

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

HUGO HUMBERTO DE ARAÚJO

**EFEITOS MORFOANATÔMICOS, METABÓLICOS E GENOTOXICIDADE DO
HERBICIDA GLIFOSATO EM *Joannesia princeps* Vell. (EUPHORBIACEAE):
CONTRIBUIÇÕES PARA O BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

HUGO HUMBERTO DE ARAÚJO

**EFEITOS MORFOANATÔMICOS, METABÓLICOS E GENOTOXICIDADE DO
HERBICIDA GLIFOSATO EM *Joannesia princeps* Vell. (EUPHORBIACEAE):
CONTRIBUIÇÕES PARA O BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL**

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

Orientadora: Luzimar Campos da Silva

Coorientadora: Larisse de Freitas Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

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

T

A663e
2021

Araújo, Hugo Humberto de, 1997-
Efeitos morfoanatômicos, metabólicos e genotoxicidade do
herbicida glifosato em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae)
: contribuições para o biomonitoramento ambiental / Hugo
Humberto de Araújo. – Viçosa, MG, 2021.
69 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luzimar Campos da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Pesticidas. 2. Folhas - Anatomia. 3. Histoquímica. 4.
Biomarcadores. 5. Mata Atlântica. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.69148

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fatima Alves CRB6/2578


HUGO HUMBERTO DE ARAÚJO

**EFEITOS MORFOANATÔMICOS, METABÓLICOS E GENOTOXICIDADE DO
HERBICIDA GLIFOSATO EM *Joannesia princeps* Vell. (EUPHORBIACEAE):
CONTRIBUIÇÕES PARA O BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL**

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

APROVADA: 18 de maio de 2021.

Assentimento:



Hugo Humberto de Araújo
Autor



Luzimar Campos da Silva
Orientadora

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos,
pelo apoio e amor incondicional.
A todos os pesquisadores brasileiros
que fazem ciência em meio às
condições mais adversas.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Botânica pela infraestrutura e oportunidade de desenvolver esta pesquisa. Ao CNPq, pelo aporte financeiro e pela concessão da bolsa de mestrado que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos meus pais José e Everalda, por me darem a oportunidade de estudar e por sempre acreditarem nos meus sonhos e, acima de tudo, por sonharem comigo. Obrigado pelos ensinamentos, pelos valores, pela compressão e por sempre estarem presentes na minha vida mesmo estando um pouquinho longe. Obrigado pelas mensagens diárias e pontuais que sempre proveram uma dose diária de ânimo e motivação. E aos meus irmãos de sangue Tiago e Carla e os de coração Karina e Flávio por todo carinho e apoio e por se fazerem presentes mesmo estando distantes, vocês me inspiram. Aos meus sobrinhos João Vítor, Felipe, Maria Luiza e Emanuely, por todo amor e carinho com o “dinho Hugo”.

Aos meus professores da graduação, os quais sempre foram uma fonte de inspiração e conhecimento, e que possibilitaram que o tão sonhado mestrado acontecesse. Em especial agradeço aos professores Vinícius, Lorryne, Norma e Amanda do UNIPAM e a professora Jaqueline Dias da UFV- Rio Paranaíba, pela amizade, pelo apoio e ensinamentos botânicos que me permitiram alcançar o mestrado.

À professora Luzimar Campos, pela amizade, por todo carinho e pela fantástica orientação. Agradeço pela confiança, pelas oportunidades e acima de tudo por acreditar no meu trabalho. Obrigado por transmitir essa sua alegria contagiante e pelo incentivo a desenvolver este trabalho mesmo diante das dificuldades. Você é uma inspiração como pessoa, pesquisadora, professora e orientadora. Serei eternamente grato pela sua amizade e seus ensinamentos, Luzimar!

À professora Larisse Freitas, pela coorientação e por todo cuidado e brilhantes contribuições neste trabalho. Obrigado por participar ativamente de cada etapa mesmo estando “distante”, por todos os conselhos, dicas, puxões de orelha e por compartilhar humildemente seus conhecimentos.

Ao professor Wellington Clarindo, do laboratório de Citogenética e Citometria de Fluxo da UFV, por abrir as portas do seu laboratório e pelo auxílio imensurável das análises de citogenotoxicidade, pelas discussões e considerações sobre o trabalho. Agradeço também a Jéssica e Nathália por todo apoio no laboratório e auxílio no processamento do material.

Às professoras Renata Meira e Aristéa Azevedo, pelos preciosos ensinamentos nas disciplinas que contribuíram na minha formação e por serem exemplos de amor à pesquisa e ao ensino. Sou muito grato por todas as oportunidades e experiências que permitiram expandir meus conhecimentos e também pelos bons momentos de convivência ao longo desses dois anos.

Aos técnicos da UFV, por todo apoio e suporte na execução deste trabalho. Em especial, a Aurora e Rosana, técnicas do Laboratório de Anatomia Vegetal, sempre dispostas a esclarecer dúvidas e ajudar prontamente, mesmo que de maneira remota. Ao Júlio Reiz, do departamento de Fitotecnia da UFV, que gentilmente se dispôs a aplicar o herbicida. Ao Claudedir, da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), por todo o suporte e auxílio durante o experimento em casa de vegetação.

Aos “meninos” do professor Juraci, em especial Cláudio, Daniel e Vinícius pelo apoio e auxílio nas análises bioquímicas. Obrigado pelos ensinamentos, prontidão em ajudar e me permitirem utilizar o laboratório de vocês. Desejo muito sucesso e sou grato a cada um de vocês.

Ao Leonardo Araújo (Léo), que prontamente se dispôs a ajudar nas análises com o IRGA e que sempre nos socorria quando o fotomicroscópio estava “estranho”. Muito obrigado por tudo Léo, te desejo todo sucesso no mundo!!

Ao Danizete, pelo companheirismo e empatia nessa jornada desde o início do mestrado. Sou muito grato pela parceria nas disciplinas, estudos em grupo, na preparação de seminários e aulas de estágio em ensino. Obrigado pela confiança, amizade genuína (um verdadeiro irmão que fiz em Viçosa) e pelas bebidas que sempre terminavam em momentos filosóficos. Serei eternamente grato meu amigo!

Aos colegas do “Grupo de estudos da Luzimar” composto pelos “irmãozinhos” de orientação: Daniel, Michel, Thamires, Franklin, Camila, Esneider, Graciele, Bruna, Adriana e Iara e coordenado pela Prof^a. Luzimar. Obrigado pelo apoio e acolhimento em Viçosa e na UFV e pelas reuniões semanais (virtuais), um momento leve de partilhar conhecimentos e conversar sobre ciência e sobre a vida. Obrigado por todo apoio e por sempre estarem disponíveis quando precisei. Obrigado pelo auxílio na coleta e processamento do material, por tirar dúvidas sobre protocolos e se disporem a contribuir com sugestões, questionamentos e compartilhando experiências. Com certeza, o melhor grupo de pesquisas da UFV!

Ao seletto grupo “quarenteners” que mesmo durante a pandemia trabalharam firmemente no Laboratório de Anatomia e se prontificaram a auxiliar sempre que precisei. Agradeço, em especial, a Analú, Elienai, Danizete e Rafael (que as vezes chegava tarde, mas chegava rrsr)

pela excelente convivência, pelos cafezinhos pontuais e filosóficos que tornaram tudo muito mais leve e pela troca de experiências.

Aos demais amigos do laboratório de Anatomia Vegetal e todos que por lá passaram e que tive a oportunidade conhecer e conviver. Agradeço pelos momentos descontraídos e alegres no cafezinho, pelas conversas sobre a vida e sobre a pesquisa e pela companhia no almoço em grupo no RU. E por fim, mas não menos importante, agradeço pelos encontros no Arte e sabor e no Távola, momentos leves, regado a chope e risadas. Guardo ótimas lembranças desses momentos!

Aos colegas das repúblicas por onde passei “Casa do estudante” e “Agora vai”, pelos bons momentos e acolhimento em Viçosa.

Aos os amigos “antigos” e “novos”, os quais contribuíram das mais diversas maneiras para que este momento fosse mais leve e se tornasse possível.

A pesar dos tempos difíceis nunca estive só nessa jornada do mestrado. Esse trabalho, com certeza, tem a contribuição de cada um de vocês, que direta ou indiretamente possibilitaram que tudo isso acontecesse. Sem vocês essa experiência não teria sido tão enriquecedora, completa e transformadora em minha vida.

A todos, o meu carinho e meu muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Num país como o Brasil, manter a esperança
viva é em si um ato revolucionário.”*

(Paulo Freire)

RESUMO

ARAÚJO, Hugo Humberto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Efeitos morfoanatômicos, metabólicos e genotoxicidade do herbicida glifosato em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): contribuições para o biomonitoramento ambiental.** Orientadora: Luzimar Campos da Silva. Coorientadora: Larisse de Freitas Silva.

O glifosato é o herbicida mais utilizado em escala global. No entanto, seu uso pode impactar espécies não-alvo em áreas de vegetação nativa. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas promovidas pelo glifosato em folhas e caule de *J. princeps*, buscando identificar biomarcadores úteis no monitoramento ambiental. Para tal, mudas de *J. princeps* com três meses de idade (n=4) foram expostas a aplicação aérea de glifosato (RoundUp Original® DI) nas doses de 0, 180, 360, 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹. Decorridos 12 dias após a aplicação, foram feitas análises visuais, análises de trocas gasosas, pigmentos fotossintéticos, quantificação de ácido chiquímico, peroxidação lipídica, enzimas antioxidantes, ensaio cometa, morte celular *in situ* e anatomia em folhas e caules. Visualmente, em folhas de plantas expostas ao glifosato, ocorreram cloroses, encarquilhamentos, redução na expansão foliar e necroses, e em caules ocorreram manchas escuras e ranhuras superficiais. Houve o aumento no teor de ácido chiquímico, redução da assimilação de CO₂ (A), da condutância estomática (gs), da transpiração foliar (E) e do teor de clorofilas *a*, *b* e total. Ocorreu estresse oxidativo promovendo aumento da peroxidação lipídica e das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX). O glifosato promoveu genotoxicidade dose-dependente e morte celular em todas as doses. Anatomicamente, em folhas, ocorreu o colapso de células epidérmicas, retração do protoplasto, formação de tecido de cicatrização, redução visual de espaços intercelulares, alterações nos cloroplastos acompanhados de redução de amido, surgimento de projeções de parede celular, aumento de compostos fenólicos, alteração nos tecidos de condução. Nos caules ocorreram colapso de células epidérmicas, alterações no câmbio vascular e nos tecidos de condução. Estes resultados demonstram que *J. princeps* foi sensível ao glifosato, que promoveu alterações mesmo na ausência dos danos visuais. Os biomarcadores identificados em *J. princeps* foram úteis na avaliação de danos promovidos pelo glifosato. Em adição, *J. princeps* é uma espécie promissora em estudos de biomonitoramento de glifosato no ambiente.

Palavras-chave: Biomarcadores. Mata Atlântica. Pesticida.

ABSTRACT

ARAÚJO, Hugo Humberto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2021. **Morphological, metabolic, and genotoxic effects of herbicide glyphosate in *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): contributions for environmental biomonitoring.** Adviser: Luzimar Campos da Silva. Co-adviser: Larisse de Freitas Silva.

Glyphosate is the most widely used herbicide globally. However, its use can affect non-target species in areas of native vegetation. This study aimed to evaluate the responses promoted by glyphosate in leaves and stems of *J. princeps* to identify useful biomarkers for environmental monitoring. For this, seedlings of *J. Princeps* with three-month-old ($n = 4$) were exposed to aerial application of glyphosate (RoundUp Original® DI) at doses of 0, 180, 360, 720 e 1440 g a. e. ha⁻¹. Visual analyzes, gas exchange analyzes, photosynthetic pigments, quantification of shikimic acid, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, comet assay, cell death in situ, and anatomy in leaves and stems were performed 12 days after application. Visually, on leaves of plants exposed to glyphosate, chlorosis, shriveling, reduction in leaf expansion and necrosis occurred. On the stems, dark spots and superficial furrows occurred. There was an increase in the content of shikimic acid, reduction in the assimilation of CO₂ (A), stomatal conductance (gs), leaf transpiration (E), and a, b, and total chlorophyll content. Glyphosate promotes oxidative stress resulting in increased lipid peroxidation and activities of the superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POX) enzymes. Glyphosate promoted dose-dependent genotoxicity and cell death in all doses. Anatomically, in leaves, there was the collapse of epidermal cells, protoplast retraction, formation of scar tissue, visual reduction of intercellular spaces, changes in chloroplasts, reduction of starch, appearance of cell wall projections, increase in phenolic compounds, and change in conduction tissues. These results demonstrate that *J. princeps* was sensitive to glyphosate and that changes occur even in the absence of visual damage. The biomarkers identified in *J. princeps* were useful in evaluation of damages caused by glyphosate. In addition, *J. princeps* is a promising species in studies of glyphosate biomonitoring in the environment.

Keywords: Atlantic Forest. Biomarkers. Pesticide.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO I - Biomarcadores morfoanatômicos na diagnose e prognose da fitotoxicidade do glifosato em <i>Joannesia princeps</i> Vell. (Euphorbiaceae)	18
Resumo	18
Destaques	18
1 Introdução	19
2 Materiais e métodos	20
<i>Condições de cultivo</i>	20
<i>Aplicação dos tratamentos</i>	21
<i>Caracterização visual</i>	21
<i>Caracterização estrutural em microscopia de luz e histoquímica</i>	21
3 Resultados	23
<i>Caracterização visual</i>	23
<i>Caracterização estrutural e histoquímica</i>	24
4 Discussão	26
Conclusão	29
Referências	30
Figuras	35
CAPÍTULO II - Alterações metabólicas e dano no genoma promovidos por glifosato em folhas de <i>Joannesia princeps</i> Vell. (Euphorbiaceae): contribuições para o monitoramento ambiental	42
Resumo	42
Destaques	43
1 Introdução	43
2 Materiais e métodos	45
<i>Condições de cultivo e aplicação do herbicida</i>	45
<i>Quantificação de ácido chiquímico</i>	46
<i>Medição de trocas gasosas</i>	46
<i>Quantificação de pigmentos fotossintéticos</i>	47
<i>Peroxidação lipídica</i>	47
<i>Ensaio enzimáticos</i>	47

<i>Ensaio cometa</i>	48
<i>Localização in situ de morte celular</i>	49
<i>Análise estatística</i>	49
3 Resultados	50
4 Discussão	51
Conclusão	55
Referências	55
Figuras	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

INTRODUÇÃO GERAL

O alto nível tecnológico da agricultura no Brasil tornou o país um dos maiores produtores mundiais de alimentos. No entanto, para garantir alta produtividade a agricultura contemporânea faz uso crescente de pesticidas, com destaque para os herbicidas. O Brasil é um dos quatro maiores consumidores de pesticidas do mundo, junto aos Estados Unidos, União Europeia e China (Donley, 2019). No país, apenas em 2020 foram registrados 493 novos pesticidas, dos quais 394 (79,9%) são classificados como produtos perigosos, muito perigosos ou altamente perigosos para o meio ambiente (MAPA, 2020).

Dentre os herbicidas, o glifosato [N- (fosfometil) glicina] é o ingrediente ativo mais comercializado no Brasil e o mais utilizado mundialmente (IBAMA, 2020). Este herbicida é classificado como um herbicida não-seletivo, sistêmico e pertence ao grupo das glicinas substituídas (Franz, 1985). Após a aplicação na porção aérea de plantas daninhas, o glifosato é absorvido através da cutícula e translocado principalmente pelo floema, no fluxo dos fotoassimilados para tecidos de reserva e em desenvolvimento, como folhas jovens e ápices caulinares e radiculares (Gomes et al., 2014; Singh et al., 2020). O mecanismo de ação do glifosato reside na inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), atuando diretamente na rota do ácido chiquímico (Finley & Duke, 2020). Consequentemente, ocorre interferência na síntese de triptofano, fenilalanina e tirosina, aminoácidos essenciais na constituição de proteínas e que são precursores na biossíntese de compostos secundários, incluindo vitaminas, lignina e hormônios vegetais (Ghisi e Cestari, 2013; Gomes et al., 2014).

Em regiões onde há adoção do controle químico, deriva de herbicidas têm sido constantes, sendo uma das principais causas de perda destes produtos na agricultura moderna (Cunha, 2008). A deriva ocorre quando parte da pulverização de herbicidas desvia da área de aplicação e atinge áreas não-alvo (Rezende-Silva et al. 2019). Dessa forma, os herbicidas, principalmente os não-seletivos como aqueles à base de glifosato, podem ocasionar danos tanto à cultura quanto à vegetação de áreas próximas ao local de aplicação (Hasanuzzaman et al., 2020; Freitas-Silva et al., 2021). No entanto, efeitos do glifosato em espécies não agricultáveis foram explorados em poucos estudos (Rezende-Silva et al., 2019; Freitas-Silva et al., 2020; Freitas-Silva et al. 2021).

O monitoramento ambiental utilizando espécies vegetais tem se mostrado um método chave na compreensão do efeito de xenobióticos em plantas não-alvo. A identificação de espécies bioindicadoras pode levar em consideração respostas em nível bioquímico,

fisiológico, morfoanatômico e citogenotóxico à exposição aos agentes contaminantes, permitindo a indicação de biomarcadores do estresse (Rocha et al., 2013; Rai, 2016; Piasecki et al., 2019).

Herbicidas à base de glifosato pode promover alterações em processos fisiológicos relacionados a redução da taxa fotossintética, inibição da assimilação de CO₂; inibição da biossíntese de clorofila e outros pigmentos, diminuição da condutância estomática, distúrbios nutricionais e metabólicos (Gomes et al., 2014; Gomes et al., 2016; Zhong et al., 2018; Freitas-Silva et al., 2020). O glifosato também pode desencadear estresse oxidativo, devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, podendo acarretar danos celulares (Foyer & Noctor, 2011; Gomes et al., 2014). Nesse contexto, os sistemas antioxidativos enzimáticos (por exemplo SOD, CAT, APX, GPX e GR) e não enzimáticos (por exemplo ascorbato e glutatona) são importantes para evitar ou diminuir os danos oxidativos (Foyer e Noctor, 2011; García-Caparrós et al., 2020; Freitas-Silva et al., 2020).

A investigação de parâmetros anatômicos pode ser utilizada na avaliação de danos promovidos por diferentes elementos xenobióticos (Ghosh et al., 2017; Anjos et al., 2018; Andrade et al., 2020). Este tipo de avaliação possibilita identificar alterações em nível celular e tecidual, incluindo, colapso dos tecidos, hiperplasia, hipertrofia, formação de tecido de cicatrização e acúmulo de compostos do metabolismo celular, inclusive antes que se possa observar alterações à vista desarmada, como clorose, necrose e morte da planta (Tuffi Santos, 2007; Freitas-Silva et al., 2020; Silva et al., 2016; Cruz et al., 2021).

Ensaio de genotoxicidade em plantas tem se mostrado um método robusto e de fácil execução e por isso vem sendo empregado em diversos estudos ecotoxicológicos (Santos et al., 2015). Esse tipo de avaliação pode auxiliar na investigação da resistência ou susceptibilidade de plantas a herbicidas e em ensaios ecotoxicológicos (Santos et al., 2015; Piasecki et al., 2019). Além disso, podem contribuir na identificação de biomarcadores em nível de DNA, úteis na diagnose e prognose da fitotoxicidade por xenobióticos.

Joannesia princeps é uma espécie vegetal nativa da Mata Atlântica que ocorre em solos geralmente pobres e bem drenados, desde o Norte até o Nordeste e Sudeste do Brasil (Lorenzi, 2016), em áreas que sofrem influência da intensa atividade agrícola, o que pode expor a espécie à deriva de herbicidas. É uma espécie sucessora secundária inicial, com crescimento rápido, utilizada para fins paisagísticos, na recuperação de áreas degradadas devido às associações ecológicas, e na medicina popular devido às propriedades medicinais de suas sementes (Lorenzi, 2016; Kulkamp, 2020). Os principais estudos com esta espécie se pautam

na avaliação da sensibilidade à chuva ácida (Castro, 2008; Andrade et al., 2020), chuva com flúor (Silva et al., 2000), as emissões de siderúrgicas e poluição atmosférica (Silva et al., 2015), além do ozônio (Santos et al., 2019). No entanto, estudos sobre o efeito de herbicidas nesta espécie são escassos, os quais podem fornecer dados importantes para a caracterização de biomarcadores ao estresse.

