes doses do herbicida à base de glifosato 90 dias após a aplicação. Controle (A-E), dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (F-J), 360 g.e.a.ha⁻¹ (K-M), 720 g.e.a.ha⁻¹ (N-P). Abreviações: ab - área de abscisão, cc - colapso celular, is - idioblasto secretor de mucilagem, dr - drusas, ep - epiderme, es - estípula, fv - feixes vasculares, la - laticífero,

me – meristema, me – mesofilo, pc - primórdios do carpelo, pe – pétala, pf - parênquima fundamental, pf- primórdio foliar, pr - primórdios do androceu, re – receptáculo, ru - ruptura da epiderme, se – sépala, tt - tricoma tector, za - zona de abscisão, asterisco - laticíferos. Barras: A e G (500 μm), B e H (300 μm), C e I (30 μm), D e J (50 μm), E, K, P e U (50 μm), F, L, Q e V (200 μm), O e T (70 μm), M e R (400 μm) e S (100 μm).

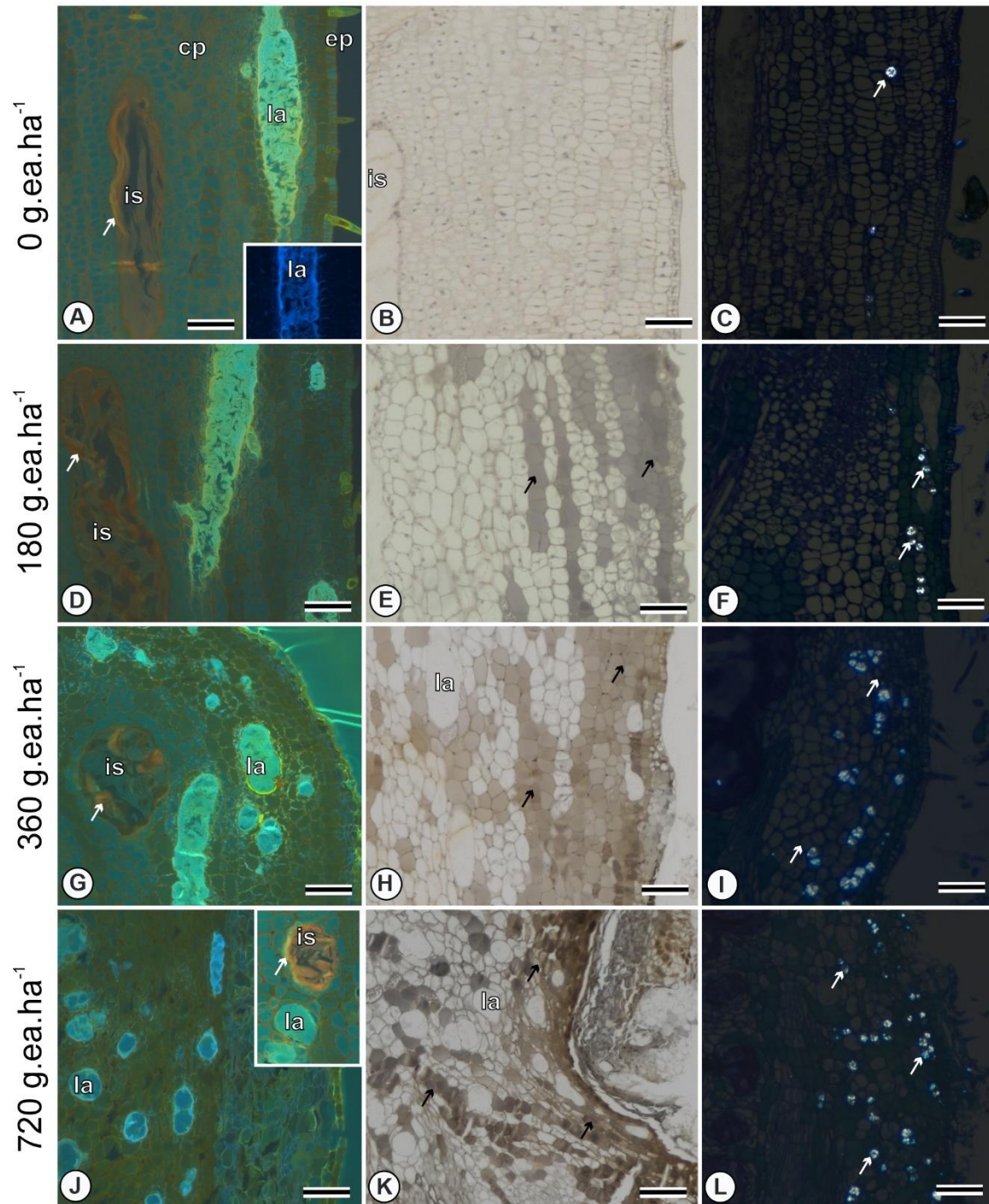


Figura 6 - Caracterização histoquímica em ápice caulinar de mudas de *Cochlospermum regium* submetidas a diferentes doses do herbicida à base de glifosato 90 dias após a aplicação. Controle (A-C), dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (D-F), 360 g.e.a.ha⁻¹ (G-I), 720 g.e.a.ha⁻¹ (J-L). Reação com

corifosfina (A, D, G e J) para detecção de pectinas corados em laranja. Em A, o detalhe mostra autofluorescência dos laticíferos sob luz UV. Reação com cloreto férrico (B, E, H e K) para detecção de compostos fenólicos corados em marrom/castanho. Luz polarizada (C, F, I e L) evidenciando os cristais. Abreviações: cp - células parenquimáticas, is – idioblasto secretor de mucilagem, ep – epiderme, la – laticífero, seta - indica reação positiva para os respectivos testes histoquímicos. Barras: A-L (100 μ m).

**Morfoanatomia, histoquímica, ultraestrutura e análise do néctar de nectários
extraflorais de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae), uma espécie não alvo, em
resposta ao herbicida glifosato**

Hugo Humberto de Araújo^a; José Danizete Brás Miranda^a; Graciele Daiane Diniz Soares^a;
Renata Maria Strozi Alves Meira^a; Larisse de Freitas-Silva^b; Luciano Gomes Fietto^c; Luzimar
Campos da Silva^{a*}

^a Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brasil.

^b Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas 44380-000, BA, Brasil.

^c Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brasil.

* Autor de correspondência: luzimar@ufv.br

Resumo

Nectários extraflorais (NEFs) estão envolvidos em interações mutualísticas entre plantas e insetos. As características morfoanatômicas dos NEFs e a produção de néctar pode ser influenciada pela ação de poluentes e contaminantes ambientais, como o herbicida glifosato. Nossa hipótese é que os NEFs atuam como um dreno e são impactados negativamente pela exposição ao glifosato, por meio de danos morfoanatômicos, alterações na produção e qualidade do néctar. Assim, nosso objetivo foi investigar as respostas morfoanatômicas, histoquímicas, ultraestruturais e funcionais promovidas pelo glifosato em NEFs de *Joannesia princeps*, uma espécie nativa, não alvo. Mudanças de *J. princeps* foram submetidas a aplicação de glifosato nas doses de 180, 360, 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹. Decorridos 12 dias após a aplicação, foram feitas análises visuais, caracterização anatômica em microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, análises histoquímicas, quantificação do volume, massa e açúcares. Os NEFs de plantas expostas ao herbicida apresentaram sintomas de danos visuais precoces incluindo clorose, manchas escuras e necroses que evoluíram para senescência e abscisão. Em plantas tratadas com o herbicida ocorreu colapso epidérmico e descamação de ceras epicuticulares, formação de zona de abscisão na base do pedúnculo, colapso de células do floema e tecidos secretores, além da redução da densidade do conteúdo celular, vacuolização e compactação do citoplasma. A histoquímica revelou redução da detecção de proteínas,

carboidratos, amido e compostos fenólicos nos tecidos secretores. Em ultraestrutura, foram observados danos e alterações nos plastídios, mitocôndrias, surgimento de vacúolos líticos e corpos multivesiculares. Em plantas expostas também ocorreu redução do volume e aumento nos níveis de açúcares. Nossos dados revelam que os NEFs de *J. princeps* são responsivos ao glifosato, que promoveu alterações morfoanatômicas, histoquímicas e estruturais, que resultam na redução da produção e qualidade do exsudado. Menores volumes de néctar e alterações na composição podem reduzir as defesas indiretas mediadas pelos NEFs e, por consequência, podem afetar os serviços ecossistêmicos prestados por essas plantas. Este é o primeiro estudo a descrever os impactos do glyphosate na morfoanatomia de nectários extraflorais e seus impactos funcionais.

Palavras-Chave: Estruturas secretoras, Mata Atlântica, Pesticidas, Serviços ecossistêmicos.

1. Introdução

Os nectários extraflorais (NEFs) são estruturas secretoras responsáveis pela produção de néctar, um líquido açucarado que representa um importante recurso alimentar para formigas e outros artrópodes (Delgado et al., 2017; Nepi et al., 2018). Os NEFs estão presentes em cerca de 4479 espécies vegetais, distribuídas em 130 famílias (Keeler et al., 2025). Plantas com NEFs desempenham importante papel ecossistêmico, sendo um componente ecológico fundamental na manutenção de ecossistemas tropicais como Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (Miranda et al., 2022; Barbosa et al. 2025, Cavalcante et al., 2024).

Os NEFs podem ser considerados uma forma de defesa indireta ou constitutiva (Del-Claro et al., 2016; Moura et al., 2021). Essas estruturas secretoras estão relacionadas com importantes serviços ecossistêmicos pois medeiam uma relação de mutualismo entre plantas e insetos, principalmente formigas (Heil, 2015). Ao se alimentar do néctar, as formigas podem melhorar a saúde e sobrevivência das colônias (Calixto et al., 2021a). Em contrapartida, elas aumentam a aptidão das plantas portadoras de NEFs ao desempenhar um papel defensivo contra o ataque de herbívoros e fitófagos (Yamawo, 2021; Alencar et al., 2023). A quantidade e a qualidade do néctar produzido influenciam diretamente a preferência e recrutamento de formigas patrulheiras (Delgado et al., 2017). Maiores volumes e teores de açúcares no néctar tendem a atrair espécies mais agressivas e mais eficientes na defesa das plantas (Pacelhe et al., 2019; Calixto et al., 2021b; Alencar et al., 2023).

O néctar possui uma composição mista, que pode incluir além de água e açúcares, diferentes polissacarídeos, mucilagens, aminoácidos, proteínas, metabólitos secundários como alcaloides e compostos fenólicos além de outros constituintes (Nepi et al., 2018; Nicolson, 2022). A produção e a exsudação do néctar é um processo complexo e envolve diferentes tecidos especializados nos nectários que apresentam células com intensa atividade metabólica (Fahn, 1979; Nepi et al., 2018). A morfologia e a estrutura anatômica dos nectários estão diretamente relacionadas à produção de néctar e sua composição (Millán-Cañongo, 2014; Alencar et al., 2023). No entanto, fatores bióticos, como a herbivoria, podem alterar a morfoanatomia e distribuição dos NEFs, bem como a produção, a composição e a qualidade do néctar, alterando os padrões de forrageamento e preferência alimentar de formigas patrulheiras (Delgado et al., 2017; Calixto et al., 2021b). Fatores abióticos naturais, como a sazonalidade climática, variações na temperatura, umidade, luminosidade e fogo, também afetam a atividade dos NEFs e composição no néctar (Alves-Silva et al., 2013; Nicolson, 2022).

Recentemente, Silva et al. (2023) e Rezende e Silva (2024) demonstraram que poluentes atmosféricos de origem antrópica alteram a anatomia dos NEFs. Estes autores hipotetizaram que essas alterações estruturais podem comprometer a produção do néctar e interferir nas interações mutualísticas mediadas por essas estruturas secretoras. No entanto, ainda existem grandes lacunas sobre o impacto de outros contaminantes ambientais como os pesticidas, especialmente o efeito dos herbicidas, nessas estruturas secretoras. Os poucos estudos envolvendo herbicidas estão restritos, em sua maioria, à análise da atividade e composição do néctar de nectários florais (NF), devido a sua relação direta com polinizadores, especialmente abelhas (Thompson et al., 2014; Zioga et al., 2022, 2023). Nestes estudos, os aspectos morfoanatômicos e estruturais dos nectários são negligenciados, apesar da sua relação direta com a produção e composição do néctar. Em comparação com os NF, os NEFs geralmente ficam completamente expostos aos visitantes e estão presentes e ativos durante todo o período de crescimento vegetativos das plantas, não se restringindo ao período reprodutivo (Zhou et al., 2023). Os NEFs podem representar assim, um maior risco de contaminação indireta de animais não alvo em comparação aos NF, nas plantas expostas à pesticidas sistêmicos como o glifosato (Zhou et al., 2022, 2023).

O glifosato [N- (fosfonometil) glicina], é um herbicida sistêmico amplamente utilizado no controle de plantas daninhas. É o herbicida mais utilizado no mundo e o mais comercializado no Brasil (IBAMA, 2023; Sindiveg, 2025). Após a aplicação, glifosato é absorvido via cutícula e translocado pelo sistema vascular, principalmente floema, para regiões metabolicamente ativas, como ápices caulinares e radiculares, folhas, flores e frutos em

desenvolvimento (Singh et al., 2020; Freitas-Silva et al., 2022). O glifosato atua na rota do ácido chiquímico inibindo a produção de aminoácidos essenciais, promovendo alterações metabólicas nas plantas sensíveis (Finley and Duke, 2020). Este herbicida promove a redução de pigmentos fotossintéticos, redução na assimilação de CO₂, aumento da peroxidação lipídica que resulta em danos celulares e, por fim, na morte das plantas (Freitas-Silva et al., 2020; 2022; Araújo et al., 2024; 2025).

Durante a aplicação de herbicidas, devido ao manejo inadequado, parte do produto pulverizado pode contaminar área não alvo pela deriva (Mendes et al., 2023), e atingir plantas nativas próximas às áreas agrícolas. Os estudos sobre o efeito do glifosato em espécies de plantas não alvo são relativamente escassos tendo em vista a alta diversidade de ambientes tropicais, como a Mata Atlântica, um *hotspot* de biodiversidade (Myers, 2000). Esses estudos se concentram apenas nos efeitos morfoanatômicos e metabólicos das plantas nativas (Cruz et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2020; Araújo et al., 2024), não abordando possíveis impactos anatômicos e funcionais em estruturas secretoras como os NEFs.

