

VICTORINA BISPO AIRES

**TOLERÂNCIA AO HERBICIDA GLIFOSATO EM *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex
Hayne: IMPLICAÇÕES BIOQUÍMICAS E MICROMORFOLÓGICAS**

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: Aristéa Alves Azevedo

Coorientadora: Kellen Lagares Ferreira Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

A298t
2023
Aires, Victorina Bispo, 1998-
Tolerância ao herbicida glifosato em *Hymenaea
stigonocarpa* Mart. ex Hayne: implicações bioquímicas e
micromorfológicas / Victorina Bispo Aires. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (37 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Aristéa Alves Azevedo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.618>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Hymenaea stigonocarpa* - Efeito dos herbicidas.
2. Ácido chiquímico. 3. Plantas - Anatomia. I. Azevedo, Aristéa
Alves, 1949-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica.
III. Título.

CDD 22. ed. 583.74

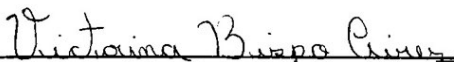
VICTORINA BISPO AIRES

**TOLERÂNCIA AO HERBICIDA GLIFOSATO EM *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex
Hayne: IMPLICAÇÕES BIOQUÍMICAS E MICROMORFOLÓGICAS**

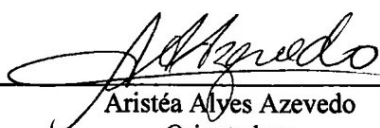
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2023.

Assentimento:



Victorina Bispo Aires
Autora



Aristéa Alves Azevedo
Orientadora

*Ao meu querido avô Juraildes Ribeiro de Moraes
in memoriam (1940-2020), por todo apoio e
incentivo em todas as fases da minha vida
acadêmica. Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo privilégio de ter vivido e aprendido imensamente na produção deste trabalho, pelo sustento diário e pelas pessoas a quem fui apresentada que, de forma cordial e fraterna me auxiliaram e acolheram durante este período.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) por meio do Programa de Pós-graduação em Botânica (PPGBot) pelo fomento e suporte as atividades acadêmicas em meio aos desafios do período pandêmico. Agradeço também a Universidade Federal do Tocantins (UFT) por meio do Programa de Pós-graduação em Ciências do Ambiente (PPGCiamb) pela parceria na execução deste trabalho em solo tocaninense.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família, em especial aos meus pais Rogério e Luzimeire, que com muito trabalho e renúncia possibilitaram e incentivaram minha busca por conhecimento, desde o ensino básico até o nível superior. Agradeço também aos meus avós e aos meus tios Robson e Luciana pelo apoio e incentivo durante toda minha formação.

À minha comissão orientadora formada pelas professoras Aristéa Alves Azevedo e Kellen Lagares Ferreira Silva pela paciência, ensinamentos e disponibilidade, foram fatores essenciais para a minha formação. Agradeço pelos conselhos e pelo voto de confiança em mim depositado.

Aos integrantes do Laboratório de Anatomia Vegetal e de Ecofisiologia Vegetal/UFT – Ana Beatriz (Bia), Rita, Flávia, Clemilda, Lícia, Vanessa, Jodson, Jônatas, Danilo, Andressa e Larissa – pelo companheirismo e auxílio em todas as fases do experimento, mais do que companheiros de trabalho, encontrei em vocês bons amigos. Serei eternamente grata a cada um vocês!

Aos colaboradores e coordenadores dos Laboratórios de Ecofisiologia Vegetal/UFT, Laboratório de Pesquisa em Química Ambiental e de Biocombustíveis (LAPEQ/UFT), Laboratório de Análises Moleculares (LAM/UFT) e ao pesquisador Leonardo Moreno (EMBRAPA) pelo auxílio e parceria na execução das análises.

Ao Horto Florestal da Fundação Municipal de Meio Ambiente (FMA) de Palmas-TO pela doação das mudas de *H. stigonocarpa* (Jatobá do Cerrado).

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Aos queridos companheiros da Botânica e do Laboratório de Anatomia Vegetal/UFV, obrigado pela companhia e auxílio a distância ou presencialmente, foi maravilhoso trabalhar e conviver com vocês.

Aos professores Rafael Oliveira e Jean Lira pelo auxílio nas análises estatísticas, bem como no manuseio dos programas estatísticos.

As amigas do “Gente como a Gente” – Débora, Juliana, Rízia, Luane, Sheilliny e Leny – pela amizade e companheirismo desde a graduação, mesmo em cidades e estados diferentes sempre se fizeram presentes, obrigado!

Agradeço a você que direta e indiretamente contribuiu para a execução deste trabalho. Meu muito obrigado a todos vocês.

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

*"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais para temer menos."
(Marie Curie)*

RESUMO

AIRES, Victorina Bispo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Tolerância ao herbicida glifosato em *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: implicações bioquímicas e micromorfológicas.** Orientadora: Aristéa Alves Azevedo. Coorientadora: Kellen Lagares Ferreira Silva.