A identificação de espécies bioindicadoras é fundamental para o planejamento de estratégias de proteção de áreas naturais e o monitoramento do impacto dos herbicidas sobre a vegetação nativa, em especial espécies não-alvo, como a espécie em estudo. Neste contexto, hipotetizamos que *Joannesia princeps* é uma espécie sensível ao glifosato e apresentará alterações morfoanatômicas, metabólicas e danos no genoma quando exposta ao herbicida glifosato em diferentes doses. O objetivo geral deste estudo foi avaliar as respostas promovidas pelo glifosato em *J. princeps*, buscando identificar biomarcadores úteis no monitoramento ambiental deste herbicida. Para isso, elaboramos dois artigos:

- O artigo I: “Biomarcadores morfoanatômicos na diagnose e prognose da fitotoxicidade do glifosato em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae)” teve como objetivo avaliar as respostas visuais e anatômicas em folhas e caules de *J. princeps* em resposta ao glifosato. Assim, buscamos identificar possíveis biomarcadores úteis na diagnose e/ou prognose da fitotoxicidade pelo glifosato por meio da caracterização visual, avaliações anatômicas e ensaios histoquímicos em folhas jovens, folhas expandidas e no caule. Este artigo está formatado nas normas do periódico *Environmental and Experimental Botany* (ISSN 0098-8472) ao qual será submetido após tradução e incorporação das sugestões da banca avaliadora.
- O artigo II: “Alterações metabólicas e danos no genoma promovidos por glifosato em folhas de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): contribuições para o monitoramento ambiental” teve como objetivo avaliar as respostas fisiológicas, bioquímicas e genotóxicas promovidos pelo glifosato em folhas de *J. princeps*. Buscamos identificar possíveis alterações úteis em trabalhos de biomonitoramento ambiental, por meio de análises de trocas gasosas, pigmentos fotossintéticos, quantificação de ácido chiquímico, peroxidação lipídica, enzimas antioxidantes, ensaio cometa e verificação de morte celular *in situ*. Este artigo está formatado nas normas do periódico *Environmental Pollution* (ISSN 0269-7491) ao qual será submetido após tradução e incorporação das sugestões da banca avaliadora.

REFERÊNCIAS

- Andrade GC, Castro LN, Silva LC (2020) Micromorphological alterations induced by simulated acid rain on the leaf surface of *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae). *Ecological Indicators* 116: 106526.
- Anjos TBO, Louback E, Azevedo AA, Silva, LC (2018) Sensibility of *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) exposed to fluoride-simulated fog. *Ecological Indicators* 90: 154-163.
- Bar M, Ori N (2014). Leaf development and morphogenesis. *Development* 141(22): 4219–4230.
- Castro LN (2008) Utilização de caracteres morfoanatômicos na avaliação do efeito de poluentes em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Monografia.
- Cruz CES, Freitas-Silva L, Ribeiro C, Silva LC (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.
- Cunha JPAR (2008) Simulação da deriva de agrotóxicos em diferentes condições de pulverização. *Ciência e Agrotecnologia*. 32(5): 1616-1621.
- Donley N (2019) The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. *Environ Health* 18: 44.
- Finley, JW, Duke, SO (2020) Agnes Rimando, a pioneer in the fate of glyphosate and its primary metabolite in plants. *J. Agric. Food Chem* 68(20): 5623–5630.
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155:2–18.
- Franz JE (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 TO, Nunes-Nesi A, Ribeiro C, Costa AC, Silva LC (2020) Evaluation of morphological and metabolic responses to glyphosate exposure in two neotropical plant species. *Ecological Indicators* 113: 1-11
- Freitas-Silva L, Castro ND, Silva LC (2021) Morphoanatomical and biochemical changes in *Zeyheria tuberculosa* exposed to glyphosate drift. *Botany* 99(2): 91-98.
- García-Caparrós P, De-Filippis L, Gul A, Hasanuzzaman M, Ozturk M, Altay V, Lao M T (2020) Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. *The Botanical Review*.
- Ghosh P, Thakurb I, Kaushik A (2017) Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: a review. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 141: 259-270.

Gomes MP, Le Manac'h SG, Maccario S, Labrecque M, Lucotte M, Juneau P (2016) Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pestic. Biochem. Physiol* 130: 65–70.

Gomes MP, 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 amino methylphosphonic acid. *Journal of Experimental Botany* 65: 4691-4703.

Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JÁ, Fujita M, Fotopoulos V (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9(8): 681.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis . (2020) Os 10 ingredientes ativos mais vendidos – 2019. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2019/Os_10_IAs_vendidos_2019.xls (Accessed Mar 1, 2021).

Külkamp J (2020) *Joannesia* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17586> (Accessed 3 March 2021).

Lorenzi H (2016) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. V. 1-2, 7 ed., Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2020). Resumo do registro de agrotóxicos, componentes e afins (2005-2020). Brasil: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/arquivos/registros-concedidos-2005-2020-site-mapa.xlsx/view (Accessed Mar 3, 2021).

Piasecki C, Carvalho IR, Cechin J, Goulart FAP, Maia LC, Agostinetto D, Caverzan A, Stewart Jr. CN, Vargas L (2019) Oxidative stress and differential antioxidant enzyme activity in glyphosate-resistant and sensitive hairy fleabane in response to glyphosate treatment. *Bragantia* 78(3): 379-396.

Rai PK (2016) Impacts of particulate matter pollution on plants: Implications for environmental biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 129: 120-136.

Rezende-Silva SL, Costa AC, Dyszy FH, Batista PF, Crispim-Filho AJ, Nascimento KJT, Silva (2019) *Pouteria torta* is a remarkable native plant for biomonitoring the glyphosate effects on Cerrado vegetation. *Ecological Indicators*.102: 497-506.

Rocha PR, Faria AT, Silva GS, Queiroz MELR, Guimarães FCN, Tironi SP, Galon L, Silva AA (2013) Meia-vida do diuron em solos com diferentes atributos físicos e químicos. *Ciênc. Rural*. 43: 1961-1966.

Santos CLV, Pourrut B, Oliveira JMPF (2015) The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Frontiers in Genetics* 6: 216.

Santos MFS (2019) Alterações morfoanatômicas e fisiológicas em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae) exposta ao ozônio. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa.

Silva LC, Azevedo AA, Silva EAM, Oliva MA (2000) Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. *Brazilian Journal of Botany* 23(4): 385-393.

Silva LQ, Jakelaitis A, Vasconcelos-Filho SC, Costa AC, Araújo ACF (2016) Morphoanatomical changes of pequi leaves (*Caryocar brasiliense* Cambess.) exposed to simulated drift of glyphosate. *Revista Árvore*. 40: 669-677.

Silva DR (2015) Efeitos da poluição atmosférica de Ipatinga - MG sobre *Joannesia princeps* VELL. (Euphorbiaceae) com ênfase nos nectários extraflorais. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, 2015.

Silva, L. C; Oliva, M.; Azevedo, A. A.; Silva, E. A. M.; Oliva, M. A. 2000. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. *Revista Brasileira de Botânica* 23: 385-393.

Singh S, Kumar V, Datta S, Wani AB, Dhanjal DS, 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.

Tuffi Santos LD, Meira RMSA, Ferreira FA, Sant'Anna-Santos B, Ferreira LR (2007) Morphological responses of different eucalypt clones submitted to glyphosate drift. *Environ. Exp. Bot.* 59: 11-20.

Zhong G, Wu Z, Yin J, Chai L (2018) Responses of *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle and *Vallisneria natans* (Lour.) Hara to glyphosate exposure. *Chemosphere* 193: 385–393.

Capítulo I

Biomarcadores morfoanatômicos na diagnose e prognose da fitotoxicidade por glifosato em *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae)

Hugo Humberto de Araújo^a; Larisse de Freitas-Silva^b; 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.*

**Autor para correspondência: luzimar@ufv.br*

Resumo

O herbicida glifosato pode afetar negativamente a vegetação nativa por meio da deriva, impactando espécies não-alvo de florestas tropicais próximas às lavouras. O objetivo neste estudo foi avaliar as respostas visuais e anatômicas em folhas e caules de *Joannesia princeps* ao glifosato, buscando identificar possíveis biomarcadores úteis na diagnose e/ou prognose da fitotoxicidade causada pelo herbicida. Mudanças de *J. princeps* foram submetidas a aplicação de glifosato nas doses de 0; 180; 360; 720 e 1440 g.i.a.ha⁻¹. A caracterização visual foi feita diariamente e as avaliações anatômicas e ensaios histoquímicos foram feitas em folhas jovens, folhas expandidas e no caule, 12 dias após a aplicação do herbicida. Visualmente, em folhas ocorreu clorose, encarquilhamento, redução na expansão foliar e necrose, e em caules ocorreram manchas escuras e ranhuras superficiais. Anatomicamente, nas folhas ocorreram: colapso de células epidérmicas, retração do protoplasto, formação de tecido de cicatrização, redução visual de espaços intercelulares, alterações nos cloroplastos acompanhados de redução de amido, surgimento de projeções de parede celular, aumento de compostos fenólicos, alteração nos tecidos de condução. Nos caules ocorreram colapso de células epidérmicas, alterações no câmbio vascular e nos tecidos de condução. Em conclusão, o glifosato promoveu alterações visuais e anatômicas em folhas e caules de *J. princeps* que são biomarcadores úteis na diagnose e prognose da fitotoxicidade por glifosato. Estes dados sugerem que *J. princeps* é sensível ao herbicida e tem potencial como espécie bioindicadora de glifosato no ambiente.

Palavras-chave: Anatomia foliar. Alterações visuais. Biomarcadores. Herbicidas. Histoquímica. Prognose.

Destaques

- O glifosato promoveu alterações visuais e anatômicas em folhas e caule de *Joannesia princeps*
- Em folhas sem sintomas visuais ocorreram alterações anatômicas

- Respostas do caule foram úteis na avaliação da fitotoxicidade pelo glifosato
- *J. princeps* apresenta biomarcadores diagnósticos e prognósticos ao glifosato
- *J. princeps* é uma espécie com potencial uso no biomonitoramento de glifosato

1 Introdução

A Mata Atlântica é um dos biomas brasileiros mais ricos em biodiversidade, sendo considerada um *hotspot* (Myers et al., 2000). Este bioma tropical vem sendo transformado pela ação antrópica, devido a redução na cobertura natural e intensa fragmentação (Rezende et al. 2018). A agropecuária, atualmente, ocupa cerca de 60,9% das terras do bioma, sendo 31% destinadas a agricultura (Mapbiomas, 2021). No entanto, a atividade agrícola, em virtude do uso de herbicidas e outros pesticidas, pode afetar negativamente espécies tropicais não-alvo que ocorrem nestes ambientes (Ferreira et al., 2019, Cruz et al., 2021).

O glifosato [(N-phosphonomethyl) glycine] é o herbicida mais utilizado em escala global e o mais comercializado no Brasil, devido a seu custo-benefício e eficiência no controle de plantas daninhas (Dupont et al., 2018; IBAMA, 2020). O glifosato é um herbicida sistêmico, não seletivo aplicado em folhas em pós-emergência para o controle de plantas daninhas de importância agrônômica (Franz et al., 1997). Após aplicação e absorção majoritariamente pela parte aérea, o herbicida segue o fluxo de fotoassimilados para órgãos de reserva e regiões mais ativas metabolicamente como meristemas, folhas jovens e raízes em desenvolvimento (Nguyen et al., 2016; Singh et al., 2020).

O mecanismo de ação do glifosato consiste na inibição da enzima cloroplastídica 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphatesynthase (EPSPS - EC 2.5.1.19) acarretando alterações na rota do ácido chiquímico e interferindo na síntese de amionoácidos aromáticos que são precursores para a produção de proteínas, hormônios vegetais e metabólitos secundários (Mobin et al., 2015). Apesar de ser um produto destinado ao controle de plantas daninhas, espécies não-alvo podem ser afetadas pela aplicação do glifosato (Silva et al., 2016; Cruz et al., 2021).

A deriva acontece quando parte do produto pulverizado ultrapassa a área de aplicação e atinge locais próximos, podendo afetar negativamente a vegetação adjacente não-alvo (Rezende-Silva et al. 2019). No entanto, efeitos do glifosato em espécies não agricultáveis foram explorados em poucos estudos (Rezende-Silva et al., 2019; Freitas-Silva et al., 2020; Freitas-Silva et al. 2021). A investigação de respostas visuais e anatômicas em plantas nativas expostas ao glifosato podem auxiliar na diagnose da fitotoxicidade promovida pelo herbicida e

no estabelecimento de biomarcadores, além de ajudar a compreender melhor os efeitos deste herbicida em plantas não-alvo (Freitas-Silva et al., 2020; Cruz et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2021).

Em plantas sensíveis ao glifosato as alterações no metabolismo energético podem promover superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gomes et al., 2014). A exposição ao glifosato pode promover alterações estruturais, como a ruptura da epiderme, necroses, formação de tecido de cicatrização, colapso de tricomas glandulares e células epidérmicas, colapso de células não lignificadas do mesofilo e hiperplasia celular (Silva et al., 2016; Cruz et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2021). Alterações anatômicas podem ocorrer na ausência de sintomas visuais (Freitas-Silva et al., 2020) e podem ser úteis para a avaliação prognóstica da fitotoxicidade do glifosato em espécies vegetais. O glifosato também pode promover alterações visuais como necrose, clorose, redução no crescimento e no desenvolvimento, além de morte de plantas susceptíveis (Cobb e Reade, 2010; Piasecki et al., 2019). Estas alterações podem ocorrer pouco tempo após a exposição ao herbicida e são um importante indicativo da fitotoxicidade promovida pelo glifosato (Freitas-Silva et al., 2020).

Joannesia princeps Vell. (Euphorbiaceae) é uma espécie arbórea tropical nativa, endêmica do Brasil (Külkamp, 2020), que ocorre naturalmente na Mata Atlântica e já foi classificada como “vulnerável” pelo World Conservation Monitoring Centre em relação ao risco de extinção (WCMC, 1998). Suas sementes são exploradas na medicina popular (Lorenzi, 2016) e servem como recurso alimentar para muitos animais, em especial as cotias (*Dasyprocta leporina*) que tem importante papel na dispersão desta espécie (Fernandez et al., 2017). *J. princeps* apresenta alterações visuais e estruturais em resposta a diferentes poluentes (Silva et al. 2000; Silva et al. 2005; Andrade et al., 2020) e tem sido apontada como uma espécie potencialmente útil no biomonitoramento de xenobióticos. Desta forma, objetivamos avaliar as respostas visuais e anatômicas em folhas e caule de *J. princeps* em resposta ao glifosato. Nossa hipótese é que essa espécie seja sensível ao herbicida e que entre as alterações visuais e anatômicas observadas na parte aérea de *J. princeps* possamos identificar potenciais biomarcadores para a diagnose e/ou prognose da fitotoxicidade do glifosato.

2 Materiais e métodos

2.1 Condições de cultivo

Sementes de *J. princeps* foram coletadas em uma área com vegetação de Mata Atlântica na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil (-20°45'20" e -42°52' 40"). As sementes foram higienizadas, o tegumento foi rompido mecanicamente e foram germinadas em substrato "Topstrato HT®". Um mês após a germinação, as mudas com um par de folhas expandidas foram transplantadas para vasos de 3,8L com o mesmo substrato. As plantas foram irrigadas a cada dois dias e receberam solução nutritiva de Clark a ½ força iônica, pH 5.5 (Clark, 1975) semanalmente. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação na UFV por três meses nestas condições. Posteriormente, foram padronizadas visualmente e selecionadas para o experimento.

2.2 Aplicação dos tratamentos

O herbicida glifosato (RoundUp Original® DI - Monsanto, USA) contendo 370 g.L⁻¹ de equivalente ácido de [(N-phosphonomethyl) glycine] foi aplicado na porção aérea das mudas nas doses de 0, 180, 360, 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ (gramas de ingrediente ativo por hectare). Foram utilizadas quatro mudas por tratamento (n=4). A pulverização foi feita entre 8 e 9 da manhã, com um pulverizador (modelo Herbicat®, Catanduva Brasil) propelido a CO₂, acoplado a dois bicos de pulverização (Teejet, model XR11002VP) com espaçamento de 0,5m. O equipamento foi regulado com pressão constante de 150 KPa e com vazão de 150 L/ha⁻¹. A coleta de amostras para as avaliações ocorreu 12 dias após a aplicação do herbicida (DAA).

2.3 Caracterização visual

Após a aplicação dos tratamentos, fotografias foram realizadas diariamente com câmera digital (Nikon Coolpix P510, 16 MP) para documentar possíveis alterações visuais e a progressão destas durante o período experimental. As observações foram feitas em folhas jovens, folhas expandidas e ao longo do caule. Neste experimento, padronizou-se utilizar os termos folhas jovens referindo-se a folhas do primeiro nó e folhas expandidas, para folhas do terceiro nó a partir do ápice.

2.4 Caracterização estrutural em microscopia de luz e histoquímica

Amostras da região mediana e da margem do folíolo central de folhas jovens e folhas expandidas, com e sem sintomas visuais respectivamente, foram coletadas para a caracterização estrutural e histoquímica, 12 DAA. Adicionalmente, fragmentos do caule, na região do terceiro entrenó, com sintomas visuais foram coletados para avaliação estrutural e histoquímica. Todas as coletas foram realizadas no período da manhã.

As amostras para caracterização estrutural foram fixadas em solução de Glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato, pH 7,2 (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica e incluídas em historesina (Leica Historesin®, Heidelberg, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. Secções transversais (6 µm de espessura) foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo Leica RM 2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, IL, EUA) com navalha de vidro. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina a 0,05%, pH 4,7 (O'Brien e McCully, 1981) e montados entre lâmina e lamínula em meio de montagem PermOUNT® (Thermo Fisher Scientific) (Kraus e Arduin, 1997).

Amostras de folíolos de folhas jovens e expandidas, com e sem sintomas visuais respectivamente foram utilizadas para os ensaios histoquímicos. Para a detecção de amido com o uso do lugol (Johansen, 1940) as amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada - FNT (Kraus e Arduin, 1997, modificado) e estocadas em etanol 70% (v/v). Para a detecção de compostos fenólicos as amostras de folhas foram fixadas em sulfato ferroso em formalina (Johansen, 1940). As amostras, para ambos os testes, foram incluídas em historesina (Leica Historesin®, Heidelberg, Alemanha) e seccionadas a 6 µm em micrótomo rotativo (modelo Leica RM 2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, IL, EUA). As lâminas foram montadas em meio de montagem PermOUNT® (Thermo Fisher Scientific).

Fragmentos de caule do terceiro entrenó, com sintomas visuais, foram fixados em FNT (Kraus e Arduin, 1997, modificado) e estocados em etanol 70%. Em seguida, as amostras foram seccionadas em micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA., Belo Horizonte, Brasil) e submetidos aos testes para detecção de compostos fenólicos estruturais (lignina) com o uso de floroglucina acidificada (Johansen, 1940) e compostos pécnicos com o uso do vermelho de rutênio (Johansen, 1940). As lâminas foram montadas em gelatina glicerinada. O controle foi feito para todos os testes histoquímicos realizados.

Todas as lâminas foram analisadas em microscópio de luz e as imagens foram obtidas em fotomicroscópio (modelo AX70RF, Olympus Optical, Tóquio, Japão), equipado

com sistema U-photo e câmara de captura de imagens (modelo Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision, Alemanha), localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

3 Resultados

3.1 Caracterização visual

Alterações visuais foram observadas nas folhas e nos caules de *J. princeps* expostas ao glifosato. Os primeiros sintomas visuais surgiram no 3º DAA e foram restritos aos ápices caulinares, incluindo clorose das plantas submetidas às doses de 360, 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹. Após o 3º DAA surgiram sintomas em folíolos de folhas jovens a partir da dose de 360 g.ia.ha⁻¹, incluindo clorose que se intensificou com o aumento das doses do herbicida e no decorrer do tempo após a exposição. Em folhas expandidas os sintomas surgiram a partir do 8º DAA, incluindo clorose discreta na dose de 360 g.ia.ha⁻¹ e mais intensas nas doses de 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹. No caule, no 5º DAA surgiram manchas escuras a partir da dose de 180 g.ia.ha⁻¹ e se intensificaram com o aumento das doses do herbicida, no decorrer do período de avaliação.

No 12º DAA ocorreram sintomas visuais nas plantas em todas as doses do herbicida (Fig. 1). Nos ápices caulinares, os sintomas observados foram cloroses associados à perda da coloração púrpura partir da dose de 360 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 1 C-E) e encarquilhamento dos folíolos nas doses de 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 1 D e E). No tratamento controle não ocorreram alterações visuais ao final do período de avaliação (Fig. 1 A, F, K e P).