Joannesia princeps (Euphorbiaceae), é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, com ampla distribuição (Külkamp, 2020) e reconhecida importância ambiental e ecológica (Silva et al., 2023). A espécie possui um par de NEFs (Freitas-Silva et al., 2023) no ápice do pecíolo (acropeciolares) e na base do pecíolo (basipeciolares) (Fig. 1 A). Os NEFs dessa espécie estão envolvidos em uma série de interações diretas e indiretas com diferentes tipos de artrópodes (Fig. 1 B-D) incluindo formigas, aranhas e mosquitos (observações de campo pelos autores). A presença de NEFs extraflorais grandes, ricamente vascularizados, com alta produção de exsudado e atividade metabólica intensa, torna essa espécie um modelo adequado não apenas para estudos de biologia da secreção (Freitas-Silva et al., 2023), mas também para investigação dos efeitos da poluição nessas estruturas secretoras que são frequentemente negligenciadas (Silva et al., 2023; Rezende e Silva, 2024). *Joannesia princeps* tem se mostrado uma planta modelo em estudos frente a diferentes contaminantes ambientais como chuva ácida (Silva et al., 2005; Andrade et al., 2020), chuva com flúor (Silva et al., 2000), poluição atmosférica (Silva et al., 2023) e pesticidas como o herbicida glifosato (Araújo et al., 2025).

Considerando que o glifosato é um herbicida sistêmico, altamente solúvel em água e translocado via floema (Singh et al., 2020), nossa hipótese é que os NEFs de plantas nativas não alvo expostas a este herbicida, como *J. princeps*, funcionam como um dreno, devido à alta atividade metabólica e rica vascularização. Além disso, a topografia dos NEFs de *J. princeps* pode facilitar a exposição à deriva de pesticidas como o glifosato, podendo acarretar alterações estruturais, micromorfológicas e interferir na produção e composição do néctar, podendo

comprometer os serviços ecossistêmicos e as interações mediadas por essas estruturas secretoras. Embora Araújo et al. (2025) tenham investigado as alterações morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas em folhas de *J. princeps* expostas ao glifosato, os efeitos nos NEFs ainda são desconhecidos, apesar da sua relevância ecológica.

Nesse contexto, nosso objetivo foi investigar as respostas morfoanatômicas, histoquímicas, ultraestruturais e funcionais promovidas pela aplicação de diferentes doses do herbicida glifosato em NEFs de *Joannesia princeps*. A partir desse estudo buscamos responder às seguintes perguntas: (i) A aplicação do herbicida a base de glifosato irá promover alterações visuais, anatômicas e histoquímicas nos NEFs de *J. princeps*? (ii) A produção, composição e qualidade do néctar serão alterados pela aplicação do herbicida? (iii) Quais possíveis implicações funcionais dessas alterações?

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção das mudas e cultivo em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa, localizada nas coordenadas 20° 45' 33.8" S, 42° 51' 10.4" W, Minas Gerais, Brasil. As mudas foram obtidas conforme metodologia descrita por Araújo et al., (2025) com adaptações. Sementes de *Joannesia princeps* foram obtidas a partir do matrizes localizadas no “Horto Botânico” da UFV. Após a coleta as sementes foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio 30% e secas à temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a ruptura do tegumento e plantio das sementes em potes plásticos de 500mL com substrato Topstrato HT® (Vida Verde). As mudas foram transplantadas, 30 dias após o plantio, para vasos plásticos de 3,8L com substrato comercial da mesma marca. A irrigação foi feita diariamente e a aplicação de solução nutritiva de Hogland a ½ força iônica (Hoagland e Arnon 1950) foi feita semanalmente. As mudas permaneceram nessas condições por 90 dias e, posteriormente, foi feita a padronização visual e aplicação do herbicida.

2.2 Aplicação do herbicida

As mudas (n=5) foram pulverizadas com diferentes doses de herbicida à base de glifosato (Roundup® Original Mais (480 g/L de equivalente ácido de N-(phosfometil-glicina)). Foram aplicadas quatro doses crescentes que correspondem a 180, 360, 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ e

o controle sem pulverização. Estas doses correspondem a 0, 12.5%, 25%, 50% e 100% da dose de 1440 g.e.a.ha⁻¹ que frequentemente é aplicada em campo para o controle de plantas daninhas. A seleção dessas doses foi feita com base no estudo prévio de Araújo et al. (2025) com *J. princeps* exposta a um herbicida à base de glifosato. A pulverização foi feita diretamente na porção aérea das plantas durante o período da manhã, entre 7h e 8h, com auxílio de pulverizador (Herbicat®, Catanduva Brasil) propelido a CO₂, acoplado a duas pontas de pulverização (XR11002VP, Teejet, Wheaton, Illinois, EUA) com espaçamento de 0,5m. A aplicação foi feita sob pressão constante ajustada para 150 kPa e volume de calda de 150 L/ha⁻¹. Durante a aplicação, as condições climáticas eram: temperatura de 22,9 °C, umidade relativa do ar de 88% e velocidade do vento de 0,9 m/s. Após a aplicação, as mudas permaneceram na casa de vegetação sob as mesmas condições de cultivo. As coletas e análises foram conduzidas 12 dias após a aplicação do herbicida (DAA).

2.3 Caracterização de danos visuais nos NEFs

A caracterização visual de danos promovidos pelo herbicida nos NEFs acropeciulares e basipeciulares foi feita diariamente após a aplicação do herbicida. O registro fotográfico dos nectários foi feito 12 DAA, com auxílio de câmera digital (Galaxy A34 48 MP, – Samsung) acoplado à lente macro (Apexel, 100mm). A observação foi feita em NEFs de folhas da região do terceiro nó, próxima ao ápice, do oitavo nó, próxima ao nó cotiledonar.

2.4 Quantificação do volume de néctar e análise de açúcares

A coleta do néctar foi feita 12 DAA no período da manhã, entre 8 e 9h, período com maior atividade secretora nos NEFs. O néctar foi coletado cuidadosamente da superfície secretora dos nectários extraflorais com auxílio de tubos capilares com volume total de 58 µL (Perfecta, Lab™, São Paulo, Brasil). A coleta foi feita em todos os NEFs extraflorais ativos, incluindo os acropeciulares e basipeciulares. O volume total de néctar por planta (n=4) foi estimado com base na altura da coluna de néctar nos capilares e expresso em µL/planta. Em seguida, as amostras foram transferidas para microtubos de 1 mL e pesadas em balança analítica para o cálculo da massa expressa mg/planta. Após a coleta as amostras foram armazenadas em freezer (-30°C) até o momento da análise do néctar.

Para a quantificação dos teores de açúcares no néctar, o volume de cada microtubo foi completado para 1mL com água ultrapura e homogeneizadas em vórtex por 15 segundos. Em

seguida, as amostras foram filtradas em membrana de nylon de 0.45 μm (N66) e transferidas para *vials* de 1,5 mL. A análise foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Shimadzu, Japão) equipado com coluna de análise de carboidratos 300 x 7.8 mm (Aminex HPX-87P) e detector de índice de refração (RID). A fase móvel utilizada foi água ultrapura, em eluição isocrática, com fluxo constante de 0,6 mL/min⁻¹, temperatura da coluna de 85 °C, pressão de operação de 11 kgf/cm⁻² e volume de injeção de 20 μL . A curva de calibração foi obtida pela injeção de soluções padrão de glicose, frutose e sacarose, nas concentrações de 0,1 a 10 mg/mL⁻¹, sendo os teores de açúcares das amostras calculados com base na equação da curva padrão. As análises foram realizadas no Departamento de Bioquímica da UFV.

2.5 Caracterização dos NEFs em microscopia eletrônica de varredura

Nectários extraflorais (n=3) acropeciulares e basipeciulares foram coletados em folhas completamente expandidas do segundo e terceiro nó, do ápice para a base. Foram coletados NEFs completamente desenvolvidos e em atividade secretora, com e sem sintomas de danos visuais. As amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada - FNT (Kraus e Arduin 1997), desidratadas em série etílica e submetidos a desidratadas em com CO₂ líquido em um secador (CPD 030, 15 Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Em seguida, as amostras foram fixadas em stubs revestidos com fita de carbono e cobertas com uma fina camada de ouro com auxílio de um metalizador (FDU 010, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram analisadas e fotografadas em um microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra) operado a 20 kV, localizado no Núcleo de Microscopia e Microanálises da UFV.

2.6 Caracterização ultraestrutural dos NEFs em microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos da porção secretora de NEFs acropeciulares foram coletados e fixados por 12h em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1M e pH 7,2), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e submetidos à contraste em bloco com acetato de uranila a 0,5% (Bozzola e Russell, 1991). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etanólica, incluídas em resina LR White (Sigma Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a inclusão, as amostras foram seccionadas em ultramicrotomo (Leica EM UC6, Vienna, Áustria) a 60 nm de espessura e depositados em grides de cobre (Electron Microscopy Sciences). As amostras foram contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). A análise foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (modelo

Zeiss EM 109, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha) aperado a 80 kV no Núcleo de Microscopia e Microanálises da UFV.

2.7 Caracterização anatômica e histoquímica dos NEFs em microscopia de luz

NEFs acropetiolares e basipetiolares foram coletados em folhas completamente expandidas do segundo e terceiro nós, do ápice para a base. Foram coletados NEFs completamente desenvolvidos (n=3) e em atividade secretora, sem sintomas de danos visuais. As amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada - FNT (Kraus e Arduin, 1997), estocadas em etanol 70%. As amostras foram submetidas a desidratação em série etílica crescente, pré-infiltração, infiltração e posterior inclusão em historesina (Leica Historesin®, Heidelberg, Germany). Cortes longitudinais com 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo automático (Leica RM 2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, IL, USA). Os cortes foram corados com azul de toluidina (O'Brien e McCully, 1981) para a caracterização anatômica e as lâminas, montadas com resina sintética (Permout, Fisher Scientific). Para os testes histoquímicos, os cortes foram submetidos à solução de cloreto férrico pra detecção de compostos fenólicos não estruturais (Johansen, 1940), Lugol para detecção de amido (Johansen, 1940), reagente de Schiff (PAS) para detecção de polissacarídeos neutros (O'Brien e McCully, 1981) e Xilidine Ponceau (XP) para detecção de proteínas (O'Brien e McCully, 1981). Para todos os testes histoquímicos foram feitos os respectivos brancos e controle, quando possível.

As lâminas para a caracterização anatômica e histoquímica foram analisadas em microscópio de luz, e fotografadas em fotomicroscópio (AX70RF, Olympus Optical, Tóquio, Japão), equipado com sistema de captura de imagens (Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision, Alemanha), localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

2.8 Análise estatística

Os dados da quantificação do volume, massa e densidade do néctar foram submetidos a análise de variância e homogeneidade da variância. As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA). Em seguida, os grupos de respostas foram submetidos ao teste de Tukey. Foi adotado um nível de significância de 5% ($p < 0.05$). As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc.).

3. Resultados

3.1 Caracterização de danos visuais em NEFs

Os NEFs de *J. princeps* (Fig. 2) ocorrem aos pares no ápice do pecíolo (acropeciolar) e isolados na região da base do pecíolo (basipeciolares) (Fig. 2 A, F e K). Nas plantas do controle, os NEFs acropeciolares e basipeciolares possuem pedúnculo de cor verde claro e a porção secretora terminal possui superfície secretora com coloração amarelada e exsudação abundante de néctar que se acumula na forma de gotas e é mais volumoso na porção do ápice da planta (Fig. 2 A, F e K). Eventualmente, o néctar pode escorrer e se depositar na base dos nectários (Fig. 2 A-E).

Os primeiros sintomas visuais surgiram no terceiro dia após a aplicação (DAA) em NEFs acropeciolares e basipeciolares na porção próxima ao ápice caulinar (terceiro nó), incluindo clorose discreta nos NEFs nas doses de 720 g.e.a.ha⁻¹ e 1440 g.e.a.ha⁻¹. No quinto DAA os NEFs da porção inferior do caule (oitavo nó) adquiriram coloração escura que progrediu para senescência e formação de áreas de abscisão a partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹. No oitavo DAA surgiram manchas escuras nos NEFs acropeciolares e basipeciolares a partir da dose 360 g.e.a.ha⁻¹ que se intensificaram com o aumento das doses do herbicida. No controle, todos os NEFs das plantas estavam em atividade secretora sem sinais de senescência.

No 12º DAA, os NEFs apresentaram alterações visuais em todas as plantas tratadas com o herbicida, inclusive na menor dose aplicada. Os NEFs acropeciolares e basipeciolares da região do terceiro nó das plantas apresentaram sintomas visuais a partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹, incluindo áreas necróticas e escurecidas próximas da superfície secretora (Fig. 2C), que se estenderam para região do pedúnculo na dose de 720 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 2 D e E). Na dose de 1440 g.e.a.ha⁻¹ os NEFs acropeciolares e basipeciolares apresentaram aspecto necrótico em toda sua extensão, inclusive na região da base do pedúnculo além da formação de áreas de abscisão (Fig. 2 E e J). Os NEFs basipeciolares do oitavo nó, em todas doses do herbicida, apresentaram aspecto necrótico e senescente, com formação de áreas de abscisão, inclusive na menor dose (Fig. 2 K-O). Visualmente, ocorreu uma redução acentuada da exsudação de néctar e aumento da viscosidade a partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹ que se intensificou com o aumento das doses do herbicida (Fig. 2 A-O). Os NEFs acropeciolares e basipeciolares em plantas do controle não apresentaram danos visuais e estavam em intensa atividade secretora em toda a extensão das plantas (Fig. 2 A, F e K).

3.2 Quantificação do néctar e análise de açúcares

A aplicação do glifosato promoveu uma redução significativa no volume total de néctar exsudado por planta nas doses 360, 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ que correspondem respectivamente a uma redução de ~ 33%, 36% e 37,5% em relação ao controle (Fig. 3A). Em relação aos açúcares ocorreu aumento nas concentrações de glicose nas doses 720 e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 3 B) e frutose na dose 1440 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 3 C). Não ocorreram variações estatisticamente significativas nos teores de sacarose (Fig. 3 D). No momento da coleta, foi observado um aumento visual da viscosidade do néctar a partir da dose 360 g.e.a.ha⁻¹.