Espécies nativas brasileiras vem sendo avaliadas para identificar e caracterizar evidências de sensibilidade ou tolerância a herbicidas, por meio do efeito deriva. Plantas tolerantes podem apresentar mecanismos que agem diretamente sobre sítio-alvo ou indiretamente por meio de barreiras físicas que reduzem a absorção do herbicida, como a cutícula. Sendo assim, este trabalho objetivou avaliar aspectos da tolerância ao glifosato em *Hymenaea stigonocarpa*, espécie nativa do bioma Cerrado. Mudanças com oito meses de idade foram submetidas à exposição ao herbicida em 3 diferentes doses: 200, 400, 800 g i.a. ha⁻¹ simulando efeitos de deriva e o controle (0g), com 7 repetições cada. As plantas foram avaliadas durante 65 dias após a exposição ao herbicida (DAA). Foram realizadas avaliações visuais e fisiológicas durante o experimento, seguidos das demais análises destrutivas ao término do período de avaliação. Não houve sinais de fitotoxicidade nas folhas expandidas de *H. stigonocarpa* e nem alterações anatômicas e micromorfológicas na superfície foliar. Houve alterações causadas pelos tratamentos na condutância estomática dos indivíduos avaliados. Não foi possível verificar alterações no teor de ácido chiquímico que pudessem indicar a ação do herbicida aos 65 dias após a aplicação. Nossos resultados reiteram a tolerância ao glifosato em *H. stigonocarpa*, sendo a micromorfologia da superfície foliar desta espécie um provável mecanismo de barreira física a absorção do herbicida e seus efeitos.

Palavras-chave: Ácido chiquímico. Alterações anatômicas. Espécie nativa. Cerrado.

ABSTRACT

AIRES, Victorina Bispo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Glyphosate tolerance in *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: biochemical and micromorphological implications.** Adviser: Aristéa Alves Azevedo. Co-adviser: Kellen Lagares Ferreira Silva.

Brazilian native species have been evaluated to identify and characterize evidence of sensitivity or tolerance to herbicide spraying, through the drift effect. Tolerant plants may have mechanisms that act directly on the target site or indirectly through physical barriers that reduce herbicide absorption, such as the epidermal cuticle. Therefore, this work aimed to evaluate aspects of glyphosate tolerance in *Hymenaea stigonocarpa*, a native species of Cerrado biome. Eight-month-old seedlings were exposed to the herbicide at 3 different doses: 200, 400, 800 g e. a. ha⁻¹ simulating drift effects and the control (0g), with 7 repetitions each. Plants were evaluated for 65 days after herbicide exposure (DAA). Visual and physiological evaluations were performed during the experiment, followed by other destructive analyzes at the end of the evaluation period. There were no signs of phytotoxicity in the expanded leaves of *H. stigonocarpa* nor anatomical and micromorphological alterations on the leaf surface. There were alterations caused by the treatments in the stomatal conductance of the evaluated individuals. It was not possible to observe alterations in the shikimic acid content that could indicate the action of the herbicide at 65 days after the application. Our results reiterate the tolerance to glyphosate in *H. stigonocarpa*, with the micromorphology of the leaf surface of this species being a probable mechanism of physical barrier to the absorption of the herbicide and its effects.