Em folhas jovens, no 12º DAA, ocorreu clorose a partir da dose de 180 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 1 G) que se intensificou nas maiores doses. Houve encarquilhamento e enrolamento da margem dos folíolos a partir da dose de 360 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 1 H). Nas maiores doses aplicadas ocorreu redução na expansão da lâmina dos folíolos (Fig. 1 I e J) e surgimento de manchas necróticas (Fig. 1 J). Já nas folhas expandidas, houve clorose discreta nas doses de 180 e 360 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 1 L e M) e mais intensa nas duas maiores doses aplicadas (Fig. 1 N e O). Na dose de 1440 g.ia.ha⁻¹, alguns indivíduos apresentaram manchas necróticas nas folhas (Fig. 1 O).

No caule, no 12º DAA, em todas as doses do herbicida, ocorreram manchas escuras (Fig. 1 Q-T). Na dose de 180 g.ia.ha⁻¹ as manchas eram menores e restritas a região do terceiro entrenó (Fig. 1 Q). No entanto, com o aumento das doses do herbicida as manchas se apresentaram maiores, mais numerosas e dispersas ao longo do caule (Fig. 1 R-T). Nas doses de 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ ocorreram ranhuras superficiais do caule na região das manchas escuras (Fig. 1 S e T).

3.2 Caracterização estrutural e histoquímica

Em secção transversal, os folíolos de *J. princeps* são glabros, hipoestomáticos, apresentam epiderme uniestratificada em ambas as faces e parede periclinal externa pouco espessada (Fig. 2 A). O mesofilo é dorsiventral, com uma camada de parênquima paliçádico com células justapostas, voltado para face adaxial (Fig. 2 A). O parênquima lacunoso é constituído por 5-6 camadas de células com grandes espaços intercelulares (Fig. 2 A). A nervura de maior porte (Fig. 2 E) é proeminente, com feixe vascular colateral em formato de arco aberto. No mesofilo (Fig. 2 A) e nervura de maior porte (Fig. 2 E) ocorre a presença de laticíferos e de idioblastos cristalíferos com drusas ou com acúmulo de compostos fenólicos.

No mesofilo das folhas jovens, na dose de 360 g.ia.ha⁻¹ os cloroplastos apresentaram aspecto hipertrófico (Fig. 2 B detalhe) em comparação com o controle (Fig. 2 A detalhe). Na dose de 720 g.ia.ha⁻¹ houve colapso de células epidérmicas, retração do protoplasto e redução visual dos espaços intercelulares (Fig. 2 C e D). As plantas expostas a 1440 g.ia.ha⁻¹ apresentaram redução visual dos espaços intercelulares (Fig. 2 D) com diminuição visual nos espaços intercelulares além de alterações no formato das células (Fig. 2 D), não sendo possível distinguir o parênquima paliçádico do clorofiliano. Ocorreu também o colapso de células epidérmicas e do parênquima clorofiliano, acúmulo de compostos fenólicos e formação de tecido de cicatrização, caracterizado por apresentar células tabulares enfileiradas limitando a região com dano (Fig. 2 D).

Na nervura de maior porte das folhas jovens, nas doses de 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ ocorreu alteração no formato de células parenquimáticas (Fig. 2 H detalhe), em comparação com o controle (Fig. 2 E detalhe), alterações na morfologia de células do câmbio vascular (Fig. 2 I). Além disso, os elementos do xilema em diferenciação apresentaram paredes sinuosas (Fig. 2 I) e ocorreu alterações nas células do floema (Fig. 2 J) em comparação ao controle (Fig. 2 G).

Em folhas expandidas nas doses de 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ ocorreram redução visual na espessura do parênquima paliçádico e acúmulo intenso de compostos fenólicos nas células do mesofilo (Fig. 3 C e D). No parênquima lacunoso, a partir da dose de 360 g.ia.ha⁻¹ ocorreu o aumento do número de projeções de parede celular (Fig. 3 F - H) em comparação com o controle (Fig. 3 E). Além disso, os cloroplastos apresentaram aspecto hipertrófico (Fig. 3 F' - H') a partir da dose de 360 g.ia.ha⁻¹ em comparação com o controle (Figura 3 E'). Na menor dose testada em nosso trabalho, não houve alterações estruturais para as folhas jovens e expandidas de *J. princeps*.

A reação com Lugol indicou uma diminuição visual do conteúdo de amido nos cloroplastos com o aumento das doses do herbicida, tanto em folíolos de folhas jovens (Fig. 4 A – E) quanto de folhas expandidas (Fig. 4 F – J). A diminuição foi mais intensa nas doses de 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 4 D e E, I e J) em ambas as folhas.

O teste com sulfato ferroso, evidenciou em todas as doses aplicadas um acúmulo de compostos fenólicos no parênquima paliçádico em folíolos de folhas expandidas (Fig. 4 L – O), em comparação com o controle (Figura 4 K). Nas folhas jovens, o teste histoquímico não indicou alterações visuais no conteúdo de compostos fenólicos.

O caule de *J. princeps*, em secção transversal é cilíndrico, com epiderme uniestratificada e células tabulares (Fig. 5 A e B). No terceiro entrenó, alguns indivíduos apresentam periderme em início do desenvolvimento, caracterizada pela diferenciação do felogênio. O córtex é predominantemente parenquimático e o câmbio vascular é formado por uma faixa de células, que produz floema secundário externamente (Fig. 5 C), com presença de feixes de fibras (Fig. 5 A) e xilema secundário internamente (Fig. 5 D).

Em plantas expostas ao glifosato ocorreram alterações estruturais no caule (Fig. 5 E-P), mesmo nas menores doses aplicadas. Em todas as doses avaliadas ocorreu colapso de células epidérmicas e subepidérmicas, com acúmulo de compostos fenólicos (Fig. 5 E, H, K e N). A partir da dose de 360 g.ia.ha⁻¹ ocorreu alteração no formato dos elementos de tubo crivado e das células companheiras do floema secundário (Fig. 5 I, L e O), além de acúmulo de compostos fenólicos na dose de 1440 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 5 O). O câmbio vascular apresentou células alteradas, com paredes sinuosas em todas as doses do herbicida (Fig. 5 G, J, M e P), sendo as alterações mais pronunciadas nas doses de 360, 720, 1440 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 5 J, M e P). A partir da dose de 360 g.ia.ha⁻¹, os elementos de vaso recém diferenciados apresentaram paredes celulares com espessamento atípico e alteração na morfologia das células (Fig. 5 J, M e P e Fig. 6 C- E). Nas plantas do tratamento controle não ocorreram alterações estruturais no caule.

A reação com floroglucina acidificada evidenciou diminuição na deposição de lignina nos elementos de vaso e fibras do caule a partir da dose de 360 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 6 H – J). Nos elementos de vaso com deformidade e espessamento atípico de parede, nas duas maiores doses (Fig. 6 H – J) a reação foi negativa para floroglucina. No entanto, a reação com vermelho de rutênio (Fig. 6 K – O) mostrou um aumento da deposição de compostos pécticos nos espessamentos atípicos de paredes dos elementos de vaso e das fibras a partir da dose de 360 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 6 M-O).

4 Discussão

A aplicação de glifosato promoveu alterações visuais e anatômicas nas folhas e caule de *J. princeps*. Nossos resultados demonstram que folhas jovens são mais responsivas ao glifosato que folhas expandidas. Os sintomas visuais e anatômicos foram mais intensos em folhas jovens, possivelmente em decorrência da absorção direta e maiores danos oxidativos e metabólicos, ocasionados pelo herbicida. O glifosato é translocado rapidamente para folhas jovens e meristemas pouco tempo após a aplicação, promovendo maior acúmulo de ácido chiquímico em plantas sensíveis (Cardoso-Gustavson et al., 2018). Este fato está associado com o surgimento de clorose e encarquilhamento nos ápices caulinares e folhas jovens verificada em *J. princeps* a partir do terceiro dia após a aplicação.

A redução na expansão e o encarquilhamento de folíolos em folhas jovens, verificada em *J. princeps* neste estudo, podem estar associados a possíveis desordens hormonais e nutricionais. A inibição da EPSPS e interferência na rota do ácido chiquímico promovem redução na produção de hormônios vegetais como auxinas, resultando em menor expansão foliar e encarquilhamento (Bar e Ori, 2014). Além disso, o processo de expansão foliar depende da importação de carboidratos de folhas expandidas (Pantin et al., 2011). Alterações nos elementos de condução nas nervuras de folíolos de folhas jovens e no caule verificadas neste estudo pode contribuir para uma menor expansão e desenvolvimento foliar, devido alterações no fluxo de carboidratos, água e nutrientes (Sack et al., 2003; Sack et al., 2013).

A clorose é relatada em plantas expostas ao glifosato (Cruz et al. 2020, Freitas-Silva et al. 2020, Freitas-Silva et al., 2021). Esta alteração pode estar relacionada com a redução dos teores de clorofila e a degradação de pigmentos fotossintéticos promovidas pelo herbicida (Schrübbbers et al., 2014). Além disso, alterações morfológicas evidenciadas nos cloroplastos das folhas de *J. princeps* tratadas com herbicida, compromete o funcionamento da organela, o que pode promover uma menor síntese de clorofila e de amido nessas plantas. A clorose não é uma resposta específica ao glifosato e foi reportada em plantas em condições de estresse variados (Silva et al., 2017; Farnese et al., 2014). No entanto, pode ser útil na caracterização da fitotoxicidade causada pelo glifosato (Rezende-Silva et al., 2019; Santos et al. 2020; Freitas Silva et al., 2020; Cruz et al., 2021) associado com outros parâmetros (quantificação de ácido chiquímico, por exemplo).

Assim como nós verificamos em *J. princeps*, alterações nos cloroplastos também foram reportadas em outras plantas expostas ao glifosato (Cardoso-Gustavson et al., 2018; Khan et al., 2020). O estresse oxidativo e peroxidação lipídica promovidos pelo glifosato podem

ocasionar desorganização na estrutura interna dos cloroplastos, resultando em danos nas membranas dos tilacoides, desorganização da grana, ruptura na membrana plasmática e acúmulo de plastoglóbulos, resultando em alterações na morfologia e funcionamento desta organela (Campbell et al., 1976; Soares et al., 2020; Khan et al., 2020). Em *J. princeps*, as alterações na morfologia dos cloroplastos possuem valor prognóstico, pois ocorrem inclusive em folhas sem sintomas visuais. Nesse contexto, sugerimos que estudos futuros com esta espécie, realizem avaliações ultraestruturais para a caracterizar as alterações que o glifosato promove nos cloroplastos.

No parênquima clorofiliano de *J. princeps*, ocorreu redução dos grãos de amido nos cloroplastos, principalmente nas maiores doses aplicadas e nas folhas jovens. A redução de amido em plantas sob estresse abiótico é um processo comum, reportado em várias espécies vegetais (Thalman e Santelia, 2017). As alterações na morfologia dos cloroplastos em adição à clorose em folhas de *J. princeps* sugerem que a alterações no aparato fotossintético promoveram diminuição no conteúdo de amido. O glifosato pode promover diminuição da eficiência do processo fotossintético, associada a alterações fisiológicas, como menor assimilação de CO₂ e redução de pigmentos fotossintéticos (Gomes et al., 2016; Freitas-Silva et al., 2020). Além disso, o glifosato pode quelar íons metálicos podendo interferir na produção de amido, visto que alguns íons são cofatores para ativação de certas enzimas importantes no metabolismo vegetal (Gomes et al., 2014; Malalgoda et al., 2020).

A coloração púrpura nos ápices caulinares, é um indicativo da presença de antocianinas em folhas jovens de *J. princeps*. Neste estudo, em plantas expostas ao glifosato, nós verificamos a redução na cor púrpura das folhas jovens visualmente, sugerindo uma interferência na produção de antocianinas. A diminuição do conteúdo de antocianina em resposta ao glifosato foi descrita em outros estudos (Singh et al., 2017). A antocianina, assim como outros compostos fenólicos, é sintetizada a partir da rota do ácido chiquímico (Santos-Sánchez et al., 2019). Segundo Singh et al. (2017) a redução no conteúdo de antocianina em plantas expostas ao glifosato ocorre devido a redução da sua biossíntese ou degradação e alteração na atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL). A PAL regula a biossíntese de produtos do metabolismo secundário como terpenóides, ligninas, isoflavanóides, taninos e antocianinas (Singh et al., 2017). Neste contexto, nós incentivamos a quantificação do teor de antocianina em estudos futuros como uma possível resposta útil na caracterização de alterações promovidas pelo glifosato.

O aumento de compostos fenólicos atestado pelo teste histoquímico, verificado em nosso estudo, pode ser interpretado como uma resposta ao estresse oxidativo. Devido às desordens no aparato fotossintético e bioquímico, o glifosato pode promover superprodução de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (Gomes et al., 2016; Gomes et al., 2014). Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes não enzimáticos em plantas, promovendo a quelatação de metais, eliminação de ROS e inibição da peroxidação lipídica em condição de estresse (Sharma et al., 2012). Sua ocorrência é relatada em espécies vegetais submetidas a diversos agentes xenobióticos (Louback et al., 2016; Anjos et al., 2018), inclusive herbicidas (Silva et al., 2016; Cardoso-Gustavson et al., 2018; Rezende-Silva et al., 2019).

As alterações estruturais na epiderme, verificadas em nosso estudo, incluindo retração do protoplasto, alteração no formato das células, acúmulo de compostos fenólicos e colapso celular podem estar associados ao contato direto com o herbicida, como descrito por Freitas-Silva et al. (2020). Os compostos fenólicos após oxidação apresentam coloração marrom escura e podem ser associados à presença de lesões visíveis no caule e folhas de *J. princeps* expostas ao glifosato (Cardoso-Gustavson et al., 2018), esse mesmo padrão foi observado em soja (*Glycine max*) (Nandula et al., 2007; Cardoso-Gustavson et al., 2018). Freitas-Silva et al. (2021) propuseram que alterações anatômicas podem acontecer devido à interação entre a superfície das folhas e as gotas de herbicida, inclusive antes da translocação. Além disso, a epiderme das plantas constitui a maior parte da interface com o meio externo e é uma das primeiras barreiras de defesa (Javelle et al., 2010).

As projeções de parede celular verificadas em folhas expandidas de *J. princeps* expostas ao glifosato, são similares a protruções pécticas, ie: projeções na parede das células do parênquima clorofiliano que ocorrem em plantas sob estresse oxidativo e são descritas com frequência em plantas expostas ao ozônio (Günthardt-Goerg et al., 1997; Moura et al., 2018), porém ainda não relatadas para o herbicida glifosato. Nossos dados sugerem que as projeções de parede celular surgiram antes do aparecimento de sintomas visuais e possuem valor prognóstico em plantas expostas ao glifosato, assim como foi exemplificado em diferentes espécies expostas ao ozônio (Günthardt-Goerg e Vollenweider, 2007; Moura et al., 2011).

O glifosato pode provocar alterações celulares durante sua translocação pela planta (Freitas-Silva et al., 2020). Isso pode justificar o surgimento de colapso e alterações no formato das células do floema secundário do caule e da nervura mediana das folhas de *J. princeps* expostas ao glifosato. Além disso, as alterações no câmbio vascular do caule verificadas neste estudo, são indicativos da fitotoxicidade do glifosato. Os meristemas são regiões

metabolicamente ativas, com células em constante processo de divisão celular e intensa demanda metabólica (Fleming, 2006; Crang et al., 2018), sendo mais susceptíveis às alterações promovidas pelo glifosato.

O colapso e a deformidade verificados nos elementos de condução do xilema em folhas e caule de *J. princeps*, estão relacionados à menor deposição de lignina. O glifosato interfere na produção de compostos fenólicos estruturais, como a lignina, devido a inibição da produção de fenilalanina, um produto derivado da rota do ácido chiquímico (Zombiole et al., 2010; Gomes et al., 2014). O comprometimento da síntese de lignina e menor deposição deste componente verificado nos elementos de vaso e fibras do caule em *J. princeps*, podem comprometer a funcionalidade destes tecidos. Plantas com redução no teor de lignina podem apresentar alterações no balanço nutricional e hídrico, aumenta da vulnerabilidade ao ataque de patógenos e doenças, além de alterações no desenvolvimento (Gomes et al., 2014).

Diferente da maioria dos outros estudos que descrevem apenas alterações em folhas (Rezende-Silva et al., 2019; Freitas Silva et al., 2020; Freitas-Silva et al., 2021), nós demonstramos que o caule também pode apresentar respostas úteis na avaliação de danos promovidas pelo glifosato, inclusive nas menores doses. Assim, nós encorajamos estudos futuros que façam avaliação do sistema caulinar para investigar como o glifosato afeta o teor de lignina e seus efeitos secundários em plantas, visto que estes dados ainda são escassos (Gomes et al., 2014).

O desenvolvimento de sintomas visuais e alterações anatômicas descritos acima em folhas e caule de *J. princeps*, têm relação direta e/ou indireta com a aplicação de glifosato em diferentes doses. Estes dados sugerem que *J. princeps* é uma espécie promissora para o monitoramento de ambientes impactados pelo glifosato. A rápida germinação e desenvolvimento reforçam o potencial desta espécie nestes estudos.

Conclusão

A aplicação do glifosato promoveu alterações visuais e anatômicas na porção aérea de *J. princeps*. Visualmente, em folhas ocorreu clorose, encarquilhamento, redução na expansão foliar e necrose. No caule surgiram manchas escuras e ranhuras superficiais. Esses biomarcadores visuais de fácil identificação podem ser úteis em estudos de campo com glifosato, sugerindo que *J. princeps* é uma espécie sensível ao glifosato e tem potencial como bioindicadora de glifosato no ambiente.

Anatomicamente, folhas com alterações visuais, apresentaram retração do protoplasto, colapso de células epidérmicas, formação de tecido de cicatrização, redução visual dos espaços intercelulares e alterações nos tecidos de condução. Estes biomarcadores são úteis na caracterização diagnóstica de danos promovidos pelo herbicida. Já as alterações anatômicas em folhas sem sintomas visuais incluindo o aumento de compostos fenólicos, redução nos grãos de amido, projeções de paredes celulares e alterações nos cloroplastos podem ser úteis na avaliação prognóstica de danos promovidos pelo glifosato. Em adição, demonstramos que o sistema caulinar é responsivo a aplicação de glifosato e sua avaliação deve ser encorajada em estudos futuros para a caracterização de danos visuais e anatômicos promovidos por herbicidas.

Agradecimentos: Nós agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro, por meio da bolsa de mestrado concedida a H. H. Araújo e a bolsa de produtividade concedida a L. C. Silva.

Referências

Andrade GC, Castro LN, Silva LC (2020) Micromorphological alterations induced by simulated acid rain on the leaf surface of *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae). *Ecological Indicators* 116: 106526.

Anjos TBO, Louback E, Azevedo AA, Silva, LC (2018) Sensibility of *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) exposed to fluoride-simulated fog. *Ecological Indicators* 90: 154-163.

Bar M, Ori N (2014). Leaf development and morphogenesis. *Development*, 141(22): 4219–4230.

Campbell WF, Evans JO, Reed SC (1976) Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. *Weed Sci.* 24: 22-25.

Cardoso-Gustavson P, Dias MG, Costa FOB, Camargos GML, Centeno DC (2018). Imaging of glyphosate uptake and identification of early microscopic markers in leaves of C3 and C4 glyphosate-resistant and -susceptible species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 163: 502–51.

Clark J (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23:458-460.

Cobb AH, Reade JPH (2010) *Herbicides and Plant Physiology*, 2nd ed. Wiley-Blackwell: Shropshire, UK, p. 286.

Crang R, Lyons-Sobaski S, Wise R (2018) *Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants*, Springer, Switzerland.

Cruz CES, Freitas-Silva L, Ribeiro C, Silva LC (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.

Dupont YL, 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). *Agric Ecosyst Environ* 262:76–82

Farnese FS, Oliveira JA, Lima FS, Leão GA, Gusman GS, Silva LC (2014) Evaluation of the potential of *Pistia stratiotes* L. (water lettuce) for bioindication and phytoremediation of aquatic environments contaminated with arsenic. *Braz. J. Biol.* 74 (3): 103-112.

Fernandez, F.A.S., Rheingantz, M.L., Genes, L., Kenup, C.F., Galliez, M., Cezimbra, T., Cid, B., Macedo, L., Araujo, B.B.A., Moraes, B.S., Monjeau, A., Pires, A.S., 2017. Rewilding the Atlantic Forest: restoring the fauna and ecological interactions of a protected area. *Perspec. Ecol. Conserv.* 15, 308–314.

Ferreira MG, Barros GM, Costa VAM, Castro BMC, Zanuncio JC, Pereira IM, Ferreira EA, Francisco DMT, Santos JB (2019) Development of native forest species of the Atlantic forest in soil contaminated with hormonal herbicides. *International Journal of Phytoremediation* 21(9): 921-927.