3.3 Caracterização de danos micromorfológicos

Em microscopia eletrônica de varredura, os NEFs acropetiolares e basipetiolares de *J. princeps*, do controle apresentaram aspecto íntegro, com células túrgidas em toda a extensão da superfície secretora, região periférica e pedúnculo (Fig. 4 A-C e J-K). As ceras epicuticulares apresentam aspecto liso em toda superfície secretora e região do pedúnculo. Tricomas tectores ocorrem dispersos na epiderme na região do pedúnculo.

Em todas as plantas submetidas ao herbicida ocorreram alterações micromorfológicas nos NEFs acropetiolares e basipetiolares (Fig. 4 D-I e L-O). Em NEFs de plantas submetidas à dose de 180 g.e.a.ha⁻¹, sem sintomas visuais, ocorreu erosão e descamação de ceras epicuticulares na superfície secretora (Fig. 4 D) e células epidérmicas do pedúnculo com aspecto ondulado (Fig. 4 F). Em nectários com sintomas visuais, foi observado intenso colapso celular na região do pedúnculo e porção secretora, além da formação de sulcos (Fig. 4 E e F). No entanto, nessa dose, ocorreram também nectários sem alterações micromorfológicas evidentes (Fig. 4 L e M).

Na dose de 1440 g.e.a.ha⁻¹ os NEFs acropetiolares e basipetiolares, sem sintomas visuais (Fig. 4 G) apresentaram colapso de células epidérmicas, com formação de sulcos, e erosão das ceras epicuticulares no pedúnculo, superfície secretora e região periférica. Em NEFs com sintomas visuais (Fig. 4 H-I e N-O) ocorreu o colapso total da epiderme com formação de sulcos profundos em toda a extensão do pedúnculo, superfície secretora e região periférica acompanhado de erosão e descamação das ceras epicuticulares.

3.4 Caracterização de danos anatômicos em microscopia de luz

Em corte longitudinal, os NEFs acropeciulares e basipeciulares compartilham a mesma estrutura anatômica (Fig. 5 A e B). Nas plantas do controle a porção secretora é constituída por uma epiderme secretora em paliçada e parênquima nectarífero altamente vascularizado (Fig. 5 D). A região do pedúnculo é revestida por epiderme uniestratificada e a porção cortical é constituída por células parenquimáticas (Fig. 5 G). Os feixes vasculares, são constituídos por xilema e floema abundante (Fig. 5 D), se estendem por toda a região central do pedúnculo até atingir o parênquima nectarífero, próximo à epiderme secretora (Fig. 5 D).

Nos NEFs de plantas expostas ao herbicida os danos anatômicos ocorreram com mais frequência a partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹ e se intensificam com o aumento das doses do herbicida (Fig. 5 B e C). Inicialmente, ocorreu a formação de uma zona de abscisão na base do pedúnculo com a ruptura da epiderme e extravasamento de conteúdo celular (Fig. 5 H e I). As células parenquimáticas apresentam aspecto colapsado com o aumento dos espaços intercelulares nessa região (Fig. 5 I), incluindo o colapso dos tecidos de condução com destaque para o floema (Fig. 5 K e L). Posteriormente, ocorreu a completa abscisão do NEF (Fig. 5 C e I), acompanhado do colapso de células epidérmicas, células parenquimáticas e feixes vasculares na porção secretora (Fig. 5 F). Na região do pedúnculo, ocorreu o completo colapso das células parenquimáticas, com proliferação de hifas fúngicas nos tecidos próximos da área de abscisão (Fig. 5 I), além do colapso nos tecidos vasculares, com destaque para o floema (Fig. 5 L).

Na porção secretora, em plantas do controle (Fig. 6 A-C), a epiderme é predominantemente uniestratificada com células alongadas em paliçada, justapostas, com conteúdo celular denso e núcleos grandes, bem delimitados e evidentes (Fig. 6 B). Abaixo da epiderme secretora ocorre uma camada limítrofe com espessamento das paredes anticlinais e abaixo desta o parênquima nectarífero, ambos com células volumosas, citoplasma denso e núcleos grandes, bem delimitados e posicionados na porção central das células (Fig. 6 C).

Em plantas expostas ao herbicida à base de glifosato, as primeiras alterações anatômicas ocorrem a partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹ e se intensificam com o aumento das doses do herbicida (Fig. 6 D-L). Na dose de 360 g.e.a.ha⁻¹, as células da epiderme secretora e parênquima nectarífero apresentaram núcleos menores, citoplasma menos denso e aspecto vacuolizado, em comparação com o controle (Fig. 6 D-F). Na dose de 720 g.e.a.ha⁻¹, as células da epiderme secretora apresentam núcleos com aspecto senescente, condensados e não definidos, além de citoplasma menos denso. As células do parênquima nectarífero apresentaram citoplasma pouco denso e intensa vacuolização com núcleos senescentes em posição parietal (Fig. 6 G-I). Na dose de 1440 g.e.a.ha⁻¹, ocorreu acúmulo de compostos fenólicos na região da epiderme secretora que apresentou núcleos com aspecto colapsado e denso, citoplasma pouco denso e vacuolizado

em comparação com o controle. No parênquima nectarífero, além da intensa vacuolização e núcleo condensado em posição parietal, ocorreu colapso celular (Fig. 6 J-L).

3.5 Alterações histoquímicas em microscopia de luz

Os cortes submetidos a reação com cloreto férrico apresentaram compostos fenólicos não estruturais dispersos na epiderme secretora e parênquima nectarífero em NEFs de plantas do controle (Fig. 7 A) e na dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 7 B). Com o aumento das doses do herbicida, ocorreu uma redução visual na densidade de compostos fenólicos na epiderme secretora e parênquima nectarífero a partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 7 C-E). A reação com Lugol mostrou a presença abundante de grão de amido no parênquima nectarífero em NEFs de plantas do controle (Fig. 7 F) e na dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 7 G). A partir da dose de 360 g.e.a.ha⁻¹ ocorreu redução visual acentuada na presença de grãos de amido (Fig. 7 H-J). A reação com PAS revelou a presença abundante de polissacarídeos neutros no citoplasma das células da epiderme secretora e parênquima nectarífero de plantas do controle (Fig. 7 K). A partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹ (Fig. 7 L) ocorreu uma redução visual na densidade de polissacarídeos acumulados nos tecidos secretores, que progrediu com o aumento das doses do herbicida (Fig. 7 M-O). A reação com XP mostrou a presença abundante de proteínas no citoplasma das células da epiderme secretora e parênquima nectarífero no controle (Fig. 7 P). A partir da dose de 180 g.e.a.ha⁻¹, (Fig. 7 Q) ocorreu uma redução visual na densidade de proteínas acumulados na epiderme secretora e parênquima nectarífero, que progrediu com o aumento das doses do herbicida (Fig. 7 R-T).

3.6 Caracterização de alterações ultraestruturais

Nectários extraflorais de plantas do controle (Fig. 8 A-E e J-M) apresentaram células da epiderme secretora e parênquima nectarífero com conteúdo denso, pouco vacuolizado e inúmeras organelas (Fig. 8A). Os núcleos são bem evidentes e ricos em eucromatina, evidenciando a alta atividade celular (Fig. 8 B, J). O retículo endoplasmático é abundante em todo o citoplasma (Fig. 8 C, L), bem como os dictiossomos (Fig. 8 E). Ocorrem mitocôndrias com cristas bem definidas, principalmente próximas dos plastídios (Fig. 8 C, D, K e L). Os plastídios são numerosos e apresentam conteúdo elétron denso (Fig. 8 A, C, K e L), sendo que na região do parênquima nectarífero é possível observar grãos de amido (Fig. 8 J, L e L). Além

disso, na epiderme secretora é possível observar a formação de espaços periplasmáticos (Fig. 8 A-C).

Em plantas expostas ao glifosato (Fig. 8 F-I e N-R), os NEFs apresentaram alterações ultraestruturais em relação ao controle. O citoplasma possui visualmente menor densidade de organelas como plastídios e mitocôndrias com cristas menos evidentes (Fig. 8 F e G). Visualmente, os vacúolos são maiores, ocorrem vacúolos líticos com presença de conteúdo granular elétron denso (Fig. 8H) e conteúdo multivesicular (Fig. 8 H) ou conteúdo lamelar (Fig. 8I). O citoplasma adquire posição periférica, com organelas posicionadas próximas à parede celular e menor formação de espaços periplasmáticos (Fig. 8 F a I). Na região do parênquima nectarífero a vacuolização é ainda mais evidente (Fig. 8 N). Os plastídios nessa região não apresentam grãos de amido e, visualmente, o conteúdo elétron denso é menos abundante (Fig. 8 P e R). Os vacúolos líticos apresentam corpos multivesiculares, além de plastídios com conteúdo elétron denso sendo englobados (Fig. 8 P e Q). Também ocorrem células em processo de senescência, com um grande vacúolo lítico, degradação de organelas, formação de vesículas, núcleo com cromatina condensada e aspecto granular irregular, além da desorganização do envoltório nuclear (Fig. 8 O - R).

4. Discussão

A aplicação do herbicida à base de glifosato em *Joannesia princeps* promoveu danos morfoanatômicos, micromorfológicos, alterações histoquímicas e ultraestruturais, além de alterações na composição e produção de néctar de nectários extraflorais. As alterações ocorreram, inclusive, em NEFs sem sintomas visuais, a partir da menor dose aplicada, e se intensificaram com o aumento das doses do herbicida. Esses danos promoveram alterações funcionais nos NEFs e possivelmente, podem interferir nas interações mediadas por essa estrutura secretora. Devido à abundante vascularização e intensa atividade metabólica (Freitas-Silva et al., 2023) os NEFs de *J. princeps* podem funcionar como um dreno para o glifosato, que é direcionado para essas regiões. A proximidade com a lâmina foliar, local alvo da aplicação do herbicida, e a topografia em posição exposta na planta, torna os NEFs acropeciulares mais propensos à ação do glifosato, explicando o rápido surgimento de danos visuais poucos dias após a pulverização.

O surgimento dos primeiros sintomas visuais em NEFs acropeciulares e basipeciolar na região do ápice caulinar, está relacionado ao mecanismo de translocação do herbicida. Após a aplicação, o glifosato é direcionado para áreas metabolicamente ativas como ápices caulinares

e folhas jovens (Franz et al., 1997; Freitas-Silva et al., 2022) onde surgem os primeiros sintomas visuais, uma resposta comumente relatada em outras espécies nativas expostas a este herbicida (Cruz, et al., 2021; Araújo et al., 2024, 2025). Os primeiros sintomas visuais de dano, surgiram inicialmente na porção secretora dos NEFs das plantas expostas ao herbicida. Danos visuais nessa região estão associados à elevada atividade metabólica das células da epiderme secretora e do parênquima nectarífero, como demonstrado por Freitas-Silva et al. (2023). Os danos visuais nos NEFs de *J. princeps* podem ser um efeito do estresse oxidativo e alterações metabólicas induzidas pelo glifosato. Araújo et al. (2025) demonstraram que o glifosato promove danos e alterações metabólicas e em folhas de *J. princeps*, resultado em estresse oxidativo, aumento da peroxidação lipídica e, nas maiores doses, um aumento da morte celular.

A senescência dos NEFs de *J. princeps* exposta ao herbicida pode ser uma resposta a quebra da homeostase hormonal e estresse metabólico promovido pelo herbicida. O glifosato promove a redução da produção de auxinas ao inibir a biossíntese de triptofano e estimula a produção de etileno e ácido abscísico que são importantes reguladores das respostas ao estresse em plantas não alvo (Fuchs et al., 2022). O equilíbrio auxinas / etileno é um importante regulador do processo de senescência e abscisão, pois a auxina retarda esse processo e o etileno o estimula (Gulfishan et al., 2019). Curiosamente, os NEFs basipeciolares da região do oitavo nó, em plantas expostas ao herbicida, apresentaram abscisão e senescência precoce em todas as doses. Nossos dados sugerem que, em plantas tratadas com glifosato, ocorreu redução dos níveis de auxinas na base do caule e elevação dos níveis de etileno e ácido abscísico que estimulam, de maneira sinérgica, a formação da zona de abscisão e posterior senescência dos NEFs na região, como demonstrado pelos danos visuais e anatômicos. No entanto, futuras investigações hormonais em plantas expostas ao glifosato podem esclarecer melhor essa hipótese.

Os danos nas ceras epicuticulares verificados nos NEFs de plantas expostas ao herbicida podem ser um efeito dos surfactantes presentes nas formulações comerciais de herbicidas à base de glifosato, que aumentam a permeabilidade da cutícula e facilitam a absorção da molécula ativa (Araújo et al., 2024). O mecanismo de secreção, nos NEFs de *J. princeps*, envolve o acúmulo da secreção no espaço subcuticular com posterior ruptura da cutícula e eliminação do néctar seguido pela regeneração da cutícula e início de um novo ciclo (Freitas-Silva et al., 2023). Desse modo, os danos nas ceras podem comprometer a integridade da cutícula, dificultando a sua regeneração, e facilitando a entrada de microrganismos patogênicos até os tecidos secretores. Além disso, a perda de turgidez e colapso de células epidérmicas em NEFs de *J. princeps* exposta ao herbicida, estão associadas ao processo de senescência e danos

oxidativos induzidos pelo glifosato, como demonstrado por Araújo et al. (2025). Danos micromorfológicos similares foram relatadas na epiderme de folhas de espécies nativas expostas ao glifosato (Freitas-Silva et al., 2020; Cruz et al., 2021) e em NEFs de plantas expostas à poluição atmosférica (Silva et al., 2023) e chuva ácida (Rezende e Silva, 2024).