Keywords: Shikimic acid. Anatomical alterations. Native species. Cerrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Temperatura (mínima e máxima) e umidade relativa do ar durante o período de condução do experimento em casa de vegetação (setembro a dezembro de 2021)..... 15
- Figura 2. Avaliação visual das folhas jovens de *Hymenaea stigonocarpa* (A-L) da esquerda para a direita aos 1, 10, 15 dias após aplicação do herbicida (DAA). A-C: (Controle), D-F: (200g i.a. ha⁻¹), G-I: (400g i.a. ha⁻¹), J-L: (800g i.a. ha⁻¹). Setas brancas na margem das folhas de 800 g i.a. ha⁻¹ apontam para pontos necróticos. Barra 1cm..... 20
- Figura 3. Folhas expandidas de *Hymenaea stigonocarpa* aos 1 e 52 dias após aplicação do herbicida (DAA). A-B: (Controle), C-D: (200g i.a. ha⁻¹), E-F: (400g i.a. ha⁻¹), G-H: (800g i.a. ha⁻¹). Seta branca aponta pontos de clorose. Barra 1cm..... 21
- Figura 4. Avaliação anatômica das estípulas (C-F) e folhas jovens (G-H) de *Hymenaea stigonocarpa* após exposição ao glifosato. (A,C,E,G): Controle; (B,D,F,H): 800g i.a. ha⁻¹. FJ: folha jovem; Estp: estípula; Ead: epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial; Pr: parênquima; Prc: procâmbio Tr: tricomas; Cs: canal secretor; Fv: feixe vascular; Prd: protoderme; Mf: meristema fundamental. Sinal em asterisco (*) evidencia o desarranjo de células nos folíolos jovens. Barra 100µm..... 23
- Figura 5. Caracterização anatômica e presença de compostos fenólicos em folhas expandidas de *Hymenaea stigonocarpa* após 65 dias da aplicação do herbicida. (A,C,E): Controle;(B,D,F): 800g i.a. ha⁻¹. A cor amarronzada em E-F indica reação positiva a presença de compostos fenólicos, sem diferença de reação entre os tratamentos. Ead: epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial; PP: parênquima paliçádico; PL: parênquima lacunoso; Cs: canal secretor; Exb: extensão de bainha; St: estômato. Barra 100µm..... 24
- Figura 6. Caracterização da superfície foliar das folhas expandidas de *Hymenaea stigonocarpa* aos 65 dias após a aplicação do herbicida (DAA), sem alterações micromorfológicas entre os tratamentos. A: Controle, face adaxial; B: Controle, face abaxial; C: 800g i.a. ha⁻¹, face adaxial; D: 800g i.a. ha⁻¹, face abaxial. Barras 10 e 3µm. 25
- Figura 7. Conteúdo de pigmentos cloroplastídicos nas folhas expandidas de *Hymenaea stigonocarpa* aos 65 dias após a aplicação do herbicida (DAA). A: Teor de clorofila a; B: Teor de clorofila b; C: Teor de clorofila total; D: Teor de carotenoides. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Barras = erro padrão..... 26
- Figura 8. Concentração de ácido chiquímico nas folhas de *Hymenaea stigonocarpa* aos 65 dias após a aplicação do herbicida. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância..... 27
- Figura 6. Avaliação do comportamento das trocas gasosas de *Hymenaea stigonocarpa* em dias antes (DAT) e pós aplicação do herbicida (DAA), separados pela seta vermelha. A: Taxa fotossintética – (A), B: Condutância estomática – (Gs), C: Concentração de carbono interno – (Ci) e D: Taxa transpiratória (E)..... 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE), em mudas de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> submetidas a diferentes concentrações de glifosato. Medianas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Friedman ($p>0.05$).	25
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Taxa de assimilação líquida de CO ₂
ANDEF	Associação Nacional de Defesa Vegetal
C _i	Concentração interna de CO ₂
C _s	Canal secretor
DAA	Dias após a aplicação
DAT	Dias antes da aplicação
E	Taxas transpiratórias
Eab	Epiderme abaxial
Ead	Epiderme adaxial
EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato-sintase
Estp	Estípula
Exb	Extensão de bainha
FJ	Folha jovem
FMA	Fundação Municipal de Meio Ambiente de Palmas
Fv	Feixe vascular
G _s	Condutância estomática
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IRGA	Analisador de gases infravermelho
Mf	Meristema fundamental
PL	Parênquima lacunoso
PP	Parênquima paliçádico
Pr	Parênquima
Prc	Procâmbio
Prd	Protoderme
St	Estômato
TLE	Taxa de liberação de eletrólitos
Tr	Tricomas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
Local de estudo e condições de cultivo	15
Delineamento experimental	16
Avaliações visuais.....	16
Avaliação das trocas gasosas	16
Taxa de Liberação de Eletrólitos (TLE)	17
Concentração dos pigmentos cloroplastídicos	17
Quantificação do ácido chiquímico	17
Análises anatômicas, histoquímicas e micromorfológicas	18
Análises estatísticas	18
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33

INTRODUÇÃO

A pulverização de herbicidas faz parte do conjunto de práticas agrícolas para o manejo de espécies invasoras na agricultura (Gianessi, 2013). Seu uso intensivo foi incentivado no início dos anos 60, com o advento da Revolução Verde, como alternativa ao trabalho manual de capina e para o aumento da produtividade dos cultivos comerciais (Pingali, 2012).

Dentre os herbicidas de maior utilização no Brasil, o Glifosato e seus sais ocupam o primeiro lugar do ranking com cerca de 219.585,51 ton. de ingrediente ativo comercializados no país em 2021 (IBAMA, 2022). A ampla utilização deste herbicida, em grandes quantidades, é justificada pelo aumento do uso de organismos geneticamente modificados (OGM's) tolerantes ao glifosato, o que ao longo dos anos implicou na resistência em ervas daninhas que afetam negativamente a produtividade agrícola (Singh et al., 2020; Almeida et al., 2017).

O glifosato (N- (fosfometil) glicina) é um herbicida sistêmico, não seletivo e com amplo espectro de absorção, sendo aplicado na pós-emergência das plântulas em campo (Gomes et al., 2014). Quando pulverizado, as moléculas do herbicida atravessam a cutícula foliar sendo posteriormente translocadas pelo floema até as regiões dreno, com alta atividade metabólica (De la Cruz et al., 2016; Monquero et al., 2004). O mecanismo de ação do glifosato está relacionado a inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), essencial para a síntese dos aminoácidos aromáticos, na via do chiquimato, que exercem um papel importante na defesa vegetal como precursores de metabólitos secundários (Mertens et al., 2018). Vale ressaltar que o acúmulo do ácido chiquímico, nos tecidos foliares expostos ao glifosato, é um indicador relevante da ação deste herbicida (Freitas-Silva et al., 2020; Singh e Shaner, 1998) em consequência de sua ação inibitória sobre a atividade da enzima EPSPS.

A aplicação do herbicida pode se dar de forma manual, com a utilização de pulverizadores costais, mecânica com o uso de tratores e aérea com o uso de aviões de pequeno porte (ANDEF, 2010). Contudo, durante a aplicação há a ocorrência do processo de deriva, onde as gotículas da calda do produto pulverizado são dispersas pelo vento atingindo áreas e/ou organismos não-alvo (Silva et al., 2016).