Fleming A (2006) Metabolic aspects of organogenesis in the shoot apical meristem. *Journal of Experimental Botany* 57(9): 863–1870.

Franz JE (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 TO, Nunes-Nesi A, Ribeiro C, Costa AC, Silva LC (2020) Evaluation of morphological and metabolic responses to glyphosate exposure in two neotropical plant species. *Ecological Indicators* 113: 1-11.

Freitas-Silva L, Castro ND, Silva LC (2021) Morphoanatomical and biochemical changes in *Zeyheria tuberculosa* exposed to glyphosate drift. *Botany* 99(2): 91-98.

Gaines, TA, Patterson EL, Neve P (2019) Molecular mechanisms of adaptive evolution revealed by global selection for glyphosate resistance. *New Phytologist* 223: 1770–1775.

Gomes MP, Le Manac'h SG, Maccario S, Labrecque M, Lucotte M, Juneau P (2016) Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 130:65–70.

Gomes MP, 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. *J. Exp. Bot.* 65: 4691–4703.

Günthardt-Goerg MS, McQuattie CJ, Scheidegger C, Rhiner C, Matyssek R (1997) Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell walls. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 453-463.

Günthardt-Goerg MS, Vollenweider P (2007) Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. *Environmental Pollution* 147: 467-488.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2020) Os 10 ingredientes ativos mais vendidos – 2019. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2019/Os_10_IAs_vendidos_2019.xls (Accessed 1 March 2021).

Javelle M, Vernoud V, Rogowsky PM, Ingram GC (2010) Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytologist* 189(1): 17–39.

Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138.

Khan S, Zhou JL, Ren L, Mojiri A (2020) Effects of glyphosate on germination, photosynthesis and chloroplast morphology in tomato. *Chemosphere* 258: 127350.

Kraus JE, Arduin M (1997) *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR, 198 p. 1997.

Külkamp J (2020) *Joannesia* in *Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17586> (Accessed 3 March 2021).

Lorenzi H (2016) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. V. 1-2, 7 ed., Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

Louback E, Pereira TAR, Souza SR, Oliveira JA, da Silva LC (2016) Vegetation damage in the vicinity of an aluminum smelter in Brazil. *Ecological Indicators* 67: 193–203.

Malalgoda M, Ohm J, Howatt KA, Simsek S (2020) Pre-harvest glyphosate application and effects on wheat starch chemistry: Analysis from application to harvest. *Journal of Food Biochemistry* 44:1-14.

MapBiomass - Collection v 5.0 of Brazilian Land Cover & Use Map Series. <http://mapbiomas.org> (Accessed 05 February 2021).

Mobin M, Wu CH, Tewari RK, Paek KY (2015) Studies on the glyphosate-induced amino acid starvation and addition of precursors on caffeic acid accumulation and profiles in adventitious roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120:291–301.

Moura BB, Alves ES, Marabesi MA, Souza SR, Schaub M, Vollenweider P (2018) Ozone affects leaf physiology and causes injury to foliage of native tree species from the tropical Atlantic Forest of southern Brazil. *Science of the Total Environment* 610-611: 912–925.

- Moura, BB, Souza SR, Alves ES (2011) Structural responses of *Ipomoea nil* (L.) Roth 'Scarlet O'Hara' (Convolvulaceae) exposed to ozone. *Acta Bot. Bras.* 25(1): 122-129.
- Myers NRA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nandula VK, Reddy KN, Rimando AM, Duke SO, Poston DH (2007) Glyphosate-Resistant and -Susceptible Soybean (*Glycine max*) and Canola (*Brassica napus*) Dose Response and Metabolism Relationships with Glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 55(9): 3540–3545.
- Nguyen TH, Malone JM, Boutsalis P, Shirley N, Preston C (2016) Temperature influences the level of glyphosate resistance in barnyardgrass (*Echinochloa colona*). *Pest Manag Sci* 72(5):1031-1039.
- O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and select methods. Melbourne: Termarcarphi Pty, 45p.
- Pantin F, Simonneau T, Rolland G, Dauzat M, Muller B (2011) Control of leaf expansion: a developmental switch from metabolics to hydraulics. *Plant Physiol.* 156(2): 803-15.
- Piasecki C, Carvalho IR, Cechin J, Goulart FAP, Maia LC, Agostinetto D, Caverzan A, Stewart Jr. CN, Vargas L (2019) Oxidative stress and differential antioxidant enzyme activity in glyphosate-resistant and sensitive hairy fleabane in response to glyphosate treatment. *Bragantia* 78(3):379-396.
- Rezende CL, Scarano FR, Assad ED, Joly CA, Metzger JP, Strassburg BBN, Tabarelli M, Fonseca GA, Mittermeier RA (2018) From hotspot to hopespot: an opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspect. Ecol. Conserv.* 16:208–214.
- Rezende-Silva SL, Costa AC, Dyszy FH, Batista PF, Crispim-Filho AJ, Nascimento KJT, Silva (2019) *Pouteria torta* is a remarkable native plant for biomonitoring the glyphosate effects on Cerrado vegetation. *Ecological Indicators* 102: 497-506.
- Sack L, Cowan PD, Jaikumar N, Holbrook NM (2003) The 'hydrology' of leaves: co-ordination of structure and function in temperate woody species. *Plant Cell Environ.* 26, 1343-1356.
- Sack L, Scoffoni C (2013) Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. *New Phytol.* 198: 983-1000.
- Santos VRS, Filho AJC, Santana MM, Costa AC, Silva KLS (2020) Análises fisiológicas e morfoanatômicas de *Cenostigma macrophyllum* tul. (Fabaceae) submetida a diferentes concentrações de glifosato. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais* 11: 159–173.
- Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Hernández-Carlos B, Villanueva-Cañongo C (2019) Shikimic Acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. *In Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*, eds Soto-Hernández M., García-Mateos R., Palma-Tenango M. (London: IntechOpen), 10.5772/intechopen.83815.

Schrübbers LC, Valverde BE, Sørensen JC, 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.

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J. Bot.* 217037: 1-26.

Silva LC, Araújo TO, Siqueira-Silva AI, Pereira TAR, Castro, LN, Silva ED, Oliva MA, Azevedo AA (2017) *Clusia hilariana* and *Eugenia uniflora* as bioindicators of atmospheric pollutants emitted by an iron pelletizing factory in Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24(36): 28026-28035.

Silva LC, Azevedo AA, Silva EAM, Oliva MA (2000) Fluoride in simulated rain: symptomatology and effects on leaf structure and on growth of woody plants. *Braz. J. Bot.* 23(4): 385–393.

Silva LC, Azevedo AA, Silva EAM, Oliva MA (2005) Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). *Aust. J. Bot.* 53: 789–796.

Silva LQ, Jakelaitis A, Vasconcelos-Filho SC, Costa AC, Araújo ACF (2016) Morphoanatomical changes of pequi leaves (*Caryocar brasiliense* Cambess.) exposed to simulated drift of glyphosate. *Revista Árvore* 40: 669-677.

Singh H, Singh NB, Singh A, Hussain I (2017) Exogenous Application of Salicylic Acid to Alleviate Glyphosate Stress in *Solanum lycopersicum*. *International Journal of Vegetable Science* 23(6): 552–566.

Singh S, Kumar V, Datta S, Wani AB, Dhanjal DS, 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.

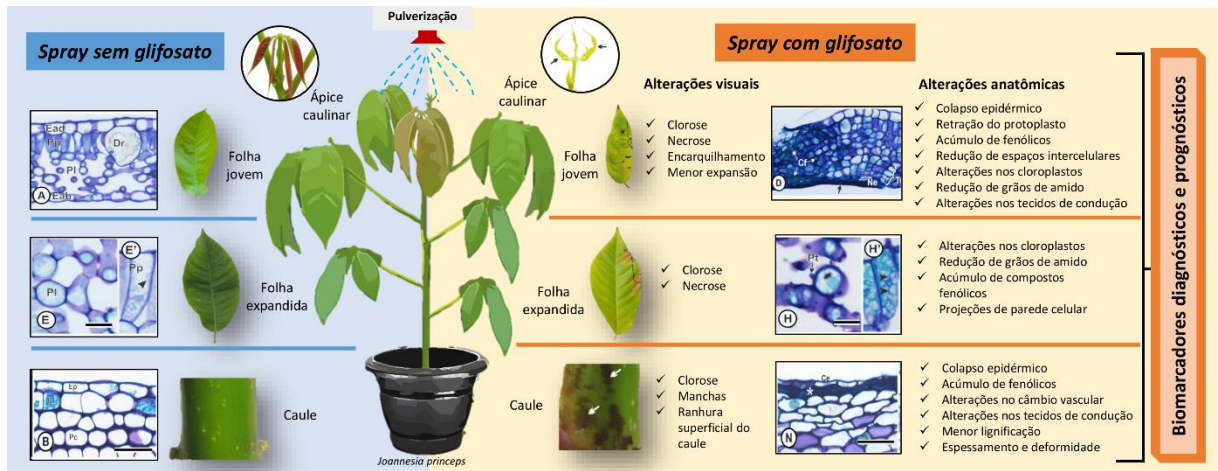
Soares C, Martins RPM, Tamagnini P, Serôdio J, Moutinho-Pereira J, Cunha A, Fidalgo F. (2020) Glyphosate-dependent effects on photosynthesis of *Solanum lycopersicum* L. - An ecophysiological, ultrastructural and molecular approach. *Journal of Hazardous Materials* 398: 122871.

Thalman M, Santelia D (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist* 214: 943–951.

WCMC - World Conservation Monitoring Centre (1998). "*Joannesia princeps*". The IUCN Red List of Threatened Species. IUCN. 1998: e.T32981A9740608. 10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T32981A9740608.en. (Accessed 15 March 2021).

Zobiolo LHS, Bonini EA, Oliveira RS, Kremer RJ, Ferrarese-Filho O (2010) Glyphosate affects lignin content and amino acid production in glyphosate-resistant soybean. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 831–837.

Figuras



Resumo gráfico.

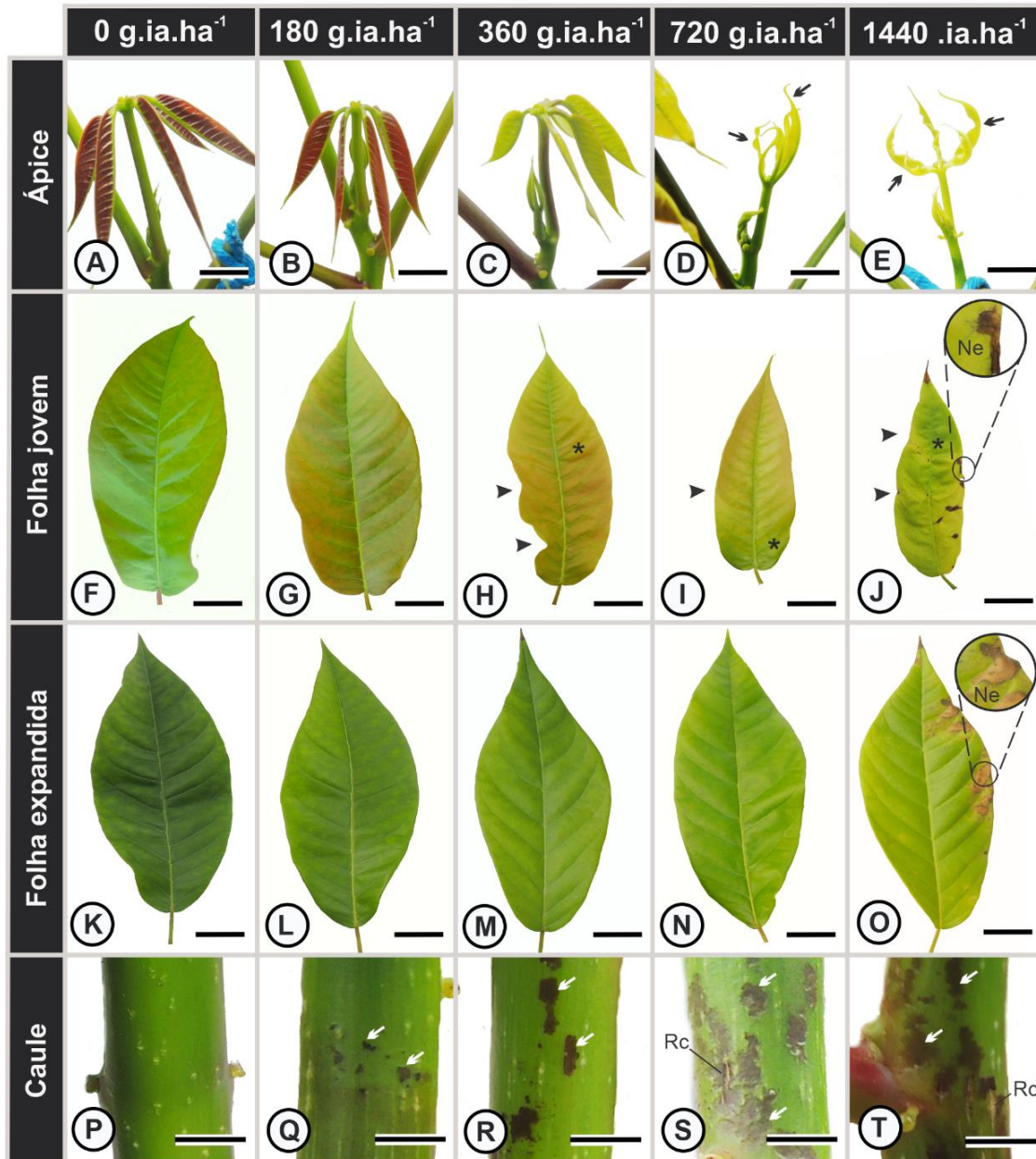


Fig. 1. Caracterização visual de folíolos e caule de *Joannesia princeps* submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Ápices caulinares (A-E); Folíolos de folhas jovens (F-J); Folíolos de folhas expandidas (K-O); Caule (P-T). Controle (A, F, K e P). Submetida a dose de 180 g.ia.ha⁻¹ (B, G, L e Q); 360 g.ia.ha⁻¹ (C, H, M e R); 720 g.ia.ha⁻¹ (D, I, N e S); 1440 g.ia.ha⁻¹ (E, J, O e T). Ne (necrose); Rc (Ranhura superficial do caule). Aterisco (encarquilhamento); Ponta de seta (enrolamento da margem foliolar); Seta branca (manchas no caule), Seta preta (encarquilhamento no ápice caulinar). Barras: (A-E) = 1cm, (F- O) = 3cm e (P-T) = 0,5cm.

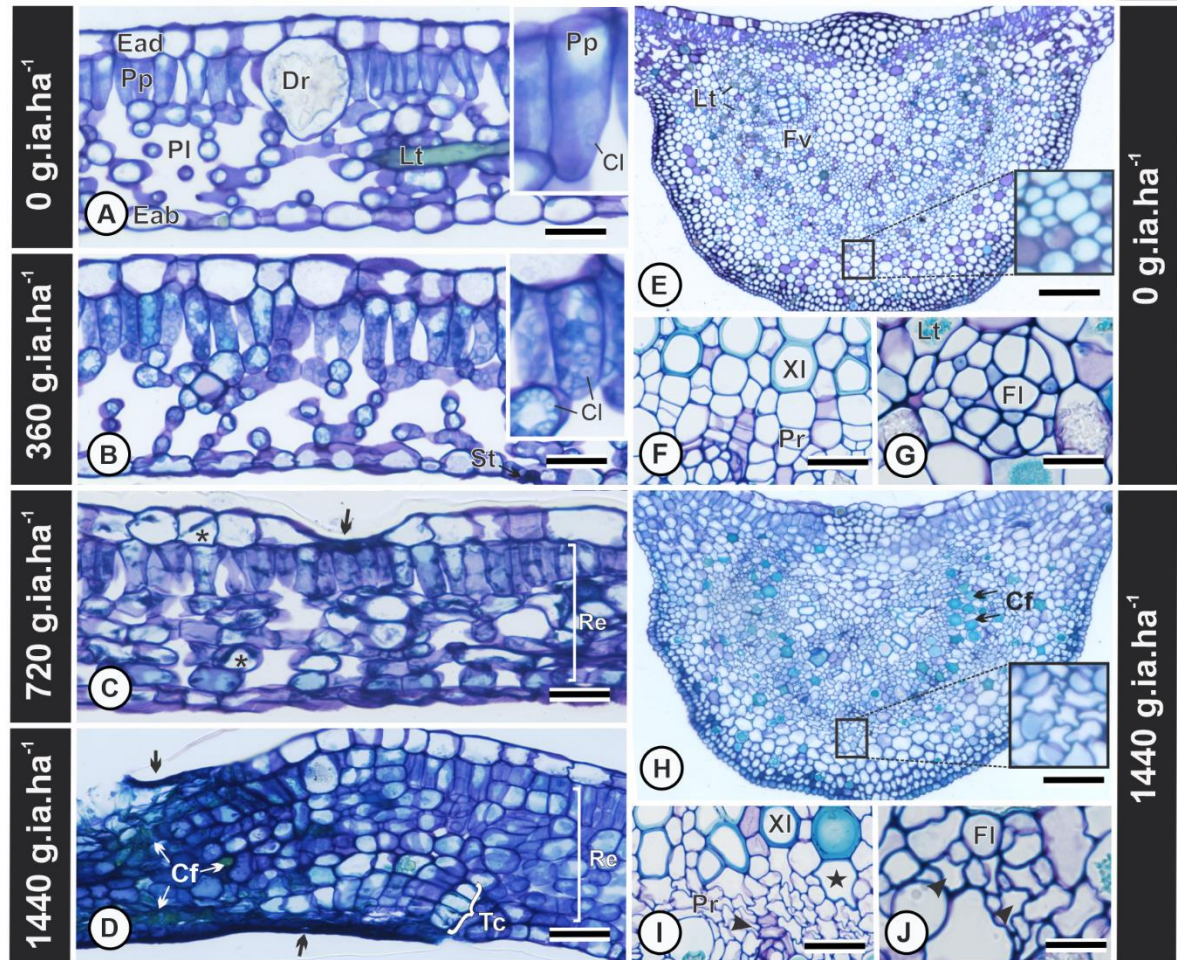


Fig. 2. Alterações anatômicas em folíolos de folhas jovens de *Joannesia princeps*, com sintomas visuais, submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Lâmina foliar (A-D); Nervura mediana (E-J). Controle (A, E, F e G). Submetida a dose de 360 g.ia.ha⁻¹ (B), 720 g.ia.ha⁻¹ (C) e 1440 g.ia.ha⁻¹ (D, H, I e J). Cl (cloroplastos); Cf (acúmulo de compostos fenólicos); Dr (drusa); Eab (epiderme da face abaxial); Ead (epiderme da face abaxial); Fl (floema); Lt (laticífero); Pl (parênquima lacunoso); Pp (parênquima paliçádico); Pr (câmbio vascular); Re (Redução dos espaços intercelulares); St (estômato); Tc (tecido de cicatrização); XI (xilema). Asterisco (Retração do protoplasto); Estrela (elemento de condução do xilema com deformidade); Seta (colapso de células epidérmicas); Ponta de seta (alterações na morfologia das células). Barras: (A-D) = 50µm, (E e H) = 200µm e (F, G, I e J) = 20µm.

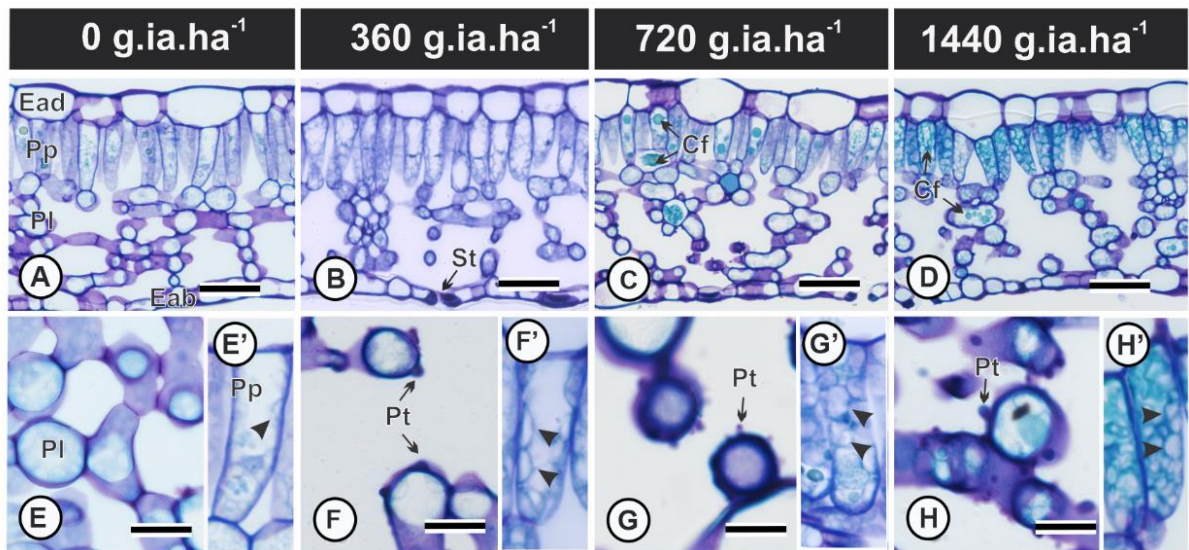


Fig. 3. Alterações anatômicas em folíolos de folhas expandidas de *Joannesia princeps*, sem sintomas visuais, submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Lâmina foliar (A-H); Controle (A, E e E'). Submetida a dose de 360 g.ia.ha⁻¹ (B, F e F') 720 g.ia.ha⁻¹ (C, G e G') e 1440 g.ia.ha⁻¹ (D, H, H'). Cf (acúmulo de compostos fenólicos); Eab (epiderme da face abaxial); Ead (epiderme da face adaxial); Pl (parênquima lacunoso); Pp (parênquima paliçádico); Pt (projeções de parede celular); St (estômato). Ponta de seta (cloroplastos). Barras: (A-D) = 50µm; (E – H) = 10µm.