O glifosato promoveu danos principalmente nas células da epiderme secretora e parênquima nectarífero. Estes tecidos participam ativamente na produção e exsudação do néctar e são ricos em mitocôndrias e plastídios (Fahn, 1979; Nepi, 2007; Freitas-Silva et al., 2023), organelas intimamente associadas à geração de espécies reativas de oxigênio (Demidchik et al., 2015). Devido a intensa atividade metabólica, estes tecidos podem atuar como um dreno do herbicida, que é translocado para regiões metabolicamente ativas nas plantas (Gomes et al., 2014). A redução na densidade do citoplasma, vacuolização, condensação do núcleo e colapso celular são indicativos de redução na atividade metabólica nos NEFs, podendo comprometer a produção de néctar nas plantas expostas ao herbicida. Danos semelhantes foram descritos nos tecidos secretores dos NEFs de *J. princeps* exposta a poluição atmosférica urbana (Silva et al., 2023).

As alterações nos tecidos de condução dos NEFs, especialmente no floema, em plantas expostas ao glifosato, podem limitar o transporte de carboidratos até o parênquima nectarífero. O colapso e a deformação das células do floema representar uma resposta direta à aplicação do herbicida, que é translocado preferencialmente por esse tecido e, durante esse processo, pode ocasionar danos celulares (Freitas-Silva et al., 2020; Araújo et al., 2024). Nos NEFs, os tecidos de condução são os principais responsáveis por fornecer os constituintes do néctar e tem relação direta com o volume de exsudado e teor de açúcares na secreção (Fahn, 2000). Além disso, o floema é a principal via de fornecimento de compostos para a produção do pré-néctar que posteriormente será transformado no néctar nos tecidos secretores (Nicolson, 2022).

As alterações ultraestruturais corroboram os danos observados em microscopia de luz. Em plantas do controle, células da epiderme secretora e parênquima nectarífero apresentaram núcleos volumosos com cromatina descondensada, citoplasma rico em mitocôndrias, dictiossomas, plastídios, retículo endoplasmático, além da formação de espaços periplasmáticos, indicando alta atividade metabólica compatível com a fase secretora nos NEFs (Fahn, 1979; Nepi, 2007; Freitas-Silva et al., 2023). Em contrapartida, nas plantas expostas ao herbicida, as alterações em plastídios e mitocôndrias, além da presença de vários vacúolos líticos com corpos multivesiculares e conteúdo lamelar, são indicativos do estresse promovido pelo herbicida que pode comprometer a atividade metabólica destas células e são compatíveis com o fim da atividade secretora (Fahn, 1979; Nepi, 2007; Machado et al., 2019). Alterações

semelhantes às observadas em nosso estudo também foram descritas em outras espécies vegetais submetidas ao glifosato, mesmo em baixas doses (Campbell et al., 1976; Vaughn et al., 1986; Khan et al., 2020; Soares et al., 2020; Liu et al., 2023).

Além da redução na atividade metabólica, os danos ultraestruturais promovidos pelo glifosato podem progredir para senescência e morte celular. A degradação de organelas, como plastídios e mitocôndrias, a formação de grandes vacúolos líticos com conteúdo elétron-denso e corpos multivesiculares, bem como alterações no núcleo, incluindo a condensação da cromatina e degradação do envoltório nuclear, são indicativos de senescência e morte celular e foram descritos em plantas submetidas a diferentes tipos de estresse abiótico (Doorn et al., 2011; Sychta et al., 2021; Melo et al., 2022). Alterações semelhantes também foram descritas em NEFs durante a senescência, no estágio pós-secretor (Nepi, 2007; Machado et al., 2019). O processo de morte celular induzido pelo glifosato é uma resposta aos danos metabólicos multidimensionais, estresse oxidativo e aumento da peroxidação lipídica que resulta em danos nas organelas e morte celular (Araújo et al., 2025).

A redução na produção de néctar nos NEFs de *J. princeps* exposta ao glifosato é uma consequência conjunta das alterações metabólicas promovidas pelo herbicida, associadas aos danos anatômicos nos tecidos vasculares e tecidos secretores. Araújo et al. (2025) relataram redução da assimilação de CO₂, diminuição de pigmentos fotossintéticos e alterações nas trocas gasosas em folhas de *J. princeps* expostas ao glifosato. Essas alterações metabólicas podem promover diminuição da produção de néctar devido a menor carga de sacarose no floema e outros compostos do pré-nectar. De modo semelhante, Millán-Cañongo (2014) observaram redução na produção de néctar em NEFs de folhas sombreadas devido a menor atividade fotossintética. Além disso, os danos no floema, observados em nosso estudo, podem comprometer o transporte de fotoassimilados até os tecidos secretores reduzindo a produção do néctar. O floema é o tecido condutor mais abundante em NEFs de *J. princeps* (Freitas-Silva et al., 2023) e é o principal responsável pelo fornecimento de carboidratos e outros compostos necessários para a produção de néctar nos tecidos secretores dos NEFs (Fahn, 2000).

A redução de proteínas, carboidratos, amido e compostos fenólicos nos tecidos secretores dos NEFs em plantas tratadas com o herbicida está associada com as alterações metabólicas promovidas pelo glifosato e aos danos estruturais (Gomes et al., 2014). Alterações histoquímicas têm sido reportadas em folhas de plantas expostas ao glifosato (Araújo et al., 2025) e, inclusive, em NEFs de plantas nativas expostas à poluição atmosférica e chuva ácida (Silva et al., 2023; Rezende e Silva, 2024). O néctar de *J. princeps* é complexo, e inclui açúcares, proteínas, mucilagens e carboidratos atestados pela análise histoquímica da secreção

e tecidos secretores (Freitas-Silva et al., 2023). Estas alterações podem comprometer a qualidade e composição do néctar em plantas expostas ao glifosato.

A redução de proteínas e compostos fenólicos é uma resposta ao estresse promovido pelo glifosato que inibe a biossíntese de aminoácidos essenciais e metabólitos secundários devido a interferência na rota do ácido chiquímico (Finley e Duke, 2020). A redução do conteúdo elétron denso nos plastídios observado na análise ultraestrutural, pode ter relação direta com a redução dos compostos fenólicos atestados pela análise histoquímica. Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes não enzimáticos e incluem compostos de defesa, que podem evitar a herbivoria e o ataque de microrganismos patogênicos nesses tecidos (Kumar et al., 2020; Pratyusha et al., 2022). Desse modo, a redução de compostos fenólicos especialmente na epiderme secretora tem um efeito negativo em plantas expostas ao glifosato, pois essa região é mais susceptível ao ataque de patógenos e herbívoros do que os tecidos internos do nectário (Delgado et al., 2017).

De modo semelhante, a redução de proteínas nos NEFs de plantas expostas ao herbicida é consistente com as alterações ultraestruturais no retículo endoplasmático, condensação da cromatina no núcleo e vacúolos líticos que, em conjunto, sugerem uma redução na atividade metabólica e síntese de proteínas. Proteínas são um importante componente do néctar dessa espécie e estão associados ao valor nutricional (Freitas-Silva et al., 2023). Logo, a redução de proteínas nos NEFs pode influenciar a qualidade do néctar em plantas expostas ao herbicida. Silva et al. (2023) também descreveram a redução de proteínas em NEFs de *J. princeps* em área com poluição atmosférica.

A redução de amido e polissacarídeos pode estar relacionada aos danos metabólicos, incluindo a peroxidação lipídica, redução da assimilação de CO₂ e de pigmentos fotossintéticos induzidos pelo herbicida em *J. princeps*, como reportado por Araújo et al. (2025). As alterações ultraestruturais nos plastídios, retículo endoplasmático, núcleo e presença de vacúolos líticos podem reduzir a biossíntese de polissacarídeos como mucilagens e amido alterando a composição do néctar. O amido se acumula principalmente no parênquima nectarífero dos NEFs e, posteriormente, é quebrado nos tecidos secretores (Nicolson, 2022). Além disso, a análise ultraestrutural evidenciou degradação de plastídios e redução da formação de grãos de amido, consistentes com os resultados histoquímicos. Freitas-Silva et al. (2023) apontaram que o amido é uma das principais fontes de energia e carboidratos para a produção do néctar em NEFs de *J. princeps*. Logo, a redução de amido pode interferir na qualidade e teores de açúcares do néctar de plantas expostas ao glifosato. O néctar e NEFs de *J. princeps* também possuem

outros tipos de polissacarídeos, como mucilagens que possuem propriedade higroscópica e conferem aspecto viscoso ao néctar (Freitas-Silva et al., 2023).

Curiosamente, em nosso estudo, verificamos o aumento nas concentrações de açúcares, especialmente, glicose e frutose no néctar de NEFs das plantas expostas às maiores doses do herbicida. O aumento na concentração de açúcares pode ser um efeito combinado da redução na exsudação, atestado pela redução no volume de néctar e alterações ultraestruturais, associado com a evaporação da água do resíduo de néctar acumulado na superfície dos NEFs. A água é um importante componente do néctar e pode influencia propriedades como viscosidade e concentração de açúcares (Nepi et al., 2018; Nicolson, 2022). O néctar de *J. priceps* é copioso e naturalmente rico em hexoses e mucilagens que conferem aspecto viscoso (Freitas-Silva et al., 2023). Desse modo, a evaporação da água tornou o néctar ainda mais viscoso em plantas expostas ao glifosato, como observado no momento da coleta. Além disso, a redução da condutância estomática (Araújo et al., 2025) pode reduzir a absorção de água e os danos nos tecidos de condução podem comprometer o transporte de água e solutos até a porção secretora dos NEFs favorecendo a concentração de açúcares e mucilagens.

Em conjunto, os danos morfoanatômicos e funcionais promovidos pelo glifosato nos NEFs de *J. princeps* podem comprometer o desenvolvimento e aptidão das plantas ao interferir na defesa mediada por formigas mutualísticas. De acordo com a hipótese da defesa ótima, os recursos das plantas são direcionados para a defesa de estruturas e regiões mais vulneráveis (McKey, 1974; Calixto et al., 2021b). Desse modo, as plantas devem investir mais recursos na produção de NEFs e néctar em regiões mais vulneráveis à herbivoria, como folhas jovens e meristemas (Delgado et al., 2017). Os NEFs de *J. princeps* desempenham um papel protetivo importante ao direcionar as regiões onde as formigas irão patrulhar ativamente. A senescência precoce dos NEFs caulinares reduz a oferta de néctar nessa região e torna as folhas completamente expandidas mais susceptíveis à herbivoria, o que pode comprometer a maquinaria fotossintética caso toda a folha seja perdida (Delgado et al., 2011, 2017).

As alterações histoquímicas e danos nos tecidos secretores dos NEFs podem modificar a composição do néctar e sua qualidade, interferindo na sua atratividade para insetos mutualísticos (Nepi et al., 2018). Carboidratos e proteínas são os metabólitos primários mais abundantes no néctar e servem como fontes de energia e nitrogênio para os artrópodes que se alimentam de néctar (Nicolson e Thornburg, 2007; Nepi et al., 2018; Nicolson, 2022). O volume e a composição do néctar têm influência direta na preferência alimentar das diferentes espécies de formigas patrulheiras e pode, inclusive, influenciar na atração de espécies mais agressivas (Baker et al., 1978). Alencar et al., (2023) demonstraram que plantas com nectários

maiores e maior produção de néctar atraíram formigas patrulheiras dominantes mais agressivas e em maior quantidade. A agressividade das formigas patrulheiras tende a aumentar com o aumento da concentração de carboidratos dos NEFs (Nepi 2018; Pacelhe et al., 2019; Alencar et al., 2023). Desse modo, a relação carboidrato / proteínas é um importante fator na preferência alimentar de formigas e a redução desses compostos em plantas tratadas com glifosato pode reduzir a atratividade, forrageamento e defesas mediadas pela relação mutualística planta-inseto. Além disso, a viscosidade do néctar pode influenciar na preferência alimentar de formigas nectaríferas (Nicolson, 2007; Lois-Milevicich et al., 2021). Embora uma maior viscosidade possa favorecer um maior tempo de forrageamento e potencialmente maior proteção à planta portadora ne NEFs, viscosidades muito elevadas podem desmotivar as formigas devido a maior gasto metabólico durante a alimentação (Lois-Milevicich et al., 2021).

Os serviços ecossistêmicos associados aos NEFs não se restringem apenas à interação entre as formigas e plantas ao nível individual, mas se estendem ao nível de comunidade, por meio da facilitação da defesa indireta (Moura e Del-Claro, 2023; Staab et al., 2023). Plantas com NEFs beneficiam plantas vizinhas sem NEFs ao compartilhar serviço de proteção mediado por formigas patrulheiras e facilita o crescimento e o desenvolvimento dessas espécies (Moura e Del-Claro, 2023; Staab et al., 2023). Desse modo, em ambientes naturais, os danos promovidos pelo glifosato em espécies, como *J. princeps*, podem interferir indiretamente na defesa e desenvolvimento de plantas vizinhas. Nesse contexto, incentivamos futuras investigações com *J. princeps* para analisar a influência dos danos nos NEFs e alteração na qualidade do néctar na atração e forrageamento de formigas patrulheiras.

Apesar da redução do volume de néctar em plantas tratadas com o herbicida, o exsudado ainda estava disponível para insetos mutualistas como as formigas. O néctar é um recurso alimentar importante em ambientes tropicais e está relacionado à nutrição de muitos artrópodes (Nepi et al., 2018; Dias e Stefani, 2024). Embora neste estudo não investigamos a presença de resíduos de glifosato no exsudado dos NEFs, o acúmulo de resíduos de pesticidas no néctar é uma questão alarmante. Zioga et al., (2022) identificaram contaminação de néctar floral por resíduos de glifosato em plantas não alvo próximas de áreas agrícolas, sendo essa uma possível via de exposição para abelhas que podem levar a morte das mesmas pela contaminação. Apesar de alguns estudos recentes avaliarem o impacto de pesticidas em formigas, a maioria desses estudos se limita a avaliação de plantas de interesse agrícola e em espécies de ambiente temperado (Pohl et al., 2024). No entanto, o entendimento dos efeitos em plantas nativas e em espécies tropicais ainda são limitados.

Pesticidas sistêmicos como o glifosato, apresentam maior taxa de absorção, rápida translocação e níveis mais elevados de resíduos no néctar em comparação aos não sistêmicos (Li, 2022). Em termos de impacto ambiental, a contaminação do néctar de NEFs em plantas arbóreas, como *J. princeps*, pode ser especialmente mais danoso. Nos NEFs a produção de néctar é contínua e disponível por todo o período do ano, em contraste com nectários florais que produzem néctar apenas no período reprodutivo. Essa disponibilidade constante aumenta a probabilidade de contaminação de insetos, como formigas forrageiras. Alguns estudos com inseticidas sistêmicos demonstraram que as concentrações desses produtos são maiores em NEFs do que em NF (Zhou et al., 2022, 2023). Assim, futuras investigações devem avaliar a presença de resíduos do herbicida no néctar de NEFs de *J. princeps* e outras espécies arbóreas não alvo como possível via indireta de contaminação de recursos alimentares para insetos.