Dentre as áreas atingidas pela deriva, destaca-se o Cerrado. Este bioma é conhecido pela grande extensão territorial no país e por abrigar inúmeras espécies endêmicas e de variados graus de vulnerabilidade, fazendo dele um importante *hotspot* de biodiversidade mundial (Klink e Machado, 2005). Entretanto, em virtude da rápida e crescente expansão de novas fronteiras agrícolas, o cerrado foi submetido, ao longo dos anos, a reduções acentuadas de sua área

original, com o aumento da abertura de lavouras e pastagens, em detrimento das espécies nativas ali presentes, que são vulneráveis a ações antrópicas (Strassburg et al., 2017).

Os resíduos gerados pela deriva podem causar efeitos deletérios à vegetação nativa e promover, a longo prazo, alterações na composição de espécies, reduzindo a biodiversidade, mesmo em doses menores do que as recomendadas oficialmente (Qui et al., 2020). Em estudos de deriva simulada, com vistas a identificação e caracterização destes efeitos em espécies nativas, já se tem registros na literatura da ocorrência de espécies sensíveis em diferentes biomas brasileiros (Borges et al., 2021; Cruz et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2021; Oliveira et al., 2021; Freitas-Silva et al., 2020; Santos et al., 2020; Batista et al., 2018), com sintomas de fitotoxicidade e redução dos parâmetros de trocas gasosas horas após a exposição.

No entanto, duas espécies nativas, *Hymenaea courbaril* e *Hymenaea stigonocarpa*, demonstraram ser tolerantes a exposição ao herbicida (Faria et al., 2021; Faria, 2020). Estas espécies, conhecidas popularmente como jatobás, tem porte arbóreo, folhas compostas bifolioladas e frutos leguminosos indeiscentes de coloração castanho escuro (Carvalho, 2007), possuem ampla distribuição no Cerrado (Lorenzi, 1992) e são usadas na medicina tradicional por suas propriedades anti-inflamatórias e antibacterianas (Boniface et al., 2017).

Plantas expostas ao glifosato podem apresentar mecanismos distintos de tolerância, manifestando ação direta no sítio-alvo do herbicida através da superexpressão ou mutação em trechos da EPSPS, ou com ação indireta através das diferentes composições da cera epicuticular e modificações metabólicas (Deng et al., 2022; De la Cruz et al., 2016b; Monquero et al., 2004). Faria et al. (2021) e Faria (2020) apontam que as ceras epicuticulares das espécies de *Hymenaea* devem ter sido a principal barreira à absorção do herbicida pelas folhas. Todavia, essas informações são oriundas de análises feitas apenas em microscopia de luz, sendo necessárias avaliações micromorfológicas e bioquímicas para melhor elucidar este mecanismo de barreira física que em conjunto com ajustes metabólicos confere tolerância ao herbicida.

Sendo assim, neste trabalho objetivou-se: avaliar a ação do glifosato, através do acúmulo do ácido chiquímico; caracterizar as respostas morfoanatômicas, micromorfológicas, fisiológicas e bioquímicas em indivíduos jovens expostos à pulverização à deriva simulada do herbicida; e identificar fatores responsáveis pela tolerância ao glifosato em *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de estudo e condições de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação durante os meses de setembro a dezembro de 2021, na Universidade Federal do Tocantins (UFT) – *Campus* Palmas, Palmas, Tocantins, Brasil (260 m altitude, 10° 10' 35.7" S e 48° 21' 29.4" W). As variáveis microclimáticas da casa de vegetação foram monitoradas usando estação meteorológica (HOBO H21-USB, ONSET, USA), registrando temperatura média de 27,2°C e umidade relativa do ar média de 82,1% (Figura 1). Segundo Köppen, o clima da região é do tipo *Aw*, tropical com inverno seco e chuvas de verão (Alvares et al., 2013).

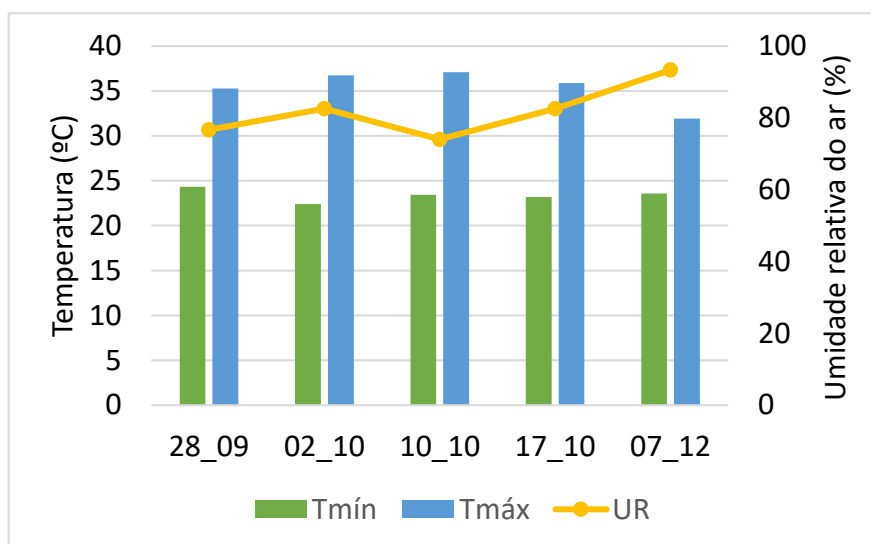


Figura 1. Temperatura (mínima e máxima) e umidade relativa do ar durante o período de condução do experimento em casa de vegetação (setembro a dezembro de 2021).