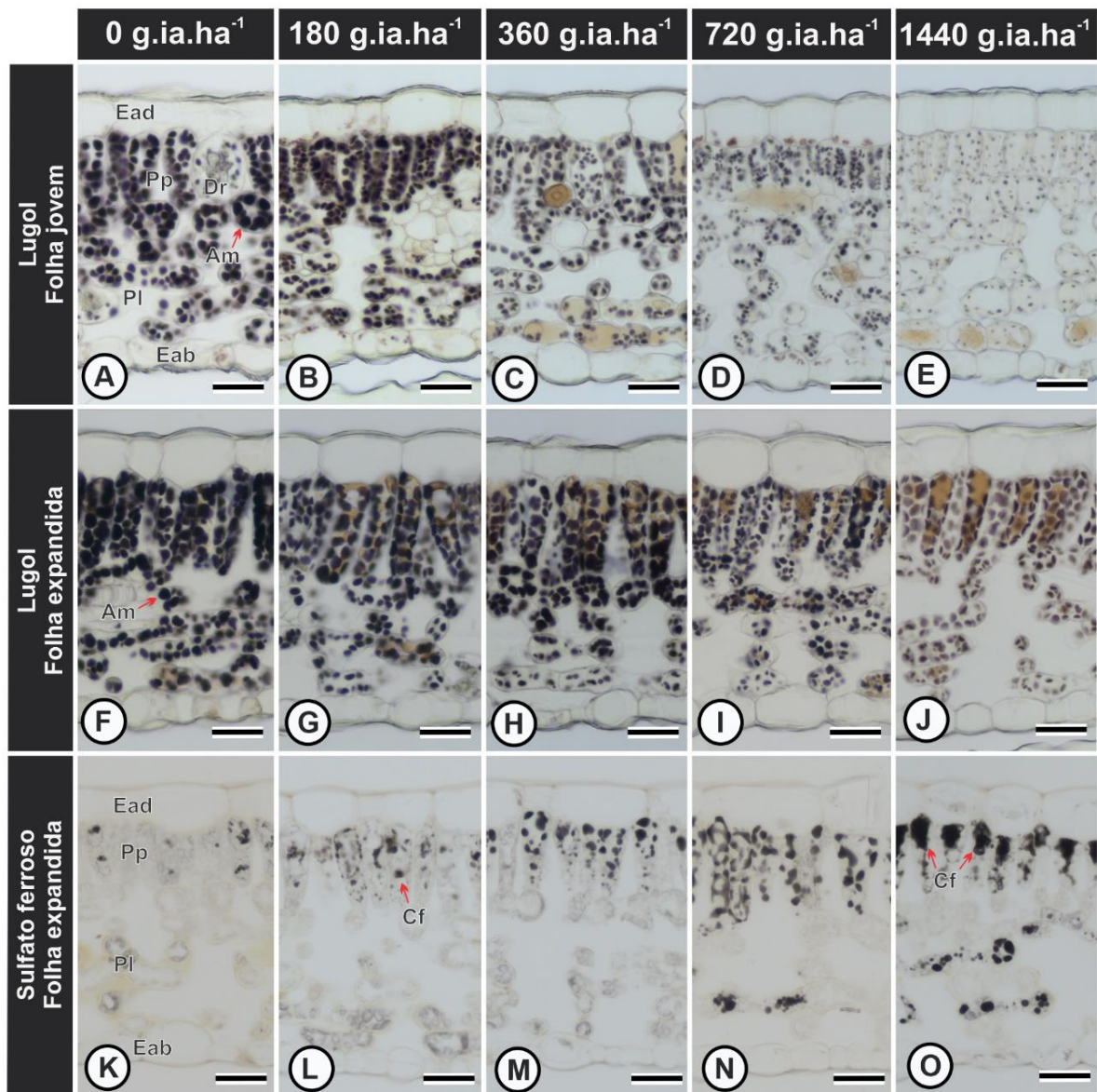


Fig. 4. Localização histoquímica de amido e compostos fenólicos em folíolos de *Joannesia princeps* submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Teste com Lugol, para identificação de amido em folíolos de folhas jovens (A-E) e de folhas expandidas (F-J) (reação positiva em preto – seta vermelha). Teste com sulfato ferroso, para identificação de compostos fenólicos em folíolos de folhas expandidas (K-O) (reação positiva em castanho escuro – seta vermelha). Controle (A, F e K). Submetida a dose de 180 g.ia.ha⁻¹ (B, G e L); 360 g.ia.ha⁻¹ (C, H e M); 720 g.ia.ha⁻¹ (D, I e N); 1440 g.ia.ha⁻¹ (E, J e O). Am (amido nos cloroplastos); Cf (compostos fenólicos); Dr (drusa); Eab (epiderme da face abaxial); Ead (epiderme da face abaxial); PI (parênquima lacunoso); Pp (parênquima paliçádico). Barras: (A – O) = 30µm.

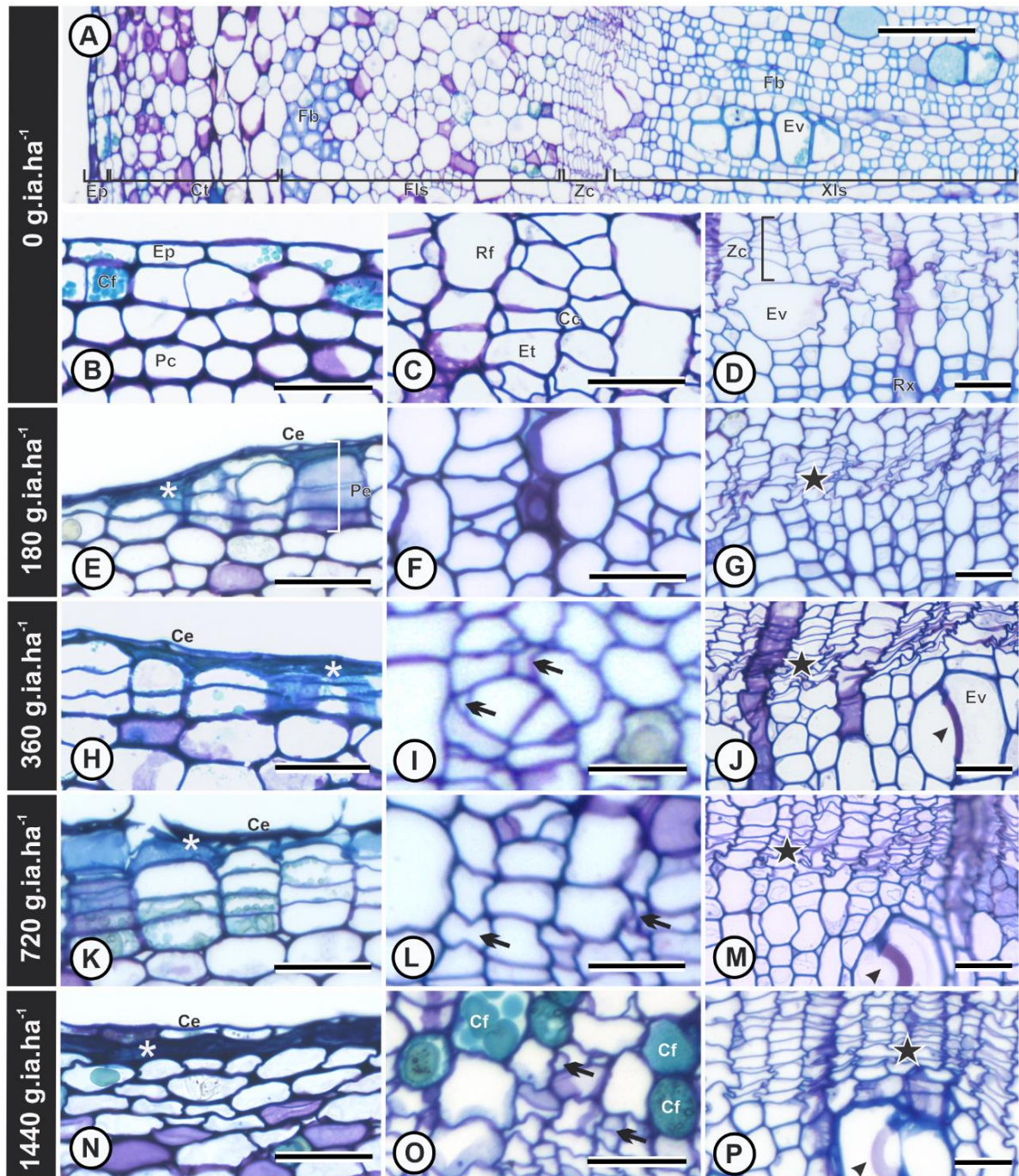


Fig. 5. Alterações anatômicas no caule de *Joannesia princeps* submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Controle (A-D). Submetida a dose de 180 g.ia.ha⁻¹ (E-G); 360 g.ia.ha⁻¹ (H-J); 720 g.ia.ha⁻¹ (K-M); 1440 g.ia.ha⁻¹ (N-P). Cc (célula companheira); Ce (colapso de células epidérmicas); Cf (composto fenólico); Ct (cortex); Ev (elemento de vaso); Ep (epiderme); Et (elemento de tubo crivado); Fb (fibra); Fls (floema secundário); Ev (elemento de vaso); Pc (parênquima cortical); Pe (periderme); Rf (raio floemático); Rx (raio xilemático); Xls (xilema secundário); Zc (zona cambial). Asterisco (acúmulo de compostos fenólicos); Estrela (alterações no formato das células da zona cambial); Ponta de seta (espessamento da parede celular); Seta (alterações no formato das células do floema). Barras: A = 150μm e (B – P) = 50μm.

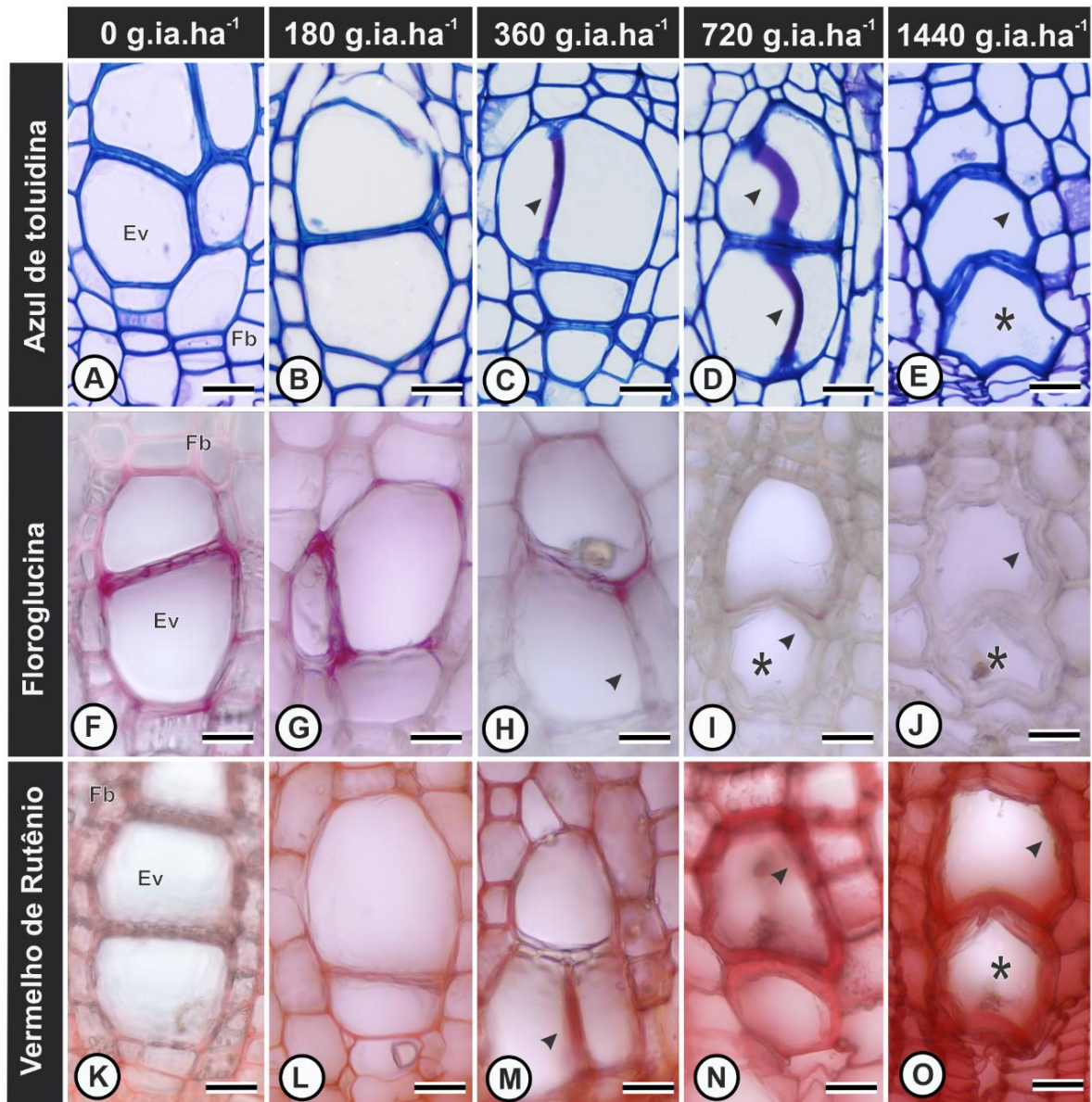


Fig. 6. Alterações anatômicas e localização histoquímica de lignina e compostos péclicos no xilema secundário do caule de *Joannesia princeps* submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Coloração com Azul de toluidina (A – E); reação com Floroglucina ácida para identificação de lignina (F – J) (reação positiva em vermelho / rosa) e Vermelho de Rutênio para identificação de compostos péclicos (K – O) (reação positiva em vermelho). Controle (A, F e K). Submetida à dose de 180 g.ia.ha⁻¹ (B, G e L); 360 g.ia.ha⁻¹ (C, H e M); 720 g.ia.ha⁻¹ (D, I e N); 1440 g.ia.ha⁻¹ (E, J e O). Ev (elemento de vaso), Fb (fibra). Ponta de seta (espessamento da parede celular); Asterisco (elemento de vaso com deformidade). Barras: (A – O) = 30µm.

Capítulo II

Alterações metabólicas e danos no genoma promovidos pelo glifosato em folhas de *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae): contribuições para o biomonitoramento ambiental

Hugo Humberto de Araújo^a; Wellington Ronildo Clarindo^b; Larisse de Freitas-Silva^c;
Luzimar Campos da Silva^{*a}

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

^b Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brasil.

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

*Autor para correspondência: luzimar@ufv.br

Resumo

A aplicação do herbicida glifosato pode afetar negativamente espécies nativas não-alvo por deriva. Nós hipotetizamos que *Joannesia princeps* é sensível ao glifosato e apresentará alterações no metabolismo e danos no genoma quando exposta a este herbicida. O objetivo neste estudo foi avaliar as respostas fisiológicas, bioquímicas e genotóxicas promovidas pelo glifosato em folhas de *J. princeps*, buscando identificar possíveis alterações úteis em trabalhos de biomonitoramento ambiental. Mudanças de *J. princeps* com três meses de idade foram cultivadas em casa de vegetação e submetidas a aplicação aérea do herbicida nas concentrações de 0, 180, 360, 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹. Estes valores equivalem 0%, 12,5%, 25%, 50% e 100% das doses aplicadas em campo para algumas culturas brasileiras. Decorridos 12 dias, foram feitas análises de trocas gasosas, pigmentos fotossintéticos, quantificação de ácido chiquímico, peroxidação lipídica, enzimas antioxidantes, ensaio cometa e verificação de morte celular *in situ*. O glifosato ocasionou aumento no teor de ácido chiquímico em folhas jovens e folhas expandidas. Houve redução da assimilação de CO₂ (A), da condutância estomática (gs), da transpiração foliar (E) e do teor de clorofilas *a*, *b* e total. Houve estresse oxidativo que promoveu o aumento da peroxidação lipídica e das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX). Em adição, o glifosato promoveu genotoxicidade dose-dependente e morte celular em todas as doses. Em conclusão, *J. princeps* foi sensível ao glifosato que promoveu efeitos deletérios mesmo na ausência de sintomas visuais. As avaliações fisiológicas, bioquímicas e genotóxicas em espécies nativas como *J. princeps* foram úteis no prognóstico de danos promovidos pelo glifosato e podem ser utilizadas no biomonitoramento deste herbicida no ambiente.

Palavras-chave: Ensaio cometa; Herbicida; Morte celular; Mata Atlântica.

Destaques

- O glifosato promove alterações no aparato fotossintético e estresse oxidativo em *J. princeps*
- O glifosato promove genotoxicidade dose dependente em *J. princeps*
- Diferentes doses de glifosato promovem morte celular
- Alterações metabólicas e genotoxicidade são úteis na avaliação prognóstica

Introdução

Os herbicidas são pesticidas químicos utilizados na agricultura para o controle de plantas daninhas as quais podem comprometer a produtividade das lavouras (Sharma et al., 2019). O Brasil é um dos quatro maiores consumidores de pesticidas do mundo (Donley, 2019), com destaque para os herbicidas (IBAMA, 2020). No Brasil, 493 novos pesticidas foram registrados em 2020, dos quais 394 (79,9%) são classificados como produtos perigosos, muito perigosos ou altamente perigosos para o meio ambiente (MAPA, 2020). O glifosato é o herbicida mais comercializado no país, contabilizando 271.592,24 toneladas de ingrediente ativo vendido em 2019 de acordo com levantamento do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2020).

O glifosato [(N-phosphonomethyl) glycine] é um herbicida sistêmico, não seletivo com amplo controle de plantas daninhas (Franz, 1985). Após a aplicação na porção aérea de plantas daninhas, o glifosato é absorvido através da cutícula e translocado principalmente pelo floema, no fluxo dos fotoassimilados (Gomes et al., 2014; Singh et al., 2020). O seu mecanismo de ação consiste na inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS, EC 2.5.1.19) interferindo diretamente na rota do ácido chiquímico (Mobin et al., 2015; Finley e Duke, 2020). Por consequência, ocorre o comprometimento da biossíntese de três aminoácidos aromáticos: triptofano, fenilalanina e tirosina (Gravena et al., 2012).

A aplicação do glifosato pode promover alterações no metabolismo energético resultando no aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espécies susceptíveis ao mesmo (Maroli et al., 2015). O sistema antioxidativo (enzimático e não enzimático) tem papel chave no controle de ROS em condições de estresse por convertê-lo em intermediários menos tóxicos (Corpas, 2015) e vem sendo monitorado em plantas expostas ao glifosato (Gomes et al., 2016a; Gomes et al., 2016b; Freitas-Silva et al., 2017; Freitas-Silva et al., 2020). Caso esses mecanismos não sejam eficientes, a superprodução de ROS pode promover alterações deletérias

no metabolismo fotossintético, promover aumento na peroxidação lipídica, danos celulares, na integridade das membranas e de ácidos nucleicos, levando à morte celular (Mittler, 2017; Pospisil e Yamamoto, 2017; García-Caparrós et al., 2020).