Os dados deste estudo corroboram o pressuposto de que NEFs são estruturas susceptíveis à poluentes ambientais e são úteis na avaliação de danos em plantas nativas (Silva et al., 2023; Rezende e Silva, 2024). O surgimento precoce de sintomas visuais como clorose, necrose, senescência, associados a danos anatômicos nos NEFs de *J. princeps* são potenciais biomarcadores da exposição ao glifosato. A análise dos NEFs, juntamente com parâmetros visuais e metabólicos de folhas, pode contribuir para detecção de danos promovidos pelo glifosato em plantas não alvo e contribuir com o biomonitoramento ambiental. Embora outros estudos tenham investigado biomarcadores morfoanatômicos e fisiológicos em folhas de plantas nativas expostas ao glifosato (Cruz et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2020; Araújo et al., 2025), os danos em NEFs ainda são pouco investigados.

Nosso estudo serve de base para futuras investigações sobre os impactos de herbicidas em plantas nativas, especialmente na avaliação de NEFs, uma vez que são importantes ao mediar interações e favorecer a sobrevivência das plantas (Heil, 2015; Delgado et al., 2017; Nepi et al., 2018). *Joannesia princeps* é um organismo modelo promissor para investigação do impacto de herbicidas e outros contaminantes ambientais sobre a anatomia e produção de néctar em NEFs, devido a facilidade no cultivo da espécie, alta responsividade a diferentes contaminantes, facilidade na coleta de néctar e amostras para processamento anatômico. Assim como os NEFs, outras estruturas secretoras, como tricomas glandulares, idioblastos, laticíferos, osmóforos e elaióforos, também desempenham papéis importantes na defesa e nas interações das plantas com outros organismos, favorecendo sua sobrevivência em diferentes ambientes (Dickison, 2000; Fahn, 2000; Crang et al., 2018; Tölke et al., 2020). Essas estruturas secretoras podem ser impactadas negativamente pelos herbicidas. Expandir as investigações para além dos NEFs permite compreender melhor os efeitos diretos e indiretos dos pesticidas nas plantas.

5. Conclusão

Tomados juntos, nossos resultados confirmam as hipóteses iniciais. Os NEFs de *J. princeps* são afetados negativamente pelo herbicida glifosato, inclusive em doses abaixo das utilizadas comumente em campo. O glifosato promove alterações morfoanatômicas, estruturais e ultraestruturais em NEFs de *J. princeps*. Visualmente, ocorreram necroses que evoluem para senescência e abscisão do NEFs. Alterações micromorfológicas, incluíram colapso e alteração na morfologia de células epidérmicas além de erosão de ceras epicuticulares. Estruturalmente, o herbicida promoveu colapso de tecidos de condução e tecidos secretores, formação de camada de abscisão, alteração no conteúdo das células secretoras atestados pelos testes histoquímicos e alterações ultraestruturais. A redução na produção e qualidade no néctar está associado diretamente com as alterações metabólicas e danos celulares induzidos pelo glifosato em *J. princeps*. Estes danos comprometem a atividade dos NEFs e podem diminuir as defesas indiretas pelas interações mediadas por essas estruturas secretoras.

Nosso estudo fornece, pela primeira vez, uma visão abrangente dos impactos estruturais e funcionais do herbicida glifosato em NEFs de uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica e suas possíveis implicações ecológicas. Futuras investigações devem envolver análise de campo e com outras espécies não alvo, especialmente plantas nativas e investigar a presença de resíduos de herbicida no néctar dos NEFs. Além disso, é importante ampliar as investigações para outros tipos de estruturas secretoras que podem atuar na defesa e interação com outros organismos.

Referências

- Alencar, C. L. D. S., Nogueira, A., Vicente, R. E., & Coutinho, Í. A. C. (2023). Plant species with larger extrafloral nectaries produce better quality nectar when needed and interact with the best ant partners. *Journal of Experimental Botany*, 74(15), 4613–4627. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad160>.
- Alves-Silva, E., & Del-Claro, K. (2013). Effect of post-fire resprouting on leaf fluctuating asymmetry, extrafloral nectar quality, and ant-plant-herbivore interactions. *Naturwissenschaften*, 100(6), 525–532. <https://doi.org/10.1007/s00114-013-1048-z>.
- Andrade, G.C., Castro, L.N., Silva, L.C. (2020). Micromorphological alterations induced by simulated acid rain on the leaf surface of *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae). *Ecological Indicators* 116: 106526. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106526>
- Araújo, H. H., Soares, G. D. D., Dias-Pereira, J., Silva, L. C., & Machado, V. M. (2024). Impact of saflufenacil and glyphosate-based herbicides on the morphoanatomical and development of

Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong (Fabaceae): New insights into a non-target tropical tree species. *Environmental Science and Pollution Research*, 31, 61254–61269. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-35223-4>.

Araújo, H. H., Marinato, C. S., Coelho, D. G., Oliveira, L. A., Oliveira, J. A., Clarindo, W. R., Freitas-Silva, L., & Silva, L. C. (2025). Multidimensional effects of a glyphosate-based herbicide on *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): Morphoanatomical, metabolic, and genotoxic biomarkers as indicators of damage in a non-target native tree species. *Journal of Hazardous Materials*, 492, 138038. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.138038>.

Baker, H. G., Opler, P. A., & Baker, I. (1978). A Comparison of the Amino Acid Complements of Floral and Extrafloral Nectars. *Botanical Gazette*, 139(3). <https://doi.org/10.1086/337008>.

Barbosa, V. D. C., Bächtold, A., Del-Claro, K., & Silva, E. A. (2025). Extrafloral nectary plants in Brazilian biomes: Dominance of Cerrado and Fabaceae. *Flora*, 323, 152668. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2024.152668>.

Bozzola J. J., & Russell, L. D. (1991). Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Jones and Bartlett Publishers.

Calixto, E. S., Lange, D., Bronstein, J., Torezan-Silingardi, H. M., & Del-Claro, K. (2021b). Optimal Defense Theory in an ant–plant mutualism: Extrafloral nectar as an induced defence is maximized in the most valuable plant structures. *Journal of Ecology*, 109, 167–178. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13457>.

Calixto, E.S.; Lange, D.; & Del-Claro, K. (2021a). Net benefits of a mutualism: Influence of the quality of extrafloral nectar on the colony fitness of a mutualistic ant. *Biotropica*, 53, 846–856. <https://doi.org/10.1111/btp.12925>.

Campbell, W. F., Evans, J. O., & Reed, S. C. (1976). Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. *Weed Science*, 24(1), 22–25. <https://doi.org/10.1017/S0043174500065346>.

Cavalcante, N. T., Câmara, T., Falcão, H. M., & Arnan, X. (2024). The extrafloral nectary traits of woody plants in Brazil's Caatinga: describing an ecological spectrum. *Biological Journal of the Linnean Society*, 143, blae090. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blae090>.

Crang, R., Lyons-Sobaski, S., & Wise, R. (2018). *Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants*. Springer Nature Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-77315-5>.

Cruz, C. E. S., Freitas-Silva, L., Ribeiro, C., & Silva, L. C. (2021) Physiological and morphoanatomical effects of glyphosate in *Eugenia uniflora*, a Brazilian plant species native to the Atlantic Forest biome. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 21334–21346. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12003-4>.

Del-Claro, K., Rico-Gray, V., Torezan-Silingardi, H. M, Alves-Silva, E., Fagundes, R., Lange, D., Dáttilo, W., Vilela, A. A., Aguirre, A., & Rodriguez-Morales, D. (2016). Loss and gains in ant–plant interactions mediated by extrafloral nectar: fidelity, cheats, and lies. *Insectes Sociaux*, 63, 207–221. <https://doi.org/10.1007/s00040-016-0466-2>.

- Delgado, M. N., Silva, L. C., Bão, S. N., Morais, H. C., & Azevedo, A. A. (2011). Distribution, structural and ecological aspects of the unusual leaf nectaries of *Calolisianthus species* (Gentianaceae). *Flora*, 206(2011), 676–683. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.11.016>.
- Delgado, M. N., Somavilla, N. S., Bão, S. N., & Rossatto, D. R. (2017). Testing the optimal defense hypothesis in *Stryphnodendron adstringens* (Fabaceae, Mimosoideae) leaves: The role of structure, number, position and nectar composition of extrafloral nectaries. *Plant Species Biology*, 32, 333–339. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12164>.
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and experimental botany*, 109, 212–228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>.
- Dias, K. P. O., & Stefani, V. (2024). Spider–Plant Interaction: The Role of Extrafloral Nectaries in Spider Attraction and Their Influence on Plant Herbivory and Reproduction. *Plants*, 13(3), 368. <https://doi.org/10.3390/plants13030368>.
- Dickison, W. C. (2000). *Integrative plant anatomy*. Academic Press.
- Fahn, A. (1979). Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *American Journal of Botany*, 66(8), 977–985. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/2442240>.
- Fahn, A. (2000). Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*, 31, 37–75. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(00\)31006-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(00)31006-0).
- Finley, J. W., Duke S. O. (2020). Agnes Rimando, a pioneer in the fate of glyphosate and its primary metabolite in plants. *J. Agric. Food Chem*, 68(20), 5623–5630. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00811>.
- Franz, J. E., Mao, M. K., & Sikorski, J. A. (1997). *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. American Chemical Society.
- Freitas-Silva, L., Araújo, H. H., Meira, R. M. S. A., Tanaka, F. A. O., & Silva, L. C. (2023). Morphoanatomy, histochemical and secretions process of extrafloral nectaries in *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae). *Flora*, 306, 152354. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2023.152354>.
- Freitas-Silva, L., Araújo, H. H., Meireles, C. S., & Silva, L.C. (2022). Plant exposure to glyphosate-based herbicides and how this might alter plant physiological and structural processes. *Botany*, 100(6), 473–480. <https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0033>.
- Freitas-Silva, L., Araújo, T. O., Nunes-Nesi, A., Ribeiro, C., Costa, A. C., & Silva, L. C. (2020). Evaluation of morphological and metabolic responses to glyphosate exposure in two neotropical plant species. *Ecological Indicators*, 113, 106246. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106246>.
- Fuchs, B., Laihonon, M., Muola, A., Saikkonen, K., Dobrev, P. I., Vankova, R., & Helander, M. (2022). A Glyphosate-Based Herbicide in Soil Differentially Affects Hormonal Homeostasis and Performance of Non-target Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 787958. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.787958>.
- Gulfishan, M., Jahan, A., Bhat, T. A., & Sahab, D. (2019). *Senescence Signalling and Control in Plants*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813187-9.00016-0>.

Heil, M. (2015). Extrafloral Nectar at the Plant-Insect Interface: A Spotlight on Chemical Ecology, Phenotypic Plasticity, and Food Webs. *Annual Review of Entomology*, 60: 213–232. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020753>.

Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). *The waterculture method for growing plants without soil*. California Agricultural Experiment Station. https://www.nutricaoeplantas.agr.br/site/downloads/hoagland_arnon.pdf.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (2023). *Relatórios de comercialização de agrotóxicos*. Ministério do Meio Ambiente e do Clima. <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 20 fev. 2025.

Johansen, D. A. (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill.

Keeler, K. H., Porturas, L.D, & Weber, M.G. (n. d.). World list of plants with extrafloral nectaries. www.extrafloralnectaries.org. Acesso em: 06 jun. 2025.

Khan, S., Zhou, J. L., Ren, L., & Mojiri, A. (2020). Effects of glyphosate on germination, photosynthesis and chloroplast morphology in tomato. *Chemosphere*, 258, 127350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127350>.

Kraus, J. E., & Arduin, M. (1997). *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR.

Külkamp, J. (2020). *Joannesia*. Flora do Brasil/Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17586>. Acesso em: 03 mar. 2021.

Kumar, S., Abedin, M. M., Singh, A. K., & Das, S. (2020). Role of Phenolic Compounds in Plant-Defensive Mechanisms. In Lone, R., Shuab, R., & Kamili, A. (Eds.), *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture* (pp. 517-532). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22.

Li, Z. (2022). Modeling pesticide residues in nectar and pollen in support of pesticide exposure assessment for honeybees: a generic modeling approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 236, 113507. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113507>.

Liu, S., Rao, J., Zhu, J., Li, G., Li, F., Zhang, H., Tao, L., Zhou, Q., Tao, Y., Zhang, Y., Huang, K., & Wei, C. (2023). Integrated physiological, metabolite and proteomic analysis reveal the glyphosate stress response mechanism in tea plant (*Camellia sinensis*). *Journal of Hazardous Materials*, 454(2023), 131419. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131419>.

McKey, D. (1974). Adaptive patterns in alkaloid physiology. *The American Naturalist* 108(961), 305–320. <https://doi.org/10.1086/282909>.

Melo, B. P., Carpinetti, P. D. A., Fraga, O. T., Rodrigues-Silva, P. L., Fioresi, V. S., de Camargos, L. F., & Ferreira, M. F. D. S. (2022). Abiotic stresses in plants and their markers: a practice view of plant stress responses and programmed cell death mechanisms. *Plants*, 11(9), 1100. <https://doi.org/10.3390/plants11091100>.

Mendes, K. F., Sousa, R. N., Lima, A. C., & Godoi, M. A., Jr. (2023). Understanding the Environmental Behavior of Herbicides: A Systematic Review of Practical Insights. In Mendes, K. F. (Ed.), *Pesticides - Agronomic Application and Environmental Impact*. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1002280>.