Mudas de *H. stigonocarpa* com 8 meses de idade foram fornecidas pelo Horto Florestal da Fundação Municipal de Meio Ambiente (FMA) de Palmas – Tocantins. As mudas foram transplantadas para vasos plásticos, com capacidade para 8 litros (uma planta por vaso), preenchidos com substrato comercial para cultivo de mudas (Pardins[®]), composto por terra preta, calcário, sulfato de amônio e bagaço de cana. Durante o período de aclimação, as mudas receberam solução nutritiva de Hoagland a ½ força iônica, com pH 5,5 (Hoagland e Arnon, 1950), a cada 7 dias, e irrigação com água durante o intervalo das aplicações. As plantas permaneceram durante 30 dias nestas condições até o início do experimento, sendo previamente padronizadas de acordo com a média em altura (cm) e número de folhas dentro de cada bloco para a aplicação dos tratamentos.

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido com delineamento em blocos casualizados, constituído por 4 tratamentos, com 7 repetições cada, incluindo o controle (0g) e 3 diferentes doses do herbicida Glifosato (Roundup Original DI[®], contendo 370 g/L⁻¹): 200, 400 e 800 g i.a. ha⁻¹, que representam 0,5L/ha, 1,0L/ha e 2,0L/ha do recomendado para o controle de plantas daninhas em culturas transgênicas de soja no estado do Tocantins.

Para aplicação do herbicida, na parte aérea das plantas, foi utilizado um pulverizador costal (PEM-P20, Kawashima, China), munido de barra com uma ponta de pulverização e bico do tipo leque (110JSF-04, Jacto[®], Brasil). O equipamento foi calibrado para operar com pressão de 3.1 bar, proporcionando um volume de calda de 200 L ha⁻¹. O herbicida foi pulverizado uma única vez fora da casa de vegetação, no mesmo dia em todos os tratamentos. Aproximadamente 01h30min após a aplicação, as mudas foram transportadas novamente para a casa de vegetação e dispostas em blocos sobre as bancadas, onde permaneceram por 65 dias.

Após a pulverização, as avaliações visuais, de trocas gasosas e análise anatômica de folhas jovens sintomáticas ocorreram ao longo do experimento. As demais avaliações ocorreram somente ao final dos 65 dias.

Avaliações visuais

Para as avaliações visuais, folhas jovens e expandidas do 1º e 3º nó de todos os indivíduos foram marcadas no início do experimento e monitoradas até o momento da coleta. Esta avaliação foi realizada para acompanhar o desenvolvimento foliar e o surgimento de sintomas. A documentação fotográfica foi realizada usando uma câmera digital (modelo ES80, Samsung, Brasil).

Avaliação das trocas gasosas

As trocas gasosas foram avaliadas por meio de analisadores de gases infravermelhos (IRGAs). Avaliações em dias antes da aplicação (DAT) e aos 7 e 14 dias após a aplicação (DAA) foram mensuradas com o IRGA LI-6400XT (Licor, Nebraska, Estados Unidos), e aos 65 DAA com o IRGA LCpro-SD (ADCBIOScientific, Hoddesdon, Inglaterra). O registro das taxas fotossintéticas (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiratórias (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (G_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a concentração do carbono interno (C_i) foram realizadas nos folíolos de folhas expandidas, do 2º e 3º nós de cada indivíduo ($n=7$), contados a partir do meristema apical. Os dois aparelhos foram calibrados para efetuarem as avaliações sob concentração de

CO₂, temperatura e vapor de H₂O do ambiente do local de estudo, com radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura da câmara a 30°C.

Taxa de Liberação de Eletrólitos (TLE)

A permeabilidade de membranas foi medida pelo extravasamento de eletrólitos (EE) quantificado segundo a metodologia de Szalai et al. (1996), com modificações. Foram coletados 15 discos foliares (6 mm de diâmetro) dos folíolos avaliados nas trocas gasosas. Os discos foram lavados e imersos em água deionizada e acondicionados em frascos âmbar com 5 ml de água deionizada, por 24 horas à temperatura ambiente. A condutividade elétrica inicial (C₁) foi aferida com condutivímetro portátil (AKSO, São Leopoldo, Brasil). Posteriormente, as amostras seguiram para a estufa onde permaneceram por uma hora a 100°C, subsequentemente, colocadas à temperatura ambiente para resfriarem. Após esse período, foi aferida a condutividade final (C₂). O extravasamento de eletrólitos foi expresso em porcentagem, através da fórmula: $EE (\%) = (C_1/C_2) * 100$.