Parte do herbicida aplicado para o controle de espécies daninhas, pode ultrapassar a área de aplicação e atingir regiões próximas por meio da dispersão de gotículas, caracterizando o efeito deriva (Rezende-Silva et al. 2019). Impactos negativos no meio ambiente e comunidades biológicas podem ocorrer (Boutin et al., 2014; Hasanuzzaman et al., 2020a). As plantas podem ser utilizadas como bioindicadoras, da presença de xenobióticos no ambiente (Ghosh et al., 2017). Plantas nativas podem apresentar alterações visuais, metabólicas, fisiológicas e genômicas quando expostas a xenobióticos (Silva et al., 2017; Andrade et al., 2020; Khan et al., 2021). Estas alterações são classificadas como biomarcadores e são importantes parâmetros avaliados em programas de biomonitoramento de xenobióticos no ambiente, incluindo os herbicidas (Boutin et al., 2014; Freitas-Silva et al., 2020). Cruz et al. (2021) demonstraram efeitos deletérios do glifosato em *Eugenia uniflora*, uma espécie nativa da Mata Atlântica. Este bioma é um *hotspot* para a conservação visto a biodiversidade rica e fragmentação intensa (Myers et al., 2000).

Alterações fisiológicas (Santos et al., 2020; Soares et al., 2020), acúmulo de ácido chiquímico (Rezende-Silva et al., 2019; Cruz et al., 2021), alterações nas atividades enzimáticas e peroxidação lipídica (Gomes et al., 2016 a; Gomes et al., 2016 b; Freitas-Silva et al., 2017; Gomes et al., 2019), alterações citogenotóxicas (Mercado e Caleño, 2020; Khan et al., 2021) e nos tecidos vegetais (Cruz et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2021) são importantes respostas em plantas expostas ao glifosato, e podem ocorrer inclusive na ausência de sintomas visuais (Rezende-Silva et al., 2019; Freitas-Silva et al., 2020).

O uso de biomarcadores de DNA para verificar efeitos de compostos genotóxicos em plantas tem se mostrado um método direto, reprodutível e quantitativo, e por isso vem sendo empregado em diversos estudos ecotoxicológicos (Santos et al., 2015). Verificar danos no DNA permite prospectar, conhecer e quantificar o nível dos danos oxidativos ocasionados pelas ROS e compreender melhor os mecanismos de reparo do DNA e de morte celular (Piasecki et al., 2019). Plantas sob baixos níveis de estresse podem ativar mecanismos de reparo celular, níveis médios podem induzir morte celular programada e níveis muito altos podem induzir necrose (McCabe et al., 1997). Esse tipo de avaliação pode auxiliar na investigação da resistência ou susceptibilidade de plantas a herbicidas e em ensaios ecotoxicológicos (Santos et al., 2015; Khateeb, 2018; Piasecki et al., 2019).

Joannesia princeps Vell. é uma espécie arbórea tropical, da família Euphorbiaceae, endêmica do Brasil e nativa da Mata Atlântica que ocorre desde o Norte até o Nordeste e Sudeste do país (Külkamp, 2020), inclusive em áreas com atividade agrícola. *J. princeps* é uma espécie sucessional secundária inicial, com crescimento rápido e com potencial uso medicinal, paisagístico e na recuperação de áreas degradadas (Lorenzi, 2016; Külkamp, 2020). Esta espécie vem se revelando promissora em estudos de sensibilidade a agentes xenobióticos, como a chuva ácida (Silva et al. 2005; Andrade et al., 2020) e chuva com flúor (Silva et al. 2000). Considerando que *J. princeps* é sensível a outros xenobióticos e que ocorre em áreas sujeitas à agricultura, ela pode ser impactada pelo uso de pesticidas como o herbicida glifosato. Nós hipotetizamos que esta espécie é sensível ao glifosato e apresentará alterações no metabolismo e danos no genoma quando exposta a este herbicida. Assim, o objetivo neste nosso estudo foi avaliar as respostas fisiológicas, bioquímicas e genotóxicas ao glifosato em folhas de *J. princeps*. Assim, nós buscamos identificar alterações que possam ser utilizados em trabalhos de biomonitoramento ambiental com espécies nativas.

Materiais e métodos

Condições de cultivo e aplicação do herbicida

O estudo foi conduzido em casa de vegetação na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil (-20°45'20" e -42°52' 40"). Os indivíduos de *J. priceps* foram obtidos pela germinação de sementes coletadas de matrizes localizadas na UFV. Após a coleta as sementes foram higienizadas e tiveram a testa rompida mecanicamente. O plantio foi feito em potes plásticos contendo substrato "Topstrato HT®". Um mês após a germinação, as mudas foram transplantadas para vasos de 3,8 L com substrato da mesma marca. A irrigação com água foi feita a cada dois dias e solução nutritiva de Clark a ½ força iônica pH 5.5 (Clark, 1975) foi aplicada semanalmente. As plantas permaneceram nessas condições por três meses e foram subsequentemente padronizadas em relação ao tamanho, número de folhas e condições fitossanitárias.

As plantas selecionadas foram submetidas ao herbicida RoundUp Original® DI (Monsanto, USA), contendo 370 g L⁻¹ (37,0% m/v) de equivalente ácido de [(N-phosphonomethyl) glycine], nas doses de 0, 180, 360, 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ (gramas de ingrediente ativo por hectare). Estes valores equivalem 0%, 12,5%, 25%, 50% e 100% das doses

aplicadas em campo para algumas culturas brasileiras. A aplicação ocorreu na parte aérea das plantas com auxílio de pulverizador costal (modelo Herbicat[®], Catanduva Brasil), propelido a CO₂ com pressão constante de 150 KPa, acoplado a dois bicos de pulverização direcionada (Teejet, model XR11002VP) com 0,5 m de espaçamento e vasão total de calda de 150 L ha⁻¹. O experimento foi conduzido entre 8 e 9 da manhã, com temperatura de 22 °C, umidade relativa do ar de 77% e velocidade do vento de 0,4 m/s. As condições ambientais foram monitoradas com auxílio de um anemômetro portátil com termo-higrômetro acoplado Kestrel[®] (model 4300, Nielsen-Kellerman, EUA). As coletas de material vegetal para todas as análises realizadas nesse trabalho ocorreram 12 dias após a aplicação do herbicida.

Quantificação de ácido chiquímico

A quantificação de ácido chiquímico foi realizada em folhas expandidas localizadas no primeiro e no terceiro nó. Para tal, 25 mg de matéria fresca congelada foi triturada em microtubo com HCl (0,25 N) em uma proporção de 1:10 (g/mL). O extrato foi centrifugado a 15,000 x g por 25 min à temperatura constante de 4 ° C. Posteriormente 30 µL do sobrenadante foi adicionado a 500 µL de ácido periódico (1%) e mantido em banho-maria a 37 °C por 45 min. Em seguida, foram adicionados 300 µL de glicina (0,1 M) e 500 µL de hidróxido de sódio (1 N). A absorbância foi mensurada a 380 nm em espectrofotômetro (modelo Hitachi, U-5100). Foi utilizado o valor do coeficiente de extinção molar de $4,76 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o cálculo da concentração de ácido chiquímico (Singh e Shaner, 1998).

Medição de trocas gasosas

A avaliação de trocas gasosas foi realizada no folíolo central de folhas completamente expandidas do terceiro nó, sem sintomas visuais. As medições foram realizadas no período da manhã (8 às 11 horas) aos 12 dias após a aplicação, com auxílio de um analisador de gases a infravermelho LI- 640 (IRGA, LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA) equipado com fonte de luz azul/vermelho modelo LI-6400-02B. Foram avaliadas a taxa de assimilação de CO₂ (A , µmol CO₂ m⁻² s⁻¹), a condutância estomática (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹) a transpiração (E , mmol H₂O m⁻² s⁻¹), a concentração interna de CO₂ (C_i , µmol CO₂ m⁻² s⁻¹) e a razão entre concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a). A quantificação foi feita com uso de uma fonte de luz artificial saturante (1000 µmol photons.m⁻².s⁻¹) e com uso de fonte externa de CO₂. Após

estabilização, foram feitas três leituras no intervalo de 1 min.

Quantificação de pigmentos fotossintéticos

A quantificação de pigmentos fotossintéticos foi realizada no folíolo central de folhas completamente expandidas localizadas no terceiro nó e sem sintomas visuais. Para tal, três discos foliares de 5 mm cada foram retirados, incubados em 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos a 25 °C e ao abrigo da luz por 72 h. Posteriormente, determinou-se a absorvância nos comprimentos de onda de 663, 656 e 470 nm, em leitor de microplacas (modelo Thermo Fisher Scientific Multiskan Go). A partir dos valores obtidos, foi possível determinar os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, razão *a/b* e carotenoides, respectivamente, de acordo com a fórmula descrita por Wellburn (1994).

Peroxidação lipídica

A quantificação de MDA (TBARS) foi feita com base na metodologia proposta por Hodges et al. (1999). Aproximadamente 200 mg de matéria fresca congelada, de folhas totalmente expandidas localizadas no terceiro nó, foi macerada com etanol 80% (v:v) e centrifugado a 3,000 x g por 10 min. Posteriormente, 1 mL da amostra diluída foi adicionado em um tubo com 1 mL do meio (i) - TBA (ácido tricloroacético (TCA) 20% (m/v) + 0,01% de hidroxitolueno butilado (BHT) e 1 mL em tudo com 1 mL do meio (ii) + TBA (TCA 20% + BHT 0,01% + ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.65%). Os tubos foram agitados vigorosamente e incubados a 95°C por 25 min. Posteriormente, após o resfriamento, foi feita a leitura em espectrofotômetro (440, 532, 600 nm). O cálculo do equivalente de MDA (TBARS) foi feito com base na fórmula proposta por Hodges et al. (1999).

Ensaio enzimáticos

As atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) foram determinadas. O meio de extração para SOD, CAT e POX é composto por tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v). Aproximadamente 300 mg de amostras frescas

congeladas de folhas totalmente expandidas, localizadas no terceiro nó, foram maceradas com nitrogênio líquido e, após adição de 2 mL do meio de extração, submetidas à filtração, centrifugação a 12,000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinação enzimática. As proteínas foram determinadas pela metodologia proposta por Bradford (1976), utilizando o reagente de Bradford e albumina bovina como padrão.

Para a quantificação da SOD (EC 1.15.1.1), 50 µL do extrato foi adicionado a 2,95 mL do meio de reação, composto por tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM. Depois de 5 min de exposição contínua à luz fluorescente, foi mensurada a fotoredução do NBT em espectrofotômetro a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). A unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

Para a quantificação da CAT (EC 1.11.1.6), 100 µL do extrato foi adicionado a 2,9 mL do meio de reação constituído por tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e McHale 1987). A redução da absorbância a 240 nm foi verificada no primeiro minuto da reação, à temperatura de 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 39,4 mM⁻¹cm⁻¹ foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática.

Para a quantificação da POX (EC 1.11.1.7), 0,1 mL do extrato foi adicionado a 2,9 mL do meio de reação, composto por tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar e Mishra, 1976). O incremento na absorbância a 420 nm foi verificado no primeiro minuto de reação, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹cm⁻¹ foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática (Chance e Maehley, 1955).

Ensaio cometa

A verificação de danos do DNA, foi feita a partir de dois discos foliares, de 5 mm de diâmetro, do folíolo central de folhas expandidas do terceiro nó e sem sintomas visuais de fitotoxicidade. Sobre uma superfície a 4 °C, os fragmentos foram dispostos em placa de Petri contendo 300 µL de tampão de isolamento (400 mM Tris-HCl, pH 7.5 e 20% polietileno-glicol), retalhados por meio de *slice*, e incubados por 5 min neste tampão (Ojima et al., 2009; Costa et al., 2018). Posteriormente, 40 µL da suspensão nuclear foram cuidadosamente misturados a 60 µL de agarose 1% *low melting point* em tampão fosfato salino PBS a 39 °C. O material foi homogeneamente distribuído sobre lâmina coberta 24 h antes com uma fina camada de 1%

agarose *normal melting point* em dH₂O (Liao et al., 2009; Costa et al., 2018). As lâminas foram cobertas com lamínulas (24 x 50 mm) e mantidas a 4 °C por 15 min (Azqueta e Collins, 2013; Costa et al., 2018). A lamínula foi retirada, e a lâmina foi disposta horizontalmente em cuba de eletroforese com tampão recém preparado (250 mM de Tris, 10 mM de NaOH e 1 mM de EDTA, pH ~ 12) a 4 °C (Azqueta e Collins, 2013; Costa et al., 2018). As lâminas foram incubadas por 5 min neste tampão e submetidas à eletroforese a 0,8 V por 15 min a 4 °C. As lâminas foram lavadas três vezes por 5 min em tampão de neutralização (400mM de Tris, pH 7.5), e coradas com 100 µL de 50 µM acridine orange (Gichner et al., 2009; Azqueta e Collins, 2013; Costa et al., 2018). As lâminas foram lavadas em dH₂O a 4 °C para retirada do excesso de corante, e visualizadas em fotomicroscópio de fluorescência OlympusTM BX60 equipado com câmera CCD 12 bits (OlympusTM DP71) e filtro WB para detecção da fluorescência de acridine orange. Pelo menos 10 frames contendo nucleoides foram aleatoriamente fotodocumentados usando a objetiva de 20x e tempo de exposição de 1/1.8s no Image ProPlus 6.1 (Media Cybernetics®). A quantificação dos nucleoides com e sem cauda foi feita com auxílio do software Image J. O critério de avaliação foi realizada por meio da contagem dos nucleoides sem e com cauda (cometas). A contagem foi realizada em quatro lâminas por tratamento (n=4) com avaliação de 300 nucleoides por lâmina, totalizando 1200 núcleos por tratamento. O cálculo da frequência de cometas foi realizado por meio da fórmula: frequência (%) = (número de nucleoides com cauda / número total de nucleoides observados) x 100.

Localização in situ de morte celular

Discos foliares de 5 mm de diâmetro foram retirados do folíolo central, na região mediana, de folhas jovens do primeiro nó e folhas expandidas do terceiro nó, sem sintomas visuais, e foram incubados em Azul de Evans 0,25% (v/v) por cinco horas a 25 °C (Turner e Novacky, 1974 adaptado por Romero-Puertas et al., 2004). Posteriormente, as amostras foram clarificadas em etanol 95% a 80 °C por 24 h. Os discos foliares foram observados em microscópio estereoscópico (modelo Olympus SZX7) e fotografados com câmera digital (Samsung Galaxy A50, 25 mp). Regiões com morte celular adquiriram coloração azul.

Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo cinco

tratamentos com quatro repetições. Os dados obtidos foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade de variância e, posteriormente, submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), com auxílio do software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

A aplicação do glifosato promoveu incremento de ácido chiquímico nas folhas de *J. princeps* (Fig. 1). Nas folhas jovens, houve acúmulo significativo de ácido chiquímico na dose de 1440 g.ia.ha⁻¹, com aumento de 167,7% em relação ao controle. O acúmulo foi significativamente maior nas folhas expandidas nas doses de 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹, com incremento respectivamente de 77,7% e 118,1% em relação ao controle. Em todas as plantas tratadas com glifosato ocorreu maior acúmulo de ácido chiquímico nas folhas jovens em comparação com as folhas expandidas. Não ocorreu variação significativa entre o conteúdo de ácido chiquímico de folhas jovens em relação as folhas expandidas no tratamento controle (Fig. 1).

As plantas expostas ao glifosato apresentaram alterações nos valores de taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs) e taxa transpiratória (E) (Fig. 2 A-E). Os efeitos em A foram mais pronunciados em plantas expostas a 1440 g.ia.ha⁻¹, com redução de 47,1% (Fig. 2 A). A gs reduziu significativamente em 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 2 B), com diminuição de 54,7% e 66,7%, respectivamente, em relação ao controle. Os valores médios de E reduziram significativamente em 1440 g.ia.ha⁻¹ com diminuição de 58,2% em relação ao controle (Fig. 2 C). Os valores médios de Ci (Fig. 2 D) e da relação Ci/Ca (Fig. 2 E) não variaram significativamente entre o controle e as plantas tratadas com glifosato.

Para os pigmentos fotossintéticos, menores valores de clorofila *a* foram encontrados nos tratamentos com 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 3 A), com redução de 35,2% e 23,6%, respectivamente, em relação ao controle. A clorofila *b* reduziu 35,8% e 29,7% em relação ao controle em 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 3 B), respectivamente. A clorofila total reduziu 21,9%, 37,7% e 28,2% nas doses de 360, 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ respectivamente (Fig. 3 C). A razão clorofila *a/b* (Fig. 3 D) e os carotenoides (Fig. 4 D) não variaram significativamente entre as doses aplicadas.

O aumento na concentração de glifosato promoveu aumento na peroxidação lipídica, sendo os maiores valores encontrados em 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 4 A). Essas doses de glifosato resultaram no aumento significativo da peroxidação lipídica de 91,8% e 121,8%,

respectivamente, em relação ao controle.

Considerando as enzimas do sistema antioxidativo, a superóxido dismutase (SOD) e a peroxidase (POX) apresentaram maior atividade em plantas tratadas com o herbicida. A SOD teve atividade 1687,2% superior em relação ao controle em 1440 g.ia.ha⁻¹ (Fig. 4 B). Maior atividade da POX foi observada em 360, 720 e 1440g.ia.ha⁻¹ (Fig. 4 C) com aumento de 280,3%, 266,1% e 363,3%, respectivamente, em relação ao controle. A atividade da catalase (CAT) não variou significativamente entre o controle e as doses aplicadas (Fig. 4 D).

A exposição ao glifosato promoveu aumento significativo na frequência de cometas em *J. princeps* para todas as doses avaliadas (Fig. 5). A frequência média de cometas foi superior em 110,9%, 153,9%, 221,9% e 574,2% nas doses de 180, 360, 720 e 1440 g.ia.ha⁻¹ respectivamente, em relação ao controle.

A morte celular promovida pelo glifosato foi detectada por meio das porções foliares coradas com Azul de Evans (Fig. 6). A reação positiva ocorreu a partir da dose de 180 g.ia.ha⁻¹ para folhas jovens (Fig. 6 B – E) e de 360 g.ia.ha⁻¹ para folhas expandidas (Fig.6 G – J). A reação foi mais intensa no entorno das nervuras de segunda ordem. Secções transversais nessa região (Fig. 6 M e N) indicam uma reação mais intensa nas células do mesofilo, com destaque para o parênquima paliçádico. Folhas jovens apresentaram maiores extensões com reação positiva nas duas maiores doses (Fig. 6 D – E) em comparação às folhas expandidas (Fig. 6 I – J). Plantas do controle não apresentaram reação positiva (Fig. 6 A, F, K e L).

Discussão

Confirmando nossa hipótese, o glifosato promoveu alterações nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliados em *J. princeps*, principalmente nas maiores doses (720 e 1440 g.ia.ha⁻¹). Em adição, o herbicida apresentou efeito genotóxico e induziu a morte celular em todas as doses aplicadas.

O maior acúmulo de ácido chiquímico em plantas expostas ao herbicida sugere que o glifosato promoveu inibição da EPSPS em *J. princeps*. O acúmulo de ácido chiquímico é um biomarcador em plantas sensíveis expostas ao glifosato (Schrübbbers et al., 2014; Rezende-Silva et al., 2019; Freitas-Silva et al., 2020; Cruz et al., 2021). Freitas-Silva et al. (2020) verificaram que entre duas espécies nativas a mais sensível apresentava maior acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos foliares.

Neste estudo, os maiores teores de ácido chiquímico foram encontrados em folhas jovens, corroborando com dados que mostraram que a translocação do glifosato ocorre principalmente no sentido dos fotoassimilados para regiões mais ativas metabolicamente (Gomes et al., 2014; Nguyen et al., 2016; Singh et al., 2020). Maior acúmulo de ácido chiquímico também foi observado em folhas jovens de *Coffea arabica* (Schrübbbers et al., 2014) e *Pouteria torta* (Rezende-Silva et al., 2019) tratadas com glifosato. Folhas em desenvolvimento funcionam como drenos e dependem da importação de carboidratos de folhas mais velhas que possuem aparato fotossintético funcional (Turgeon, 1989; Pantin et al., 2011).

Nós verificamos que o glifosato promoveu desordem nos parâmetros fotossintéticos em *J. princeps*, apesar da fotossíntese não ser o principal alvo da ação deste herbicida (Duke et al., 2003). Respostas similares também foram relatadas para espécies nativas expostas ao glifosato, como *Pouteria torta* (Batista et al., 2018), *Cenostigma macrophyllum* (Santos et al., 2020) e *Eugenia uniflora* (Cruz et al., 2021). A redução em *A* ocorreu em virtude da limitação estomática, uma vez que houve redução em *g_s* e *E*. As células guarda integram um dos sistemas mais susceptíveis às alterações promovidas pelo glifosato (Yamada e Castro, 2007). Portanto, os estômatos de *J. princeps* podem ter sido afetados diretamente pelo glifosato como consequência da absorção do herbicida via cutícula, promovendo o fechamento estomático e assim a redução da transpiração. Resultados similares foram observados por Santos et al., (2020) em *Cenostigma macrophyllum*.