- Millán-Cañongo, C., Orona-Tamayo, D., & Heil M. (2014). Phloem sugar flux and jasmonic acid-responsive cell wall invertase control extrafloral nectar secretion in *Ricinus communis*. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 760–769. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0476-3>.
- Miranda, V. S., Gütlér, L. R., L., Dutra, S. C., Sobrinho, T. G., & Alves-Araújo, A. (2022). Extrafloral nectaries of an Atlantic Forest conservation area in Southeastern Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 36, e2021abb0187. <https://doi.org/10.1590/0102-33062021abb0187>.
- Moura, R. F., & Del-Claro, K. (2023). Plants with extrafloral nectaries share indirect defenses and shape the local arboreal ant community. *Oecologia*, 201, 73–82. <https://doi.org/10.1007/s00442-022-05286-6>.
- Moura, R. F., Silva, I. M., Silva, E. A., Colberg, E. M., Fagundes, R., Stefani, V. (2021). Biotic defenses against herbivory. In Del-Claro, K., & Torezan-Silingardi, H. M. (Eds.) *Plant–animal interactions* (pp. 93–118). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66877-8_5.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>.
- Nepi, M., Grasso, D. A., & Mancuso, S. (2018). Nectar in plant–insect mutualistic relationships: from food reward to partner manipulation. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1063. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01063>.
- Nepi M. (2007) Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson, S.W., Nepi, M., Pacini, E. (eds) Nectaries and nectar. *Springer*, Dordrecht, pp 129–166.
- Nicolson, S. W. (2022). Sweet solutions: nectar chemistry and quality. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377(1853), 20210163. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0163>.
- Nicolson, S.W., Thornburg, R.W. (2007). Nectar chemistry. In Nicolson, S.W., Nepi, M., & Pacini, E. (Eds.), *Nectaries and Nectar* (pp. 215–264). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5937-7_5.
- O'Brien, T. P., & McCully, M. E. (1981). *The study of plant structure: principles and selected methods*. Termarcaphi.
- Pacelhe, F. T., Costa, F. V., Neves, F. S., Bronstein, J., & Mello, M. A. R. (2019). Nectar quality affects ant aggressiveness and biotic defense provided to plants. *Biotropica*, 51(2), 196–204. <https://doi.org/10.1111/btp.12625>.
- Pohl, M., Hommen, U., Eilebrecht, S., Schäfers, C., Gadau, J., & Otto, M. (2024). Ants are no bees – Gaps in the assessment of relevant exposure routes to pesticides and plant incorporated protectants. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 6, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2024.02.001>.
- Pratyusha, S. (2022). Phenolic Compounds in the Plant Development and Defense. In Hasanuzzaman, M., & Nahar, K. (Eds.), *Plant Stress Physiology: Perspectives in Agriculture*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102873>.

- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque staining in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17(1), 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>.
- Rezende, F. P., & Silva, L. C. (2024). Morphoanatomical alterations in extrafloral nectaries of *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae), a native species of the Atlantic Forest, in response to simulated acid rain. *Flora*, 319, 152586. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2024.152586>.
- Sant'Anna-Santos, B. F., Duque-Brasil, R., Azevedo, A. A., Silveira, A. S., Araújo, J. M., & Aguiar, R. (2007). Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng.(Magnoliaceae). *Revista Árvore*, 31(4), 761–771. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622007000400022>.
- Silva, D. R., Souza, S. R., & Silva, L. C. (2023). Deterioration of extrafloral nectaries and leaf damages caused by air pollution in a Brazilian native species from the Atlantic Forest. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(15), 43505–43521. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25295-z>.
- Silva, L. C., Azevedo, A. A., Silva, E. A. M., & Oliva, M. A. (2000). Fluoride in simulated rain: symptomatology and effects on leaf structure and on growth of woody plants. *Braz. J. Bot.*, 23(4), 385–393. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042000000400004>.
- Silva, L. C., Azevedo, A. A., Silva, E. A. M., & 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*). *Australian Journal of Botany*, 53(8), 789–796. <https://doi.org/10.1071/bt04096>.
- Sindiveg - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. (2025). *Levantamento dos principais números do setor de defensivos agrícolas no Brasil: 2022–2023*. <https://sindiveg.org.br/mercado-total/>. Acesso em: 20 fev. 2025.
- Singh, S., Kumar, V., Datta, S., Wani, A. B., Dhanjal, D. S., Romero, R., & Singh, J. (2020). Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical monitoring, toxicity and degradation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 663–702. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00969-z>.
- Soares, C., Pereira, R., Martins, M., Tamagnini, P., Serôdio, J., Moutinho-Pereira, J., Cunha, A., & Fidalgo, F. (2020). Glyphosate-dependent effects on photosynthesis of *Solanum lycopersicum* L. — An ecophysiological, ultrastructural and molecular approach. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122871. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122871>.
- Staab, M., Pietsch, S., Yan, H., Blüthgen, N., Cheng, A., Li, Y., Zhang, N., Ma, K., & Liu, X. (2023). Dear neighbor: Trees with extrafloral nectaries facilitate defense and growth of adjacent undefended trees. *Ecology*, 104(7), e4057. <https://doi.org/10.1002/ecy.4057>.
- Sychta, K., Słomka, A., & Kuta, E. (2021). Insights into plant programmed cell death induced by heavy metals — Discovering a terra incognita. *Cells*, 10(1), 65. <https://doi.org/10.3390/cells10010065>.
- Thompson, H. M., Levine, S. L., Doering, J., Norman, S., Manson, P., Sutton, P., & von Mérey, G. (2014). Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integrated environmental assessment and management*, 10(3), 463–470. <https://doi.org/10.1002/ieam.1529>.

Tölke, E. D., Capelli, N. V., Pastori, T., Alencar, A. C., Cole, T. C. H., Demarco, D. (2020). Diversity of Floral Glands and Their Secretions in Pollinator Attraction. In Mérillon, J. M., & Ramawat, K. (Eds.), *Co-Evolution of Secondary Metabolites* (pp. 709–754). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_48.

Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A. M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L. A. J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliany, M., van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B., & Bozhkov, P. V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death & Differentiation*, 18, 1241-1246. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.36>.

Vaughn, K. C., & Duke, S. O. (1986). Ultrastructural effects of glyphosate on *Glycine max* seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 26(1), 56-65. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(86\)90062-3](https://doi.org/10.1016/0048-3575(86)90062-3).

Yamawo, A. (2021). Intraspecific competition favors ant–plant protective mutualism. *Plant Species Biology*, 36(3), 372–378. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12331>.

Zhou, H. -X., Cheng, M. -H., Pan, J. -L., Cui, P., Song, Y. -Q., Yu, Y., Cao, J., & Zha, H. -G. (2023). Residues of sulfoxaflo and its metabolites in floral and extrafloral nectar from *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Malvaceae) with or without co-application of tebuconazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 196, 105587. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105587>.

Zhou, H. -X., Milne, R. I., Cui, P., Gu, W. -J., Hu, M. -F., Liu, X. -Y., Song, Y. -Q., Cao, J., & Zha, H. -G. (2022). Comparing the contents, functions and neonicotinoid take-up between floral and extrafloral nectar within a single species (*Hemerocallis citrina* Baroni). *Annals of Botany*, 129(4), 429-441. <https://doi.org/10.1093/aob/mcac002>.

Zioga, E., White, B., & Stout, J. C. (2022). Glyphosate used as desiccant contaminates plant pollen and nectar of non-target plant species. *Heliyon*, 8(12), e12179. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12179>.

Zioga, E., White, B., & Stout, J. C. (2023). Pesticide mixtures detected in crop and non-target wild plant pollen and nectar. *Science of the Total Environment*, 879, 162971. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162971>.

Figuras

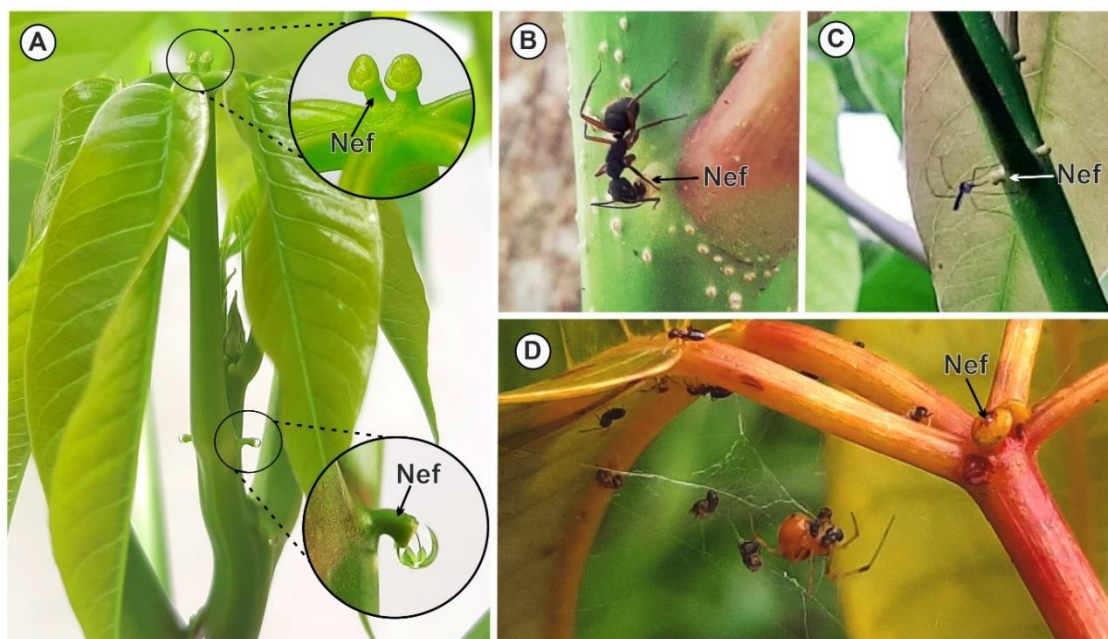


Figura 1 – Topografia dos nectários extraflorais (NEFs) de *Jonnesia princeps* e artrópodes associados em observações de campo forrageando os NEFs. Visão geral dos NEFs (A) no ápice (acropeciulares) e base (basipeciulares) do pecíolo. Formigas patrulheiras (B) e mosquito (C) nos NEFs caulinar. Formigas nos NEFs acropeciulares e aranha predando as formigas patrulheiras (D).

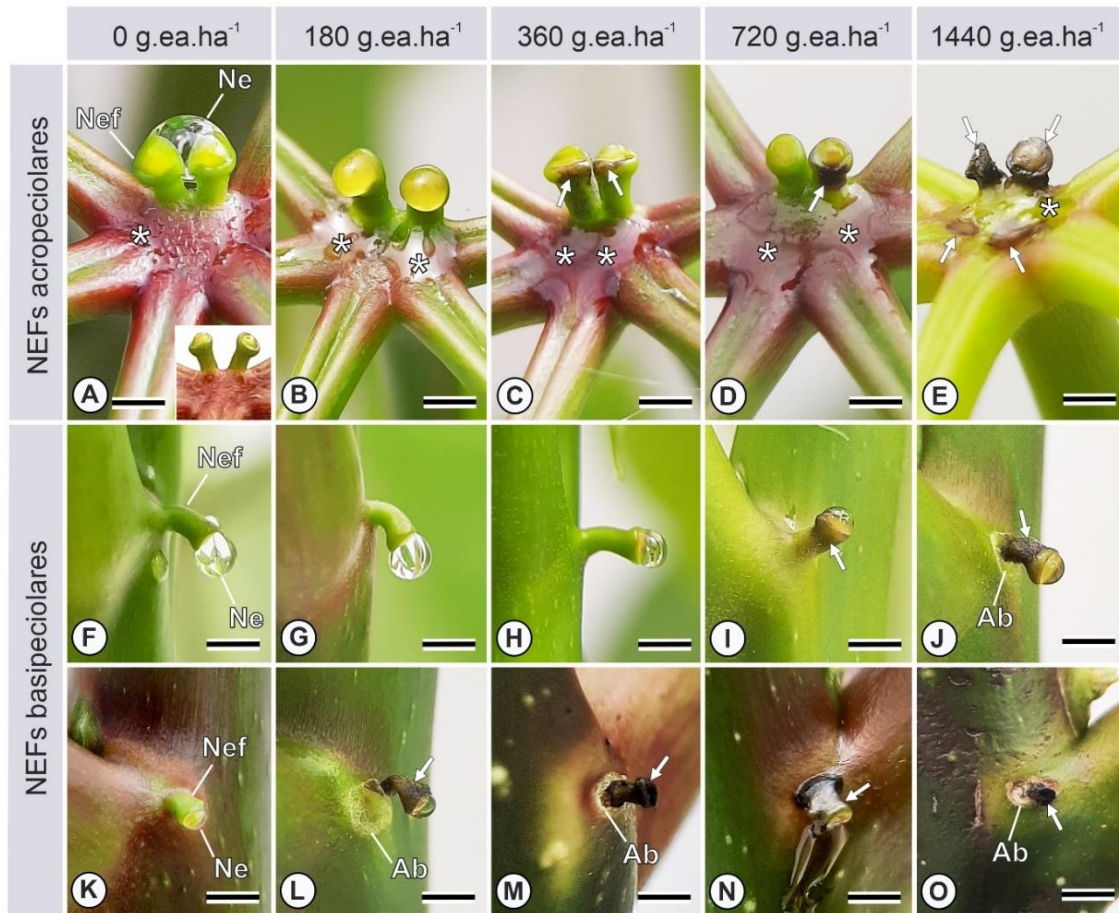


Figura 2 – Caracterização visual de danos em nectários extraflorais (NEFs) acropeciulares do terceiro né (A-E) e basipeciolar na região do terceiro nó (F-J) e região oitavo nó (K-O) em indivíduos de *Joannesia princeps*, 12 dias após a aplicação do herbicida à base de glifosato. Controle (A, F e K) em A, detalhe dos NEFs do oitavo nó. Doses de 180 g.e.a.ha⁻¹ (B, G e L), 360 g.e.a.ha⁻¹ (C, H e M), 720 g.e.a.ha⁻¹ (D, I e N) e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (E, J e O). Abreviações: Ab - área em processo de abscisão dos NEFs, Ne - gotas de néctar, Nef - nectário extrafloral, asterisco - acúmulo de néctar na base do nectário, setas brancas - áreas com lesão necrótica e escurecimento das estruturas. Barras: A-E (2mm) e F-O (2,5mm).