Concentração dos pigmentos cloroplastídicos

A extração de pigmentos cloroplastídicos foi realizada com o uso do dimetilsulfóxido (DMSO), seguindo a metodologia descrita por Ronen e Galun (1984). Foram coletados 3 discos foliares (6 mm de diâmetro) dos folíolos avaliados nas trocas gasosas. Os discos foram incubados em frascos de vidro, protegidos da luz por papel alumínio, contendo 3 ml de DMSO saturado com CaCO₃. As amostras permaneceram em banho-maria a temperatura de 65°C, por 24 horas. Em seguida, foram realizadas leituras no espectrofotômetro UV-VIS, modelo GEHAKA VIS-380G (GEHAKA, São Paulo, Brasil). Os comprimentos de onda, as equações e os cálculos para determinar o conteúdo de clorofilas a (480 nm), b (649 nm) e carotenoides (665 nm) seguiram a metodologia de Wellburn (1994).

Quantificação do ácido chiquímico

Para a quantificação da concentração do ácido chiquímico, foi utilizado o método descrito por Sing e Shaner (1998). Em cada unidade experimental, 0,2 g de folhas expandidas do 3º nó foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em solução tampão de HCl. Esta solução foi centrifugada a uma velocidade de 15.000g, em temperatura de 4°C, durante 25 minutos. Foram retirados 30 μL do sobrenadante e adicionados 500 μL de uma solução de ácido periódico a 1%. Após permanecerem em banho-maria a 37°C, por 45 minutos, foram adicionados 500 μL de hidróxido de sódio 1 N e 300 μL de glicina 0,1M. Em seguida procedeu-

se leitura em espectrofotômetro UV-VIS, modelo GEHAKA VIS-380G (GEHAKA, São Paulo, Brasil), utilizando o comprimento de onda de 380 nm e o coeficiente de extinção molar de $4,76 \times 10^4$.

Análises anatômicas, histoquímicas e micromorfológicas

Para avaliar os tecidos foliares por meio de análises anatômicas, foram coletadas folhas expandidas sem sintomas visuais (2° e 3° nós) utilizadas nas avaliações de trocas gasosas e folhas jovens que manifestaram sintomas durante as avaliações visuais. Amostras foram coletadas na borda e na região mediana dos folíolos.

As amostras para microscopia de luz foram fixadas em uma solução de Glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,2M, pH 7,2 (Karnovsky, 1965) modificado (Kraus e Arduin, 1997), durante 24 horas. Após esse período foram efetuadas três lavagens de 15 minutos em tampão fosfato 0,2M, pH 7,2, realizada a desidratação, em série etílica, e a inclusão das amostras em resina do tipo metacrilato (Historesin, Leica, Wetzlar, Alemanha). Os cortes transversais, com 5 μ m de espessura, foram obtidos em micrótomo rotativo, modelo RM2155 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Em seguida, os cortes foram corados em Azul de Toluidina (O'Brian e McCully, 1981), sendo montados com Permount entre lâmina e lamínula. Para o teste histoquímico, parte das amostras incluídas em metacrilato foram coradas em Cloreto Férrico para a detecção de compostos fenólicos (Johansen, 1940). As imagens foram capturadas em microscópio de luz, modelo AX70RF (Olympus Optical, Tóquio, Japão), equipado com sistema de captura de imagens Axio Vision (Ax Cam, Zeiss, Alemanha).

Para as avaliações da superfície foliar por meio de microscopia eletrônica de varredura, parte das amostras fixadas em Karnovsky (1965) foram desidratadas em série etílica e submetidas a secagem até o ponto crítico em CO₂ líquido (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Posteriormente, as amostras foram montadas em stubs com fita dupla face e recobertas com uma camada de ouro em metalizador (SCD 050, Bal-tec, Balzers, Liechtenstein). Este material foi analisado e documentado em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430VP, Zeiss, Alemanha).

Análises estatísticas

Os dados de trocas gasosas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) fatorial, no esquema 4 (tratamentos) X 5 (tempos de avaliação), sendo os dados de *G*s transformados de acordo com Box-Cox. Os dados da TLE foram submetidos ao teste não-paramétrico de Friedman ($p < 0,05$) e as medianas comparadas pelo teste de Bonferroni. Os demais dados foram

submetidos a ANOVA two-way, com médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (R Core Team, 2022; Ferreira, Cavalcanti e Nogueira, 2014) e os gráficos pelo programa SigmaPlot V.12 (SPSS Inc., USA).

RESULTADOS

Avaliações visuais

As folhas jovens de *H. stigonocarpa* são bifolioladas e inicialmente envoltas por estípulas decíduas, com folíolos apresentando coloração avermelhada durante a expansão foliar, em transição gradual para o esverdeado no grupo controle (Figura 2-A,B,C).

As folhas jovens envoltas ou não pelas estípulas no momento da pulverização, não apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento quando comparadas ao grupo controle, com expansão reduzida e aparência de cor opaca a partir do tratamento de 200g i.a. ha⁻¹ (Figura 2-D-L). Foram observadas alterações visuais a partir do 1DAA nas folhas jovens do tratamento de 800g i.a. ha⁻¹, com pontos necróticos na margem dos folíolos jovens (Figura 2-J). No entanto, vale ressaltar que mesmo apresentando variação no desenvolvimento, houve surgimento de novas folhas jovens durante o período de avaliação.

Quanto às folhas expandidas, as folhas expostas aos tratamentos de 200 e 400 g i.a. ha⁻¹ se mantiveram sem alterações visuais desde a aplicação do herbicida, com aparência semelhante ao grupo controle (Figura 3-A-F). Exceto nos indivíduos expostos à dose de 800 g i.a. ha⁻¹, que mostraram sintomas iniciais de clorose aos 52 DAA (Figura 3-G,H).