A manutenção de *C_i* da relação *C_i/C_a* em plantas submetidas ao glifosato sugere que as alterações nas trocas gasosas ocorreram majoritariamente como consequência da limitação estomática em *J. princeps*. A relação *C_i/C_a* é um parâmetro importante para caracterizar o efeito de limitações estomáticas e não estomáticas na fotossíntese (Farquhar e Sharkey, 1982). Além disso, a redução da performance fotossintética pode ocorrer também como resultado da peroxidação lipídica e da redução no conteúdo de pigmentos fotossintéticos em plantas expostas ao glifosato (Zobiolo et al., 2011; Zhong et al., 2018).

A redução no teor de clorofila *a*, *b* e total em *J. princeps* pode estar relacionada com a interferência na biossíntese e/ou a degradação destes compostos, promovida pelo glifosato, assim como reportado por Gomes et al., (2014) e Gomes et al. (2016c). Alterações na concentração de pigmentos fotossintéticos são comuns em plantas sob condições de estresse (Zhong et al., 2018). O glifosato promove a redução na produção ácido aminolevulínico (ALA), um precursor na biossíntese da clorofila (Kitchen et al., 1981; Gomes et al., 2016c). Este herbicida também possui propriedades quelantes e promove a diminuição nos teores de

magnésio, um importante macronutriente presente na molécula de clorofila (Cakmak et al., 2009). Em adição, a superprodução de ROS e a peroxidação lipídica, também observadas neste estudo, promovem a degradação de lipídios na membrana dos cloroplastos e de pigmentos fotossintéticos (Somashekaraiah et al., 1992; Gomes et al., 2016c; Armendariz et al., 2016).

O aumento na atividade das enzimas SOD e POX desempenharam um importante papel na defesa bioquímica aos danos oxidativos e regulação da peroxidação lipídica em *J. princeps* frente ao herbicida glifosato. A SOD é a primeira enzima na linha de defesa contra as ROS, atuando na conversão de radical superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e O_2 (García-Caparrós et al., 2020). A POX atua na conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), desempenhando importante papel na redução de ROS em plantas sob estresse (Hasanuzzaman et al., 2020b). O aumento na atividade da POX também foi verificado em *Pouteria torta* (Rezende-Silva et al., 2019) e *Handroanthus chrysotrichus* (Freitas-Silva et al., 2020) expostas ao glifosato. Assim como nós constatamos, Rezende-Silva et al. (2019) sugeriram que a atividade da POX é um biomarcador em plantas sensíveis expostas ao glifosato, mesmo em baixas doses.

As alterações bioquímicas, evidenciadas neste estudo pela superprodução de enzimas do sistema antioxidativo, indicam que o glifosato também promove estresse oxidativo em *J. princeps*. A produção de ROS e o estresse oxidativo são um efeito indireto do glifosato (Gomes et al., 2016c). As ROS são moléculas altamente reativas que podem promover alterações incluindo peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos (Piasecki et al., 2019; García-Caparrós et al., 2020). Estas moléculas podem promover efeitos citotóxicos e genotóxicos como verificado por Mercado e Caleño (2020) em *Allium cepa* com sistema radicular exposto ao herbicida glifosato. Efeitos clastogênicos e aneugênicos também podem ser promovidos por ROS além de alterações fenotípicas incluindo danos no aparato fotossintéticos, podendo comprometer o metabolismo e o desenvolvimento vegetal acarretando morte celular e necrose (Minina et al., 2013; Nisa et al., 2019; Sychta et al., 2021; Cruz et al., 2021).

A peroxidação lipídica em *J. princeps*, a qual foi evidenciada pelo aumento de MDA, promoveu alterações na permeabilidade das membranas nas maiores doses do herbicida. A perda da permeabilidade das membranas associada ao aumento do estresse oxidativo promovidos por ROS pode resultar em necrose (Minina et al., 2013; Mittler, 2017). O comprometimento da integridade das membranas ocorre nos estágios iniciais da morte celular por necrose e é um dos principais indicativos de citotoxicidade (Gill e Tuteja, 2010; Minina et al., 2013). A morte celular foi evidenciada pela reação com Azul de Evans, confirmando o

efeito citotóxico do glifosato em *J. princeps*, tanto em folhas expandidas nas maiores doses quanto em folhas jovens em todas as doses. Curiosamente a reação mais intensa ao Azul de Evans ocorreu no parênquima paliçádico. Os cloroplastos são uma das principais fontes da produção de ROS em plantas sob estresse (Piasecki et al., 2019). Possivelmente a reação mais intensa no parênquima paliçádico é consequência do maior estresse oxidativo neste tecido visto o grande número de cloroplastos.

O aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidativo não foi suficiente para evitar danos ao DNA de *J. princeps*, os quais foram mais frequentes nas maiores doses do herbicida. O ensaio cometa é utilizado para verificação de danos no DNA, incluindo quebras de fita simples e dupla, oxidação e fragmentação de bases, sítios apurínicos e apirimidínicos (Khateeb, 2017; He et al., 2018). Nós evidenciamos o efeito genotóxico do glifosato em *J. princeps* para todas as doses empregadas. Com base nos resultados, a genotoxicidade do glifosato em *J. princeps* é dose-dependente em virtude do aumento do valor médio de cometas com o incremento da concentração do herbicida.

Curiosamente, neste estudo, mesmo na menor dose do herbicida ocorreu aumento significativo na frequência de danos no DNA, assim como marcação para azul de Evans em folhas jovens, apesar da ausência de alterações nos parâmetros metabólicos avaliados. A morte celular em plantas pode ocorrer sob condições de estresse por xenobióticos e é caracterizada por processo que incluem aumento do nível de compactação da cromatina (heterocromatinização), degradação do DNA, acúmulo de ROS e perda da integridade da membrana plasmática (Reape e McCabe, 2008; Minina et al., 2013; Sychta et al., 2021). Neste contexto, encorajamos estudos futuros com espécies nativas para a avaliação dos níveis de expressão de genes relacionados com as vias de reparo do DNA. Essas vias de reparo são importantes na proteção e tolerância contra danos genéticos, garantindo estabilidade genômica em plantas sob condições de estresse (Singh et al. 2010; Manova e Gruszka, 2015).

Nosso estudo demonstra que o glifosato pode promover efeitos deletérios no metabolismo e genoma de espécies vegetais não-alvo como como *J. princeps*, inclusive na ausência de danos visuais e em baixas doses. Nós encorajamos a utilização de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e genotóxicos na avaliação prognóstica de danos promovidos pelos herbicidas e outros xenobióticos. Estes parâmetros podem ser biomarcadores úteis em estudos ecotoxicológicos de campo com espécies nativas não-alvo, não se restringindo apenas a espécies modelo em condições laboratoriais.

Conclusão

Tomados juntos, nossos resultados sugerem que *J. princeps* é uma espécie sensível ao glifosato devido às alterações nos parâmetros metabólicos e de genotoxicidade. A aplicação do herbicida promoveu acúmulo de ácido chiquímico e desordens no aparato fotossintético que resultaram em estresse oxidativo. Apesar do aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidativo frente a aplicação do herbicida, o acúmulo de ROS promoveu peroxidação lipídica e genotoxicidade em todas as doses aplicadas, resultando em morte celular em todas as doses. Essas respostas foram úteis no prognóstico de danos em *J. princeps* pelo glifosato em folhas sem sintomas visuais e podem ser promissoras no biomonitoramento deste herbicida no ambiente a partir de espécies nativas.

Agradecimentos: Nós agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro, por meio da bolsa de mestrado concedida a H. H. Araújo e a bolsa de produtividade concedida a L. C. Silva. Ao Leonardo, Cláudio, Daniel e Vinícius pelo auxílio no processamento e análise das amostras para trocas gasosas e ensaios enzimáticos.

Referências

- Andrade GC, Castro LN, Silva LC (2020) Micromorphological alterations induced by simulated acid rain on the leaf surface of *Joannesia princeps* Vell. (Euphorbiaceae). *Ecological Indicators* 116: 106526.
- Armendariz AL, Talano M A, Travaglia C, Reinoso H, Wevar-Oller AL, Agostini E (2016) Arsenic toxicity in soybean seedlings and their attenuation mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry* 98: 119–127.
- Azqueta A, Collins AR (2013) The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*. 87(6): 949–968.
- Batista PF, Costa AC, Megguer CA, Lima JS, Silva FB, Guimarães DS, Nascimento KJT (2018) *Pouteria torta*: a native species of the Brazilian Cerrado as a bioindicator of glyphosate action. *Braz J Biol* 78: 296–305.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44 (1): 276-287.
- Boutin C, Strandberg B, Carpenter D, Mathiassen SK, Thomas PJ (2014) Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications?. *Environmental Pollution*. 185: 295-306.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Cakmak I, Yazici A, Tutus Y, Ozturk L (2009) Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *Eur. J. Agron.* 31: 114–119.
- Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Clark J (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23:458-460.
- Corpas FJ (2015) What is the role of hydrogen peroxide in plant peroxisomes?. *Plant Biol. (Stuttg)*. 17: 1099–1103.
- Costa NLB, Carvalho CR, Clarindo WR (2018) Improved Procedures to Assess Plant Protoplast Viability: Evidencing Cytological and Genomic Damage. *Cytologia*. 83: 397-405.
- Cruz CES, Freitas-Silva L, Ribeiro C, Silva LC (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.
- Donley N (2019) The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. *Environ Health* 18: 44 .
- Duke SO, Baerson SR, Rimando A M (2003). “Herbicides: glyphosate,” In: *Encyclopedia of Agrochemicals*. Plimmer JR, Gammon DW, Ransdale NN (eds). New York, NY: John Wiley e Sons. 10.1002/047126363X.agr119
- Farquhar GD, Sharkey TD (1982) Stomatal Conductance and Photosynthesis. *Plant Physiology* 33: 317-345.
- Finley JW, Duke SO (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 JE (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 TO, Nunes-Nesi A, Ribeiro C, Costa AC, Silva LC (2020) Evaluation of morphological and metabolic responses to glyphosate exposure in two neotropical plant species. *Ecological Indicators* 113: 1-11.
- Freitas-Silva L, Rodríguez-RuizM, Houmani H, da Silva LC, Palma JM, Corpas FJ (2017) Glyphosate-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* affecting peroxisomal metabolism and triggers activity in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway (OxPPP) involved in NADPH generation. *J Plant Physiol* 218: 196–205.

García-Caparrós P, De-Filippis L, Gul A, Hasanuzzaman M, Ozturk M, Altay V, Lao M T (2020) Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. *The Botanical Review*.

Ghosh P, Thakurb I, Kaushik A (2017) Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: a review. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 141: 259-270.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology.* 59(2): 309-14.

Gichner T, Znidar I, Wagnerc ED, Plewac MJ (2009) The use of higher plants in the Comet assay. In: Dhawan, A., e Anderson, D. (Eds.). *The Comet Assay in Toxicology. Issues Toxicol.* No 9. <https://doi.org/10.1039/9781847559746>

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.

Gomes MP, Cruz FVS, Borges Fv, Fonseca MB, Garcia QS (2016 b) Modulation of *Dimorphandra wilsonii* Rizz. seed germination through H₂O₂ production in response to Zn interference of the mitochondrial electron transport chain. *Environ. Exp. Bot.* 128: 51-58.

Gomes MP, Le Manac'h SG, Maccario S, Labrecque M, Lucotte M, Juneau P (2016c) Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 130: 65–70.

Gomes MP, Le Manac'h SG, Moingt M, Smedbol E, Paquet S, Labrecque M, Lucotte M, Juneau P (2016 a) Impact of phosphate on glyphosate uptake and toxicity in willow. *J. Hazard. Mater* 304: 269-279.

Gomes MP, Richardi VS, Bicalho EM, Rocha DC, Navarro-Silva MA, Soffiatti P, Garcia QS, Sant'Anna-Santos BF (2019) Effects of ciprofloxacin and roundup on seed germination and root development of maize. *Science of The Total Environment* 651: 2671-2678.

Gomes MP, 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. *J. Exp. Bot.* 65: 4691–4703.

Gravena R, Filho RV, Alves PLCA, Mazzafera P, Gravena AR (2012) Glyphosate has low toxicity to citrus plants growing in the field. *Can J Plant Sci* 92: 119–127.

Hasanuzzaman M, Mohsin SM, Bhuyan MHMB, Bhuiyan TF, Anee TI, Masud AAC, Nahar K (2020a) Phytotoxicity, environmental and health hazards of herbicides: challenges and ways forward. In: *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation.* Prasad MNV (eds) 55–99.

Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JÁ, Fujita M, Fotopoulos V (2020b) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9(8): 681.

Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84: 450-455.

He H, Van Breusegem F, Mhamdi A (2018) Redox-dependent control of nuclear transcription in plants. *Journal of Experimental Botany* 69(14): 3359–3372.

Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (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.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2020) Os 10 ingredientes ativos mais vendidos – 2019. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2019/Os_10_IAs_vendidos_2019.xls (Accessed 1 March 2021).

Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57: 315-319.

Khan A, Kumar V, Srivastava A, Saxena G, Verma PC (2021) Biomarker-based evaluation of cytogenotoxic potential of glyphosate in *Vigna mungo* (L.) Hepper genotypes. *Environ. Monit. Assess.* 193(2): 73.

Kitchen LM, Witt WW, Rieck CE (1981) Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. *Weed Sci.* 29: 513–516.

Külkamp J (2020) *Joannesia* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17586> (Accessed 3 March 2021).

Liao W, McNutt MA, Zhu, WG (2009) The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*. 48(1): 46–53.

Lorenzi H (2016) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. V. 1-2, 7 ed., Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

Manova V, Gruszka D (2015) DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Front. Plant Sci.* 6: 885.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2020) Resumo do registro de agrotóxicos, componentes e afins (2005-2020). Brasil: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/arquivos/registros-concedidos-2005-2020-site-mapa.xlsx/view (Accessed Mar 3, 2021).

Maroli AS, Nandula V, Dayan FE, Duke E, Gerard P, Tharayil N (2015) Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an *Amaranthus palmeri* biotype. *Journal Agricultural Food Chemistry* 63: 9199-9209.

McCabe PF, Levine A, Meijer PJ, Tapon NA, Pennell RI (1997) A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J.* 12: 267–280.

Mercado SAS, Caleño JDQ (2020) Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. *Science of the Total Environment* 700: 134452- 134465.

Minina EA, Filonova LH, Sanchez-Vera V, Suarez MF, Daniel G, Bozhkov PV (2013) Detection and Measurement of Necrosis in Plants. In: McCall K, Klein C (Eds.). (2013) *Necrosis. Methods in Molecular Biology*, vol 1004. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-383-1_17

Mittler R (2017) ROS are good. *Trends in Plant Science* 22: 11-19.

Mobin M, Wu CH, Tewari RK, Paek KY (2015) Studies on the glyphosate-induced amino acid starvation and addition of precursors on caffeic acid accumulation and profiles in adventitious roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120:291–301.

Myers NRA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.

Nguyen TH, Malone JM, Boutsalis P, Shirley N, Preston C (2016) Temperature influences the level of glyphosate resistance in barnyardgrass (*Echinochloa colona*). *Pest Manag Sci* 72(5): 1031-1039.

Nisa MU, Huang Y, Benhamed M, Raynaud C (2019) The plant DNA damage response: signaling pathways leading to growth inhibition and putative role in response to stress conditions. *Frontiers in Plant Science* 10: 653.

Ojima Y, Nishioka M, Matsumoto M, Taya M (2009) Quantification of DNA damage by the comet assay in radish sprouts exposed to excess light irradiation. *Biochemical Engineering Journal*. 46(1): 69–72.

Pantin F, Simonneau T, Rolland G, Dauzat M, Muller B (2011) Control of leaf expansion: a developmental switch from metabolics to hydraulics. *Plant Physiol.* 156 (2): 803-15.

Piasecki C, Carvalho IR, Cechin J, Goulart FAP, Maia LC, Agostinetto D, Caverzan A, Stewart Jr. CN, Vargas L (2019) Oxidative stress and differential antioxidant enzyme activity in glyphosate-resistant and sensitive hairy fleabane in response to glyphosate treatment. *Bragantia* 78(3): 379-396.

Pospisil P, Yamamoto Y (2017) Damage to photosystem II by lipid peroxidation products. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* 1861(2): 457-466.

Reape TJ e McCabe PF (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist* 180(1): 13–26.

Rezende-Silva SL, Costa AC, Dyszy FH, Batista PF, Crispim-Filho AJ, Nascimento KJT, Silva (2019) *Pouteria torta* is a remarkable native plant for biomonitoring the glyphosate effects on Cerrado vegetation. *Ecological Indicators*.102: 497-506.

Romero-Puertas MC, Rodriguez-Serrano M, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 in pea leaves. *Plant, Cell and Environment*. 27(9): 1122–1134.

Santos CLV, Pourrut B, Oliveira JMPF (2015) The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Frontiers in Genetics*. 6: 216.

Santos VRS, Filho AJC, Santana MM, Costa AC, Silva KLS (2020) Análises fisiológicas e morfoanatômicas de *Cenostigma macrophyllum* tul. (Fabaceae) submetida a diferentes concentrações de glifosato. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais* 11: 159–173.

Schrübbers LC, Valverde BE, Sørensen JC, 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.

Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, Kohli SK, Yadav P, Bali AS, Parihar RD, Dar OI, Singh K, Jasrotia S, Bakshi P, Ramakrishnan M, Kumar S, Bhardwaj R, Thukral AK (2019) Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* 1: 1446.

Silva LC, Araújo TO, Siqueira-Silva AI, Pereira TAR, Castro, LN, Silva ED, Oliva MA, Azevedo AA (2017) *Clusia hilariana* and *Eugenia uniflora* as bioindicators of atmospheric pollutants emitted by an iron pelletizing factory in Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24(36): 28026-28035.

Silva LC, Azevedo AA, Silva EAM, Oliva MA (2000) Fluoride in simulated rain: symptomatology and effects on leaf structure and on growth of woody plants. *Braz. J. Bot.* 23(4): 385–393.

Silva LC, Azevedo AA, Silva EAM, Oliva MA (2005) Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). *Aust. J. Bot.* 53: 789–796.

Singh BK, Shaner DL (1998) Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate - resistant plants. *Weed Technol.* 12: 527–530.

Singh S, Kumar V, Datta S, Wani AB, Dhanjal DS, 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.

Singh S, Choudhury S, Sengupta D (2010) DNA repair and recombination in higher plants: insights from comparative genomics of *Arabidopsis* and rice. *BMC Genom.* 11: 443.

Soares C, Martins RPM, 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.

Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.* 85 (1): 85–89.

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.

Turgeon R (1989) The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 119–138.

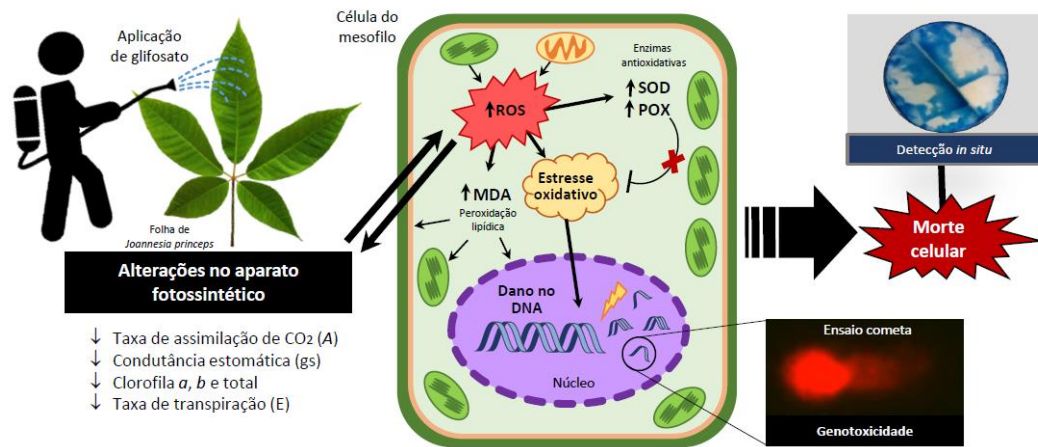
Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology.* 144: 307–313.

Yamada T, Castro PRC (2007) Efeitos do glyphosate nas plantas: Implicações fisiológicas e agronômicas. *IPNI - Informações Agronômicas.* 119: 1-32.