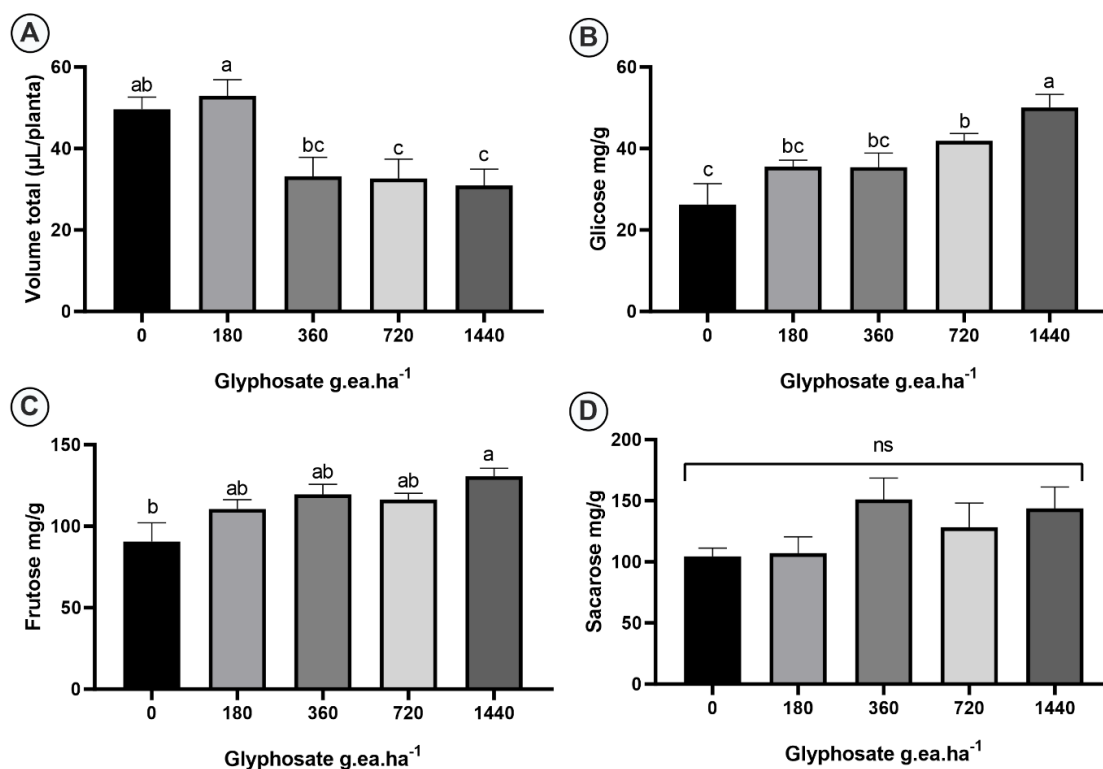


Figura 3 – Quantificação do volume de néctar (A) e tores de glicose (B), frutose (C) e sacarose (D) no néctar de nectários extraflorais em indivíduos de *Joannesia princeps*, 12 dias após a aplicação do herbicida à base de glifosato. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ns – sem diferença estatística significativa. Barras verticais representam o desvio padrão ($n=4$).

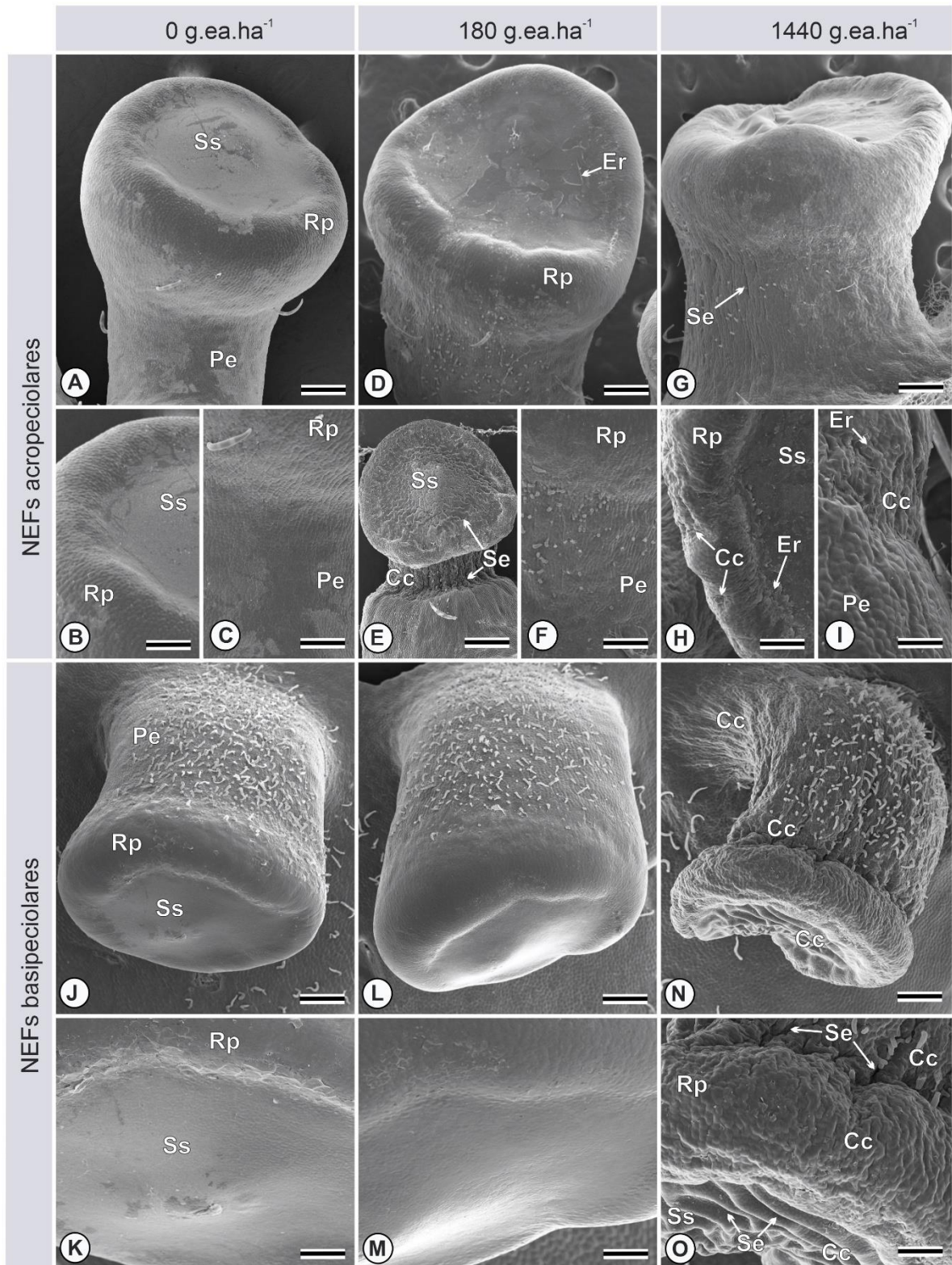


Figura 4 - Caracterização micromorfológica em microscopia eletrônica de varredura dos danos em nectários extraflorais (NEFs) acropeciolares (A-I) e basipeciolares (J-O) do terceiro nó em indivíduos de *Joannesia princeps*, 12 dias após a aplicação do herbicida à base de glifosato. Controle (A-C e J-O). Doses de 180 g.e.a.ha⁻¹ (D-F e L-M) e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (G-I e N-O). Abreviações: Cc - colapso celular, Er - erosão das ceras epicuticulares, Pe - pedúnculo, Rp -

região periférica da superfície secretora, Se - sulco epidérmico, Ss - superfície secretora. Barras: A, D, G, J, I e N (200 μ m); B, C, F e H (100 μ m); E (250 μ m); K, M e O (125 μ m).

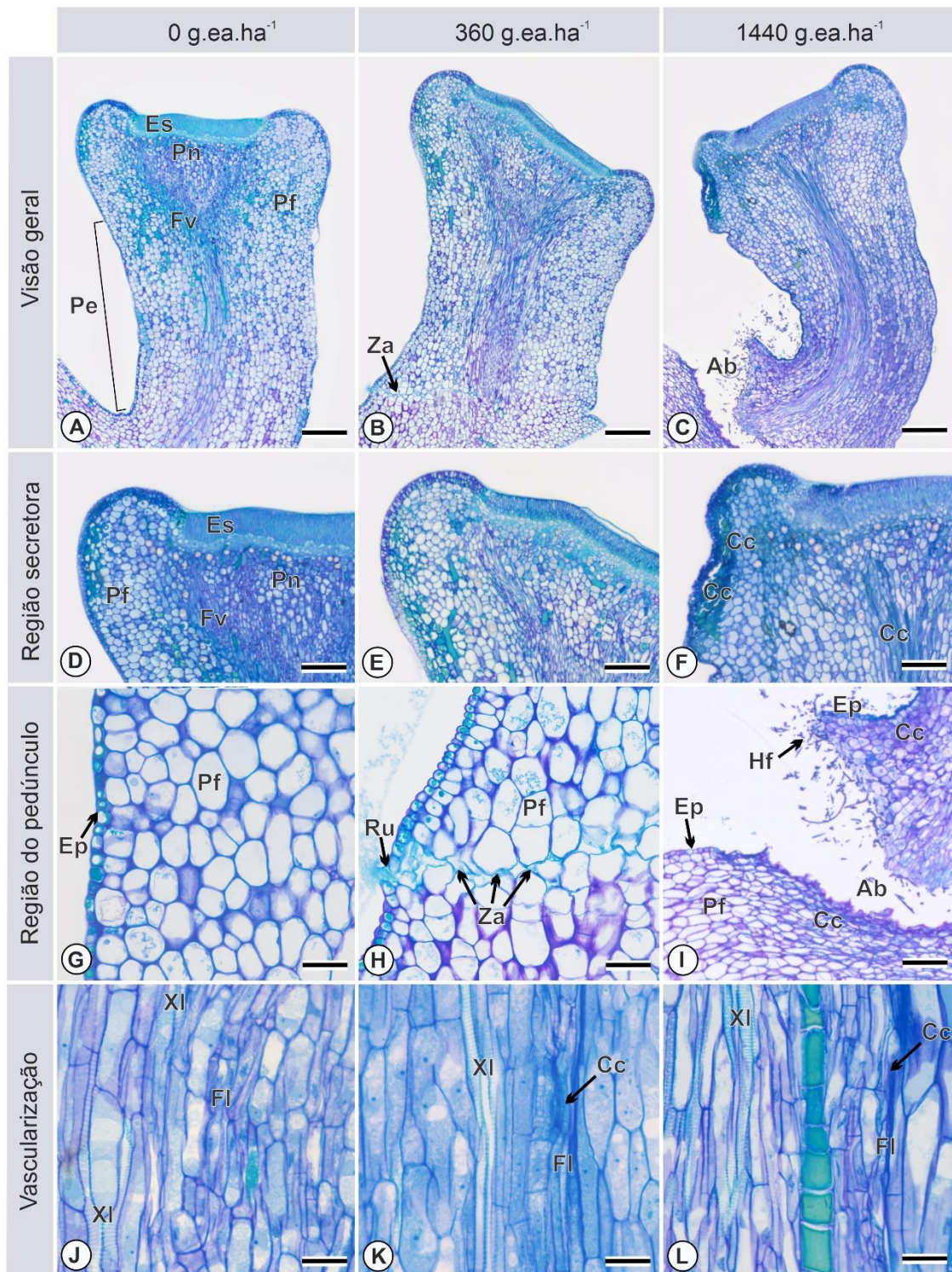


Figura 5 - Caracterização anatômica em microscopia de luz dos nectários extraflorais (NEFs) acropioclulares (B, E, H e K) e basipecioclulares (A, D, G, J, C, F, I e L) do terceiro nó em indivíduos de *Joannesia princeps*, 12 dias após a aplicação do herbicida à base de glifosato. Visão geral (A-C), região secretora (D-F), região do pedúnculo (G-I) e vascularização (J-L). Controle (A, D, G e J). Doses de 360 g.e.a.ha⁻¹ (B, E, H e K) e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (C, F, I e L). Abreviações: Ab - área de abscisão, Cc - colapso celular, Ep - epiderme, Es - epiderme

secretora, Fl - floema, Fv - feixes vasculares, Hf - hifas fúngicas, Pe - pedúnculo, Pf - parênquima fundamental, Pn - parênquima nectarífero, Ru - ruptura da epiderme, Xl - xilema, Za - zona de abscisão. Barras: Barras: A-C (225µm); D-F (125 µm); G-I (50µm); J-L (55µm).