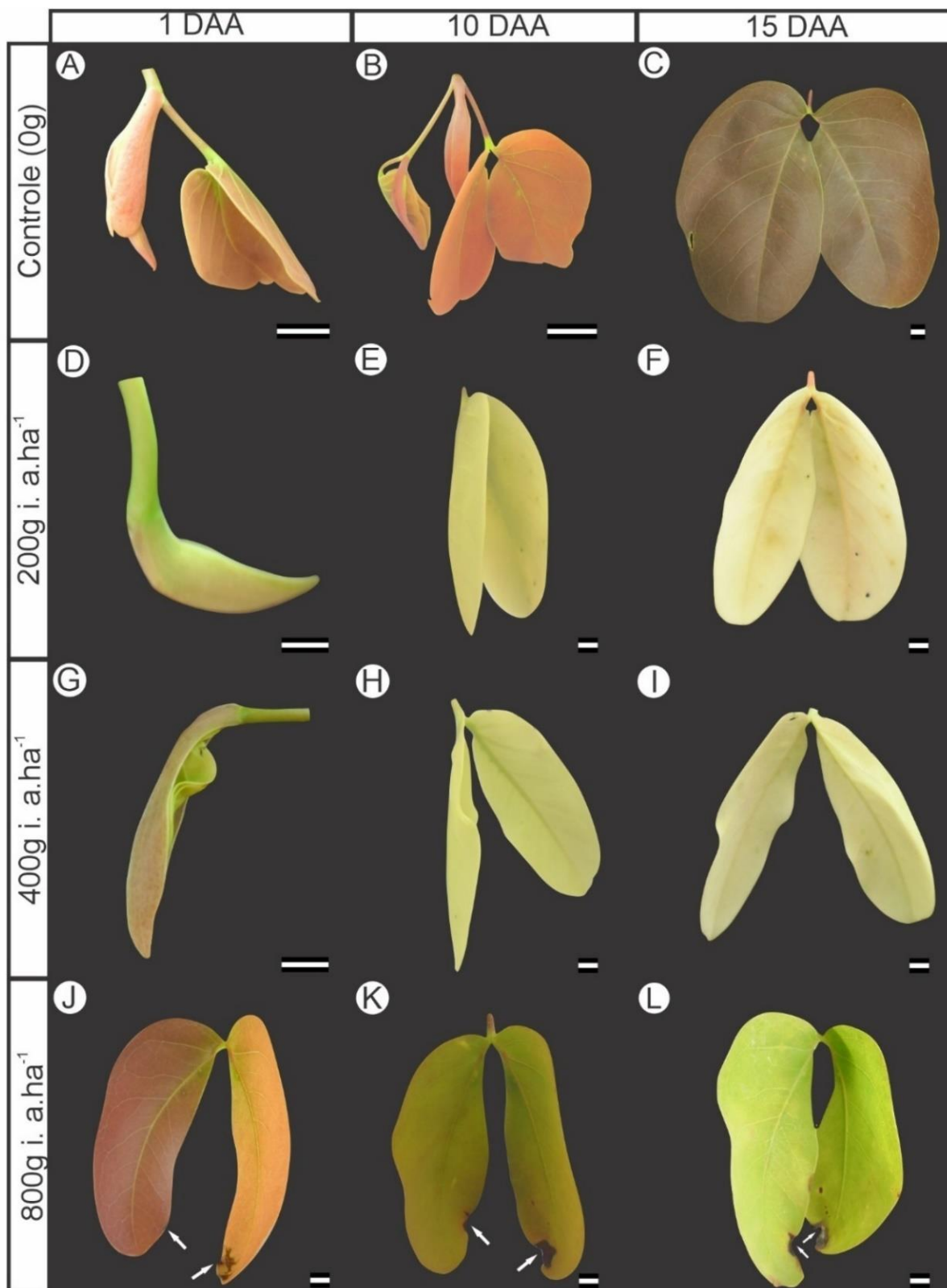


Figura 2. Avaliação visual das folhas jovens de *Hymenaea stigonocarpa* (A-L) da esquerda para a direita aos 1, 10, 15 dias após aplicação do herbicida (DAA). A-C: (Controle), D-F: (200g i.a. ha⁻¹), G-I: (400g i.a. ha⁻¹), J-L: (800g i.a. ha⁻¹). Setas brancas na margem das folhas de 800 g i.a. ha⁻¹ apontam para pontos necróticos. Barra 1cm.