Zhong G, Wu Z, Yin J, Chai L (2018) Responses of *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle and *Vallisneria natans* (Lour.) Hara to glyphosate exposure. *Chemosphere* 193: 385–393.

Zobiolo LHS, Kremer RJ, Oliveira-Junior JRSS, Constantin J (2011) Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99(1): 53-60.

Figuras



Resumo gráfico

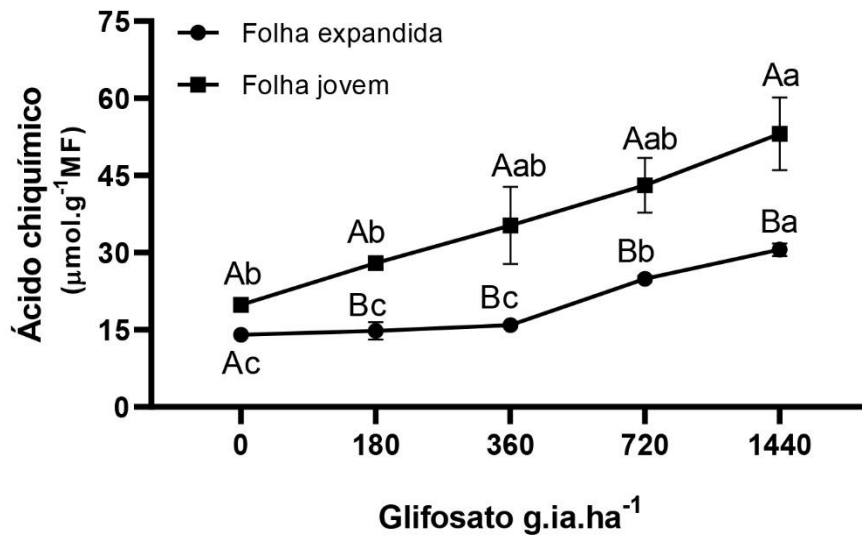


Fig. 1. Quantificação de ácido chiquímico em folíolos de folhas jovens e folhas expandidas de *Joannesia princeps* submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam folhas dentro de um mesmo tratamento e letras minúsculas comparam folhas em um mesmo estágio de desenvolvimento em diferentes tratamentos. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

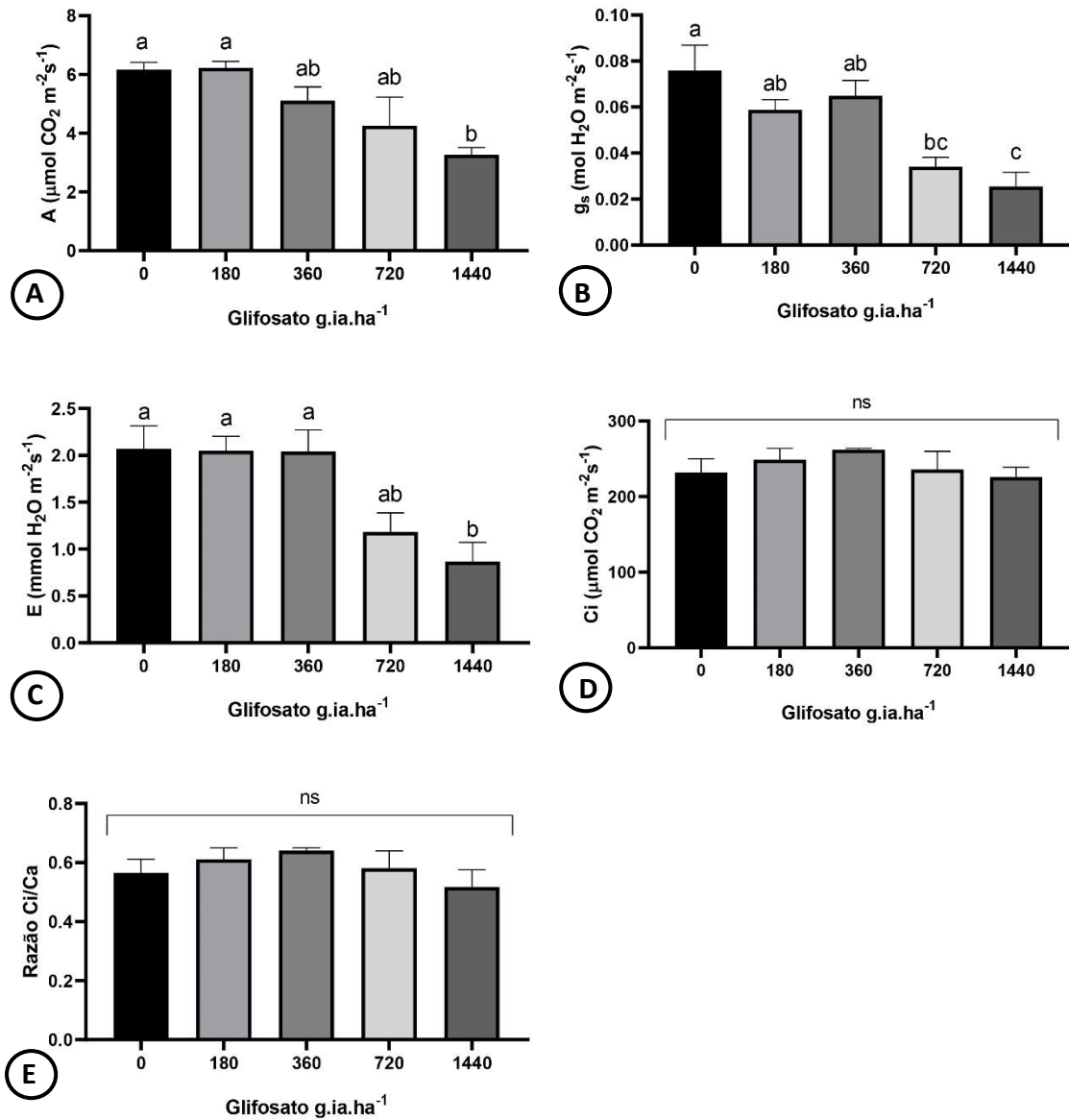


Fig. 2. Trocas gasosas em folíolos de folhas expandidas de *Joannesia princeps* submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Assimilação de CO₂ – A (A); Condutância estomática – g_s (B); Transpiração – E (C); Concentração interna de CO₂ – C_i (D); Razão C_i/C_a (E). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

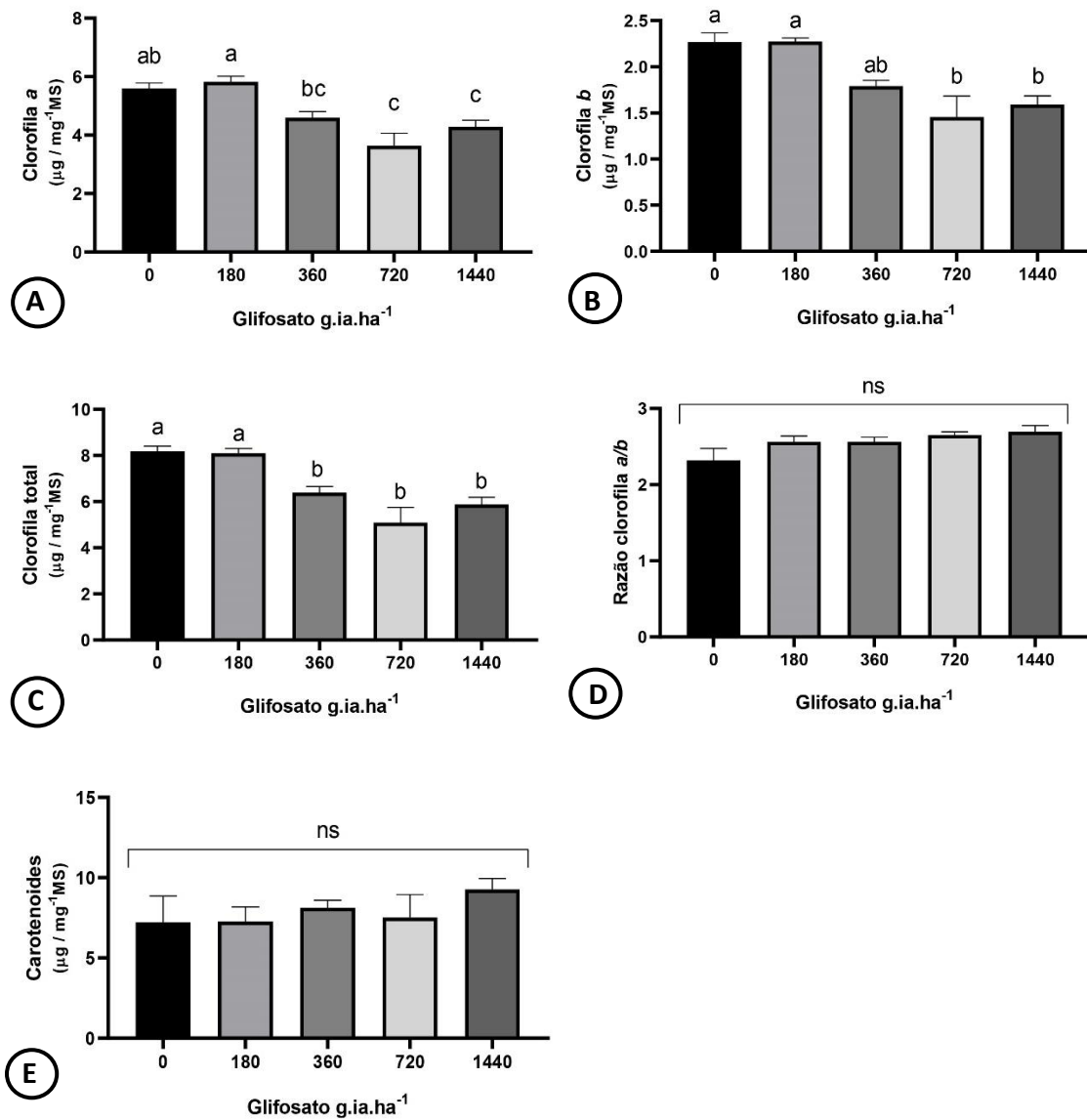


Fig. 3. Quantificação de pigmentos fotossintéticos em folíolos de folhas expandidas de *Joannesia princeps* submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Clorofila *a* (A); Clorofila *b* (B); Clorofila total (C); Razão clorofila *a/b* (D); Carotenoides (E). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão (n=4).

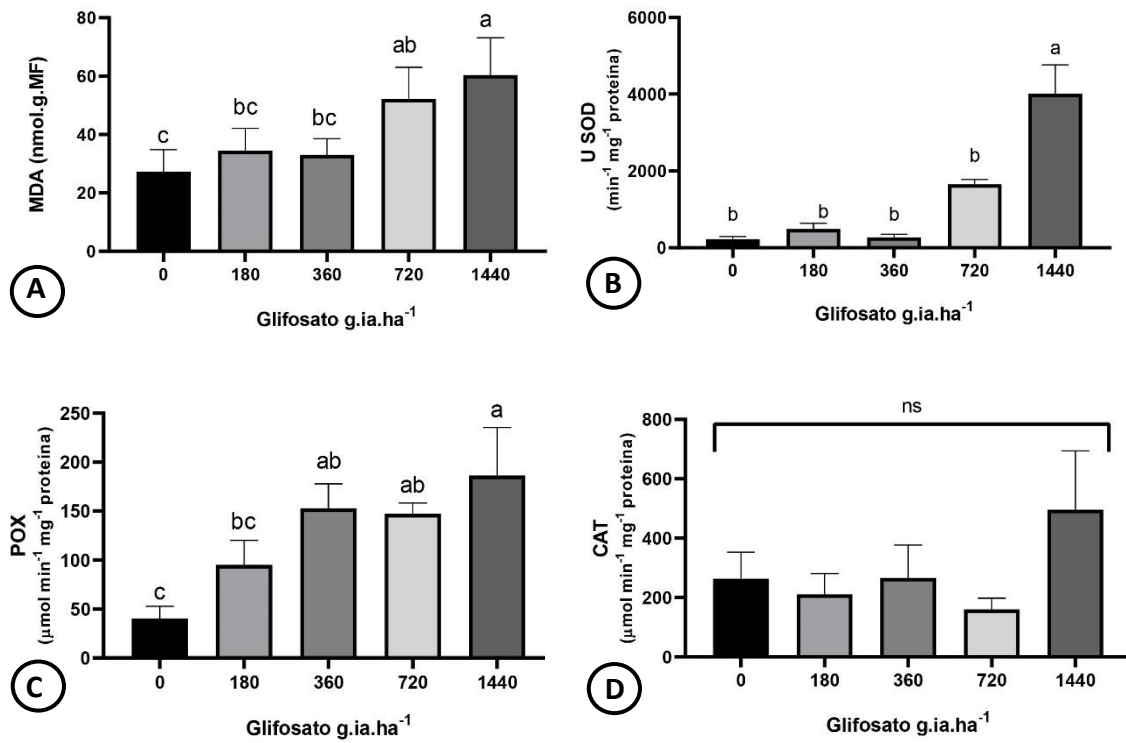


Fig. 4. Quantificação bioquímica da peroxidação lipídica (n=4) e enzimas do sistema antioxidativo (n=3) em folíolos de folhas expandidas de *Joannesia princeps* submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Malonaldeído – MDA (A); Superóxido dismutase – SOD (B); Peroxidase – POX (C); Catalase – CAT (D). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão.

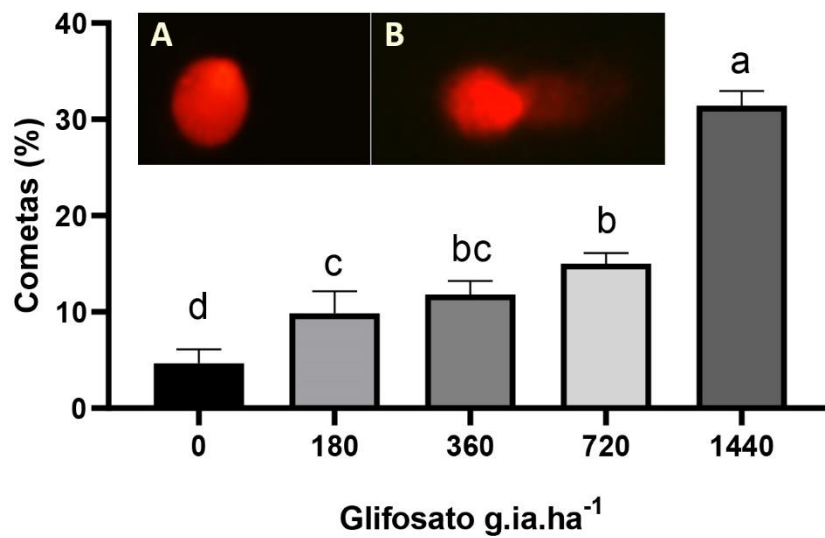


Fig. 5 . Freqüência de cometas em folíolo de folhas expandidas de *Joannesia princeps* submetida a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. (A) Nucleoide sem cometa – 0 g.ia.ha⁻¹ e (B) nucleoide com cometa – 1440 g.ia.ha⁻¹. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Barras verticais representam o desvio padrão (n=4).

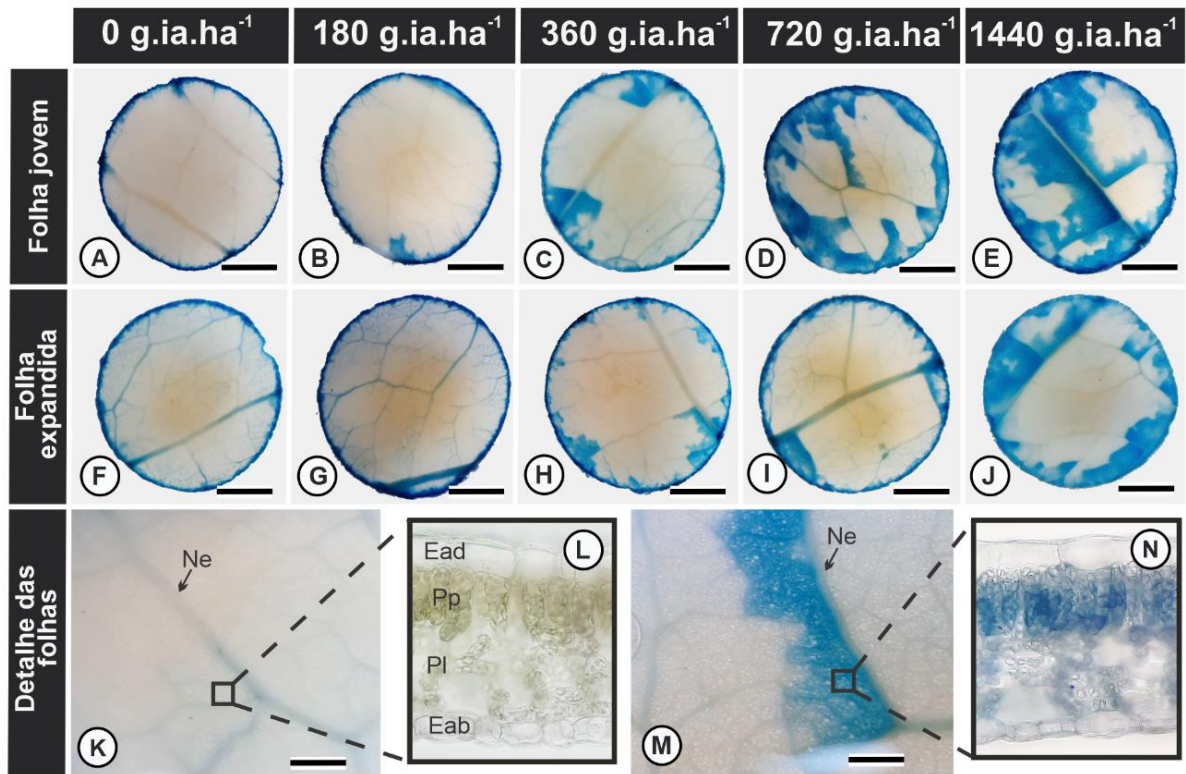


Fig. 6. Detecção *in situ* de morte celular em discos foliolares de *Joannesia princeps* submetidos a doses crescentes do herbicida glifosato 12 dias após a aplicação. Foliolo de folha jovem (A-E); Foliolo de folha expandida (F-J) e detalhe das folhas (K – N). Controle (A, F, K e L). Submetida a dose de 180 g.ia.ha⁻¹ (B e G); 360 g.ia.ha⁻¹ (C e H); 720 g.ia.ha⁻¹ (D e I); 1440 g.ia.ha⁻¹ (E, J, M e N). Eab (epiderme da face abaxial); Ead (epiderme da face adaxial); Ne (nervura de segunda ordem); Pl (parênquima lacunoso); Pp (parênquima paliçádico). Barras: (A-J) = 0,2 cm e (K e M) = 200 μ m.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados sugerem que *J. princeps* é uma espécie sensível ao glifosato devido as alterações nos parâmetros morfoanatômicos, metabólicos e de genotoxicidade. A aplicação do herbicida promoveu acúmulo de ácido chiquímico e desordens no aparato fotossintético que resultaram em estresse oxidativo. Apesar do aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidativo, o acúmulo de ROS promoveu peroxidação lipídica e genotoxicidade em todas as doses aplicadas, resultando em morte celular. Em decorrência do estresse oxidativo e alterações metabólicas, ocorreram alterações visuais e na anatomia de folhas e caules. Folhas jovens foram mais afetadas visualmente e estruturalmente, devido ao maior acúmulo de ácido chiquímico. No entanto, folhas sem sintomas visuais também apresentaram alterações estruturais.

Os biomarcadores identificados em *J. princeps* foram úteis na avaliação diagnóstica e prognóstica de danos promovidos pelo glifosato e podem ser utilizadas no biomonitoramento ambiental a partir de espécies nativas. Devido as alterações visuais, *J. princeps* é uma espécie bioindicadora promissora em estudos de biomonitoramento de glifosato no ambiente. A facilidade na propagação, rápida germinação e desenvolvimento reforçam o potencial desta espécie nestes estudos, podendo ser útil também na avaliação de outros agentes xenobióticos.

Em adição, nossos dados demonstram que o glifosato pode promover alterações deletérias em espécies não-alvo, como *J. princeps*, mesmo na ausência de sintomas visuais e em baixas doses. Desse modo, encorajamos que estudos futuros utilizem biomarcadores anatômicos (estruturais e histoquímicos) e de genotoxicidade na avaliação de danos promovidos pelo glifosato em espécies vegetais. Encorajamos, também, a realização de avaliações em órgãos como o caule, que podem fornecer informações úteis na caracterização de danos pelo herbicida, e na compreensão de alterações em processos como a lignificação, e suas implicações.