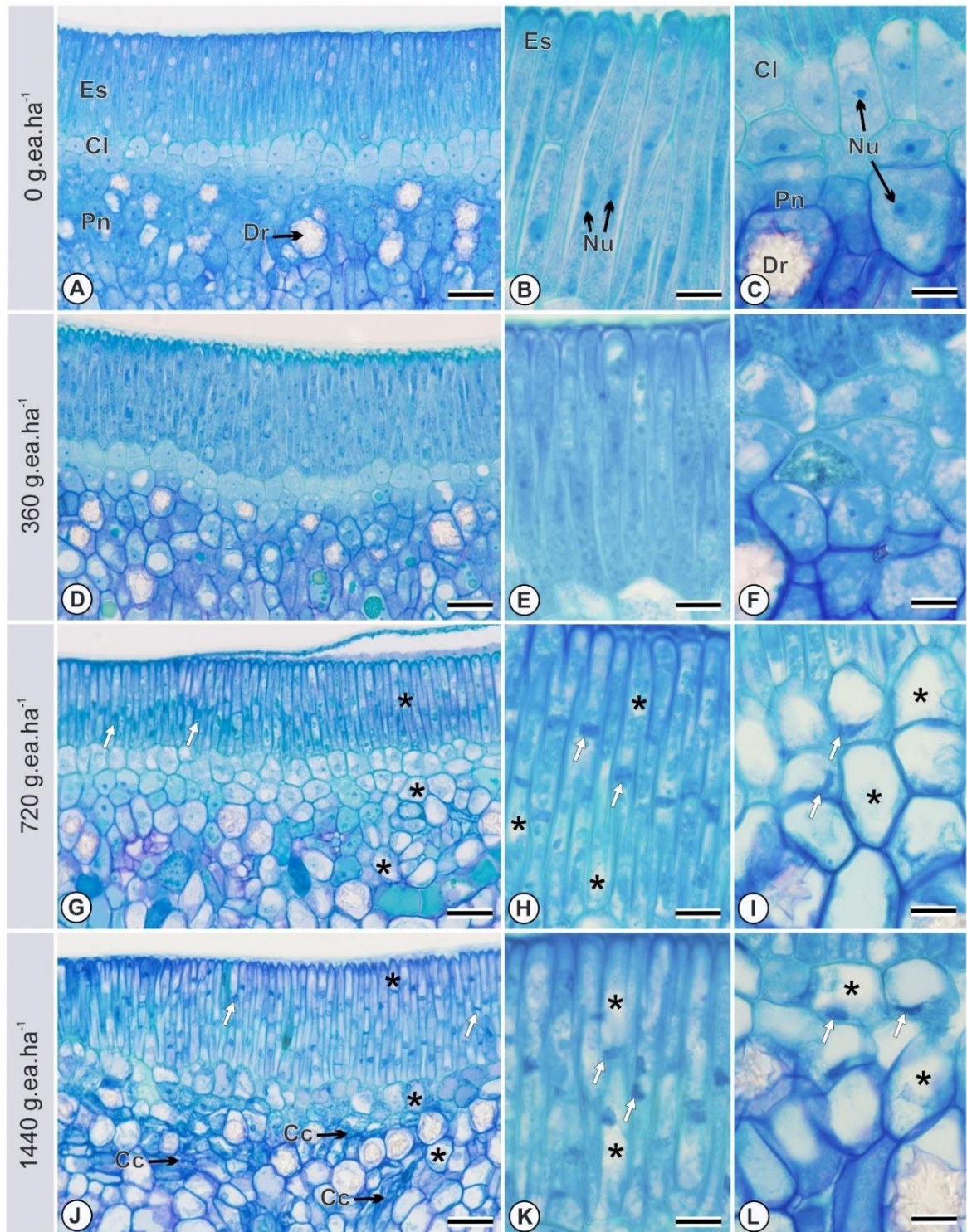


Figura 6 - Caracterização anatômica em microscopia de luz da superfície secretora dos nectários extraflorais (NEFs) acropetiolares do terceiro nó em indivíduos de *Joannesia princeps*, 12 dias após a aplicação do herbicida à base de glifosato. Visão geral (A, D, G e J), detalhe da epiderme secretora (B, E, H e K) e detalhe do parênquima nectarífero (C, F, I e L). Controle (A-C). Doses de 360 g.e.a.ha⁻¹ (D-F), 720 g.e.a.ha⁻¹ (G-I) e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (J-L).

Abreviações: Cc - colapso celular, Cl - camada limítrofe, Dr - drusa, Es - epiderme secretora, Nu - núcleo, Pn - parênquima nectarífero, asterisco - células com citoplasma pouco denso e seta branca - citoplasma compactado em processo de senescência celular. Barras: A, D, G e J (50µm); B, C, E, F, H, I, K e L (10µm).

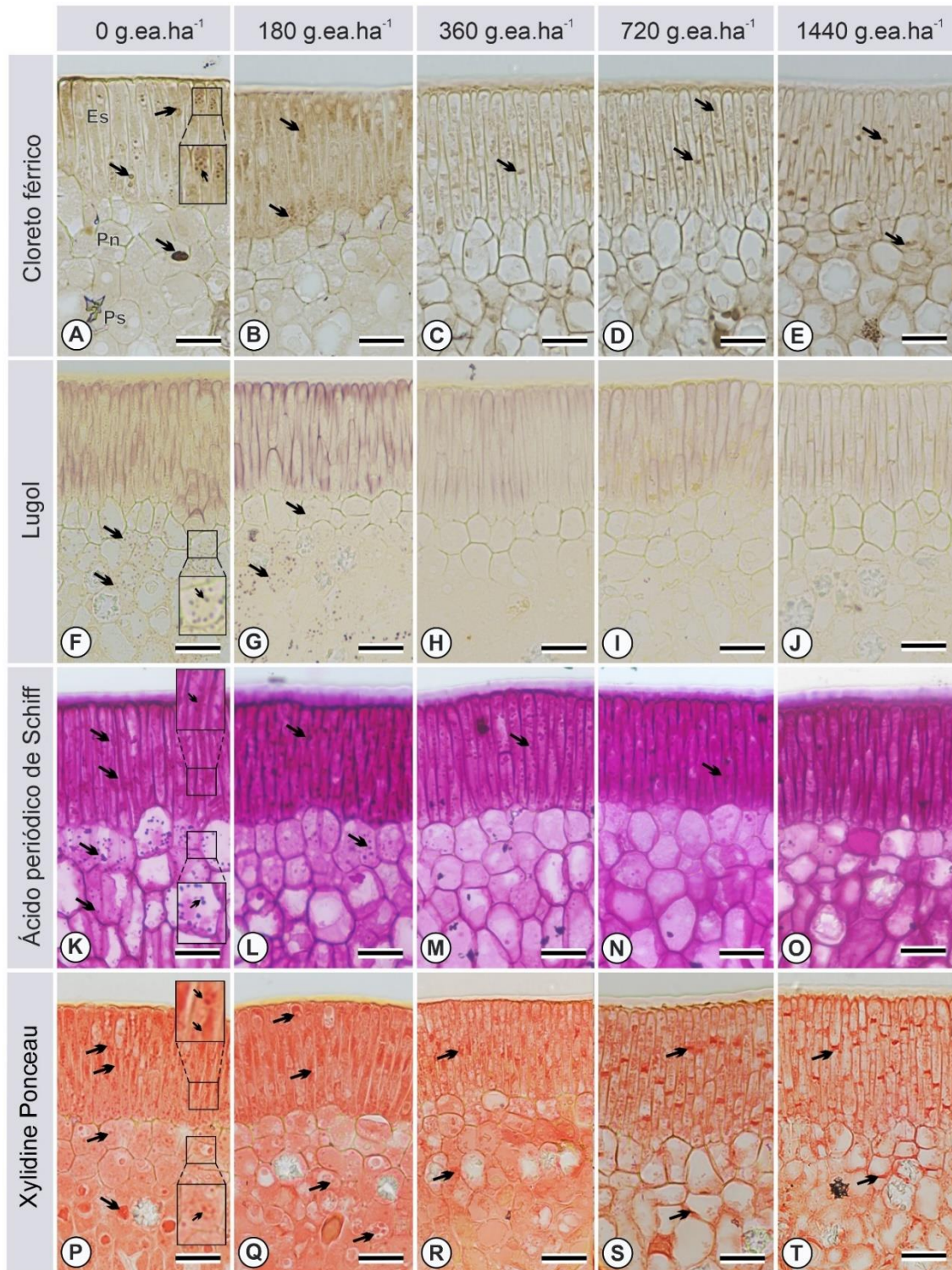


Figura 7 - Caracterização histoquímica em microscopia de luz da superfície secretora dos nectários extraflorais (NEFs) acropetiolares do terceiro nó em indivíduos de *Joannesia princeps*, 12 dias após a aplicação do herbicida à base de glifosato. Controle (A, F, K e P).

Doses de 180 (B, G, L e Q), 360 g.e.a.ha⁻¹ (C, H, M e R), 720 g.e.a.ha⁻¹ (D, I, N e S) e 1440 g.e.a.ha⁻¹ (E, J, O e T). Reação com cloreto férrico (A-E) para detecção de compostos fenólicos não estruturais, corados de marrom / castanho. Reação com Lugol (F-J) para detecção de amido, corados de preto / roxo. Reação com ácido periódico de Schiff - PAS (K-O) para detecção de polissacarídeos neutros, corados em magenta. Reação com Xilidine Ponceau (P-T) para detecção de proteínas, coradas de vermelho / laranja. Abreviações: Es - epiderme secretora, Pn - parênquima nectarífero, seta preta - locais com reação positiva para a respectiva classe de compostos analisada. Barras: A-T (25µm).

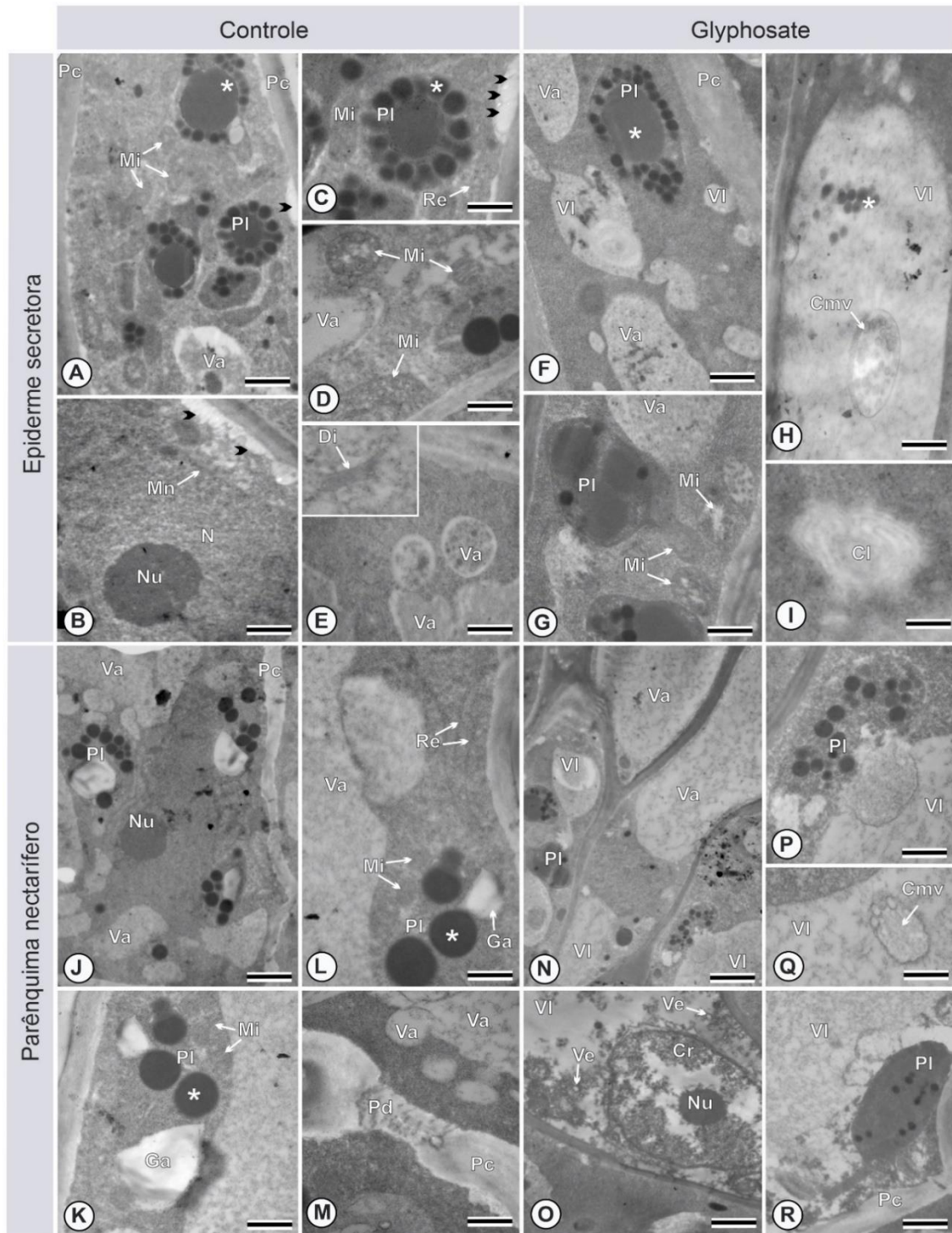


Figura 8 - Caracterização ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão da porção secretora dos nectários extraflorais (NEFs) em indivíduos de *Joannesia princeps*, 12 dias após a aplicação do herbicida à base de glifosato. Controle (A – E, J – M). Dose de 1440 g.e.a.ha⁻¹ (F – I, N – R). Região da epiderme secretora (A – I) e parênquima nectarífero (J – R). Abreviações: Cr – cromatina com aspecto granular, Cmv - conteúdo multivesicular, Di – dictiossomo, Ga - grão de amido, Mi - mitocôndria, Mn - membrana nuclear, N – núcleo, Nu - nucléolo, Pc - parede celular, Pd – plasmodesmos, PI - plastídios, Re - retículo endoplasmático, Va - vacúolo, Ve – vesículas, VI - vacúolo lítico, Asterisco – conteúdo elétron denso em plastídios ou vacúolo. Barras: A, B, F, J, R e O (1µm), C-E, H, K-M, P e Q (500nm), I (250 nm) e N (2 µm).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados confirmam que o glifosato promove alterações multidimensionais em espécies nativas do Cerrado e da Mata Atlântica. Em *Enterolobium contortisiliquum*, os efeitos do herbicida não se restringem à porção aérea, mas se estendem também ao sistema radicular, comprometendo a interação entre raízes e folhas e afetando processos metabólicos como a assimilação de CO₂, balanço de açúcares, aminoácidos e proteínas. Esses achados reforçam a relevância de integrar avaliações de estruturas subterrâneas em estudos com plantas não alvo. Em *Cochlospermum regium*, verificamos que o glifosato altera o desenvolvimento inicial de gemas e botões florais, atrasando a floração, e alterando estruturas secretoras como tricomas, laticíferos e idioblastos, o que pode impactar diretamente o sucesso reprodutivo da espécie. Em *Joannesia princeps*, demonstramos que os nectários extraflorais são sensíveis ao herbicida, apresentando danos estruturais, histoquímicos e ultraestruturais que reduziram a produção e a qualidade do néctar, podendo comprometer a defesa mediada por essas estruturas e ser uma possível via de contaminação para artrópodes consumidores de néctar. Desse modo, este estudo ampliou a literatura sobre os efeitos do glifosato ao revelar impactos diretos e indiretos em diferentes dimensões (fisiológica, metabólica, estrutural, reprodutiva e na defesa) em espécies não alvo, nativas tropicais. Os resultados evidenciam a necessidade do manejo adequado de herbicidas e fornecem subsídios para políticas públicas para preservação de remanescentes de vegetação nativa que pode ser afetada negativamente por herbicidas como o glifosato, especialmente em ecossistemas com alta biodiversidade como Cerrado e Mata Atlântica.