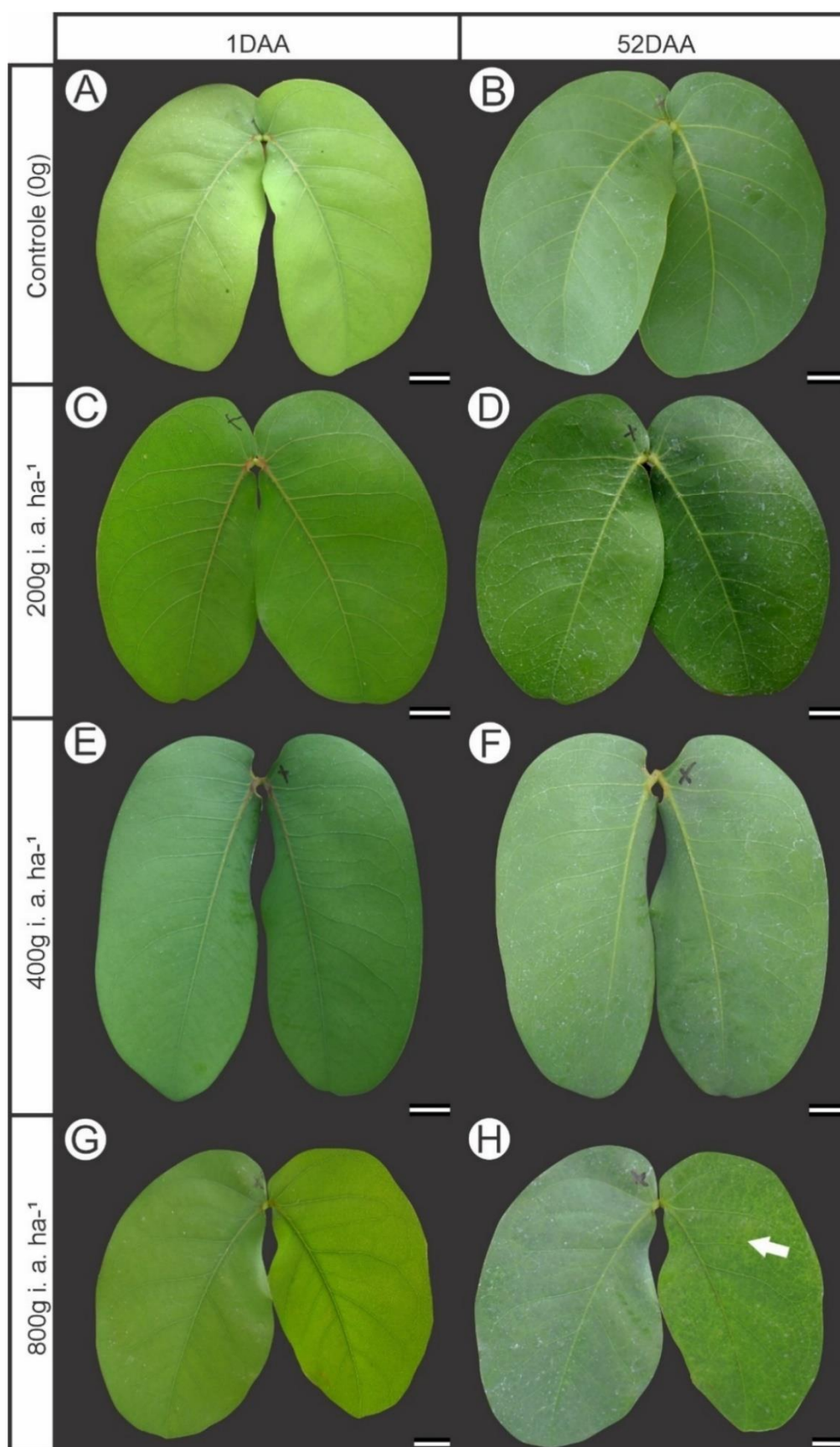


Figura 3. Folhas expandidas de *Hymenaea stigonocarpa* aos 1 e 52 dias após aplicação do herbicida (DAA). A-B: (Controle), C-D: (200g i.a. ha⁻¹), E-F: (400g i.a. ha⁻¹), G-H: (800g i.a. ha⁻¹). Seta branca aponta pontos de clorose. Barra 1cm.

Análises anatômicas, histoquímicas e micromorfológicas

As folhas jovens de *H. stigonocarpa* são bifolioladas e envoltas inicialmente por um ou mais pares de estípulas (Figura 4-A,B). Também apresentam tricomas ao longo da epiderme e em maior concentração nas extremidades que ligam as duas estípulas (Figura 4-C,D).

As estípulas apresentam epiderme unisseriada em ambas as faces, canais secretores em vários estágios de desenvolvimento, que permeiam uma camada homogênea de parênquima com células isodiamétricas e apresentam um feixe vascular próximo a estes canais (Figura 4-E,F). Nota-se que as estípulas estão em estágio de desenvolvimento mais avançado do que os folíolos das folhas jovens. Estes folíolos jovens apresentam mesofilo ainda em processo de diferenciação, sendo possível observar a presença de protoderme nas faces adaxial e abaxial, seguidas de duas fileiras de meristema fundamental e entre elas uma faixa procambial (Figura 4-G,H).

Quanto as alterações anatômicas, ao avaliar as folhas jovens dos indivíduos controle em relação a dose de 800 g i.a ha⁻¹ foi possível observar mudanças no padrão de desenvolvimento das células isodiamétricas na faixa procambial, mostrando achatamento e desorganização das células, perdendo o formato isodiamétrico para um aspecto achatado (Figura 4-G,H). Já nas estípulas, não houve alterações.

As folhas expandidas apresentam epiderme unisseriada em ambas as faces, e parede periclinal externa espessa (Figura 5-A,B). Seu mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico voltado para a face adaxial da folha e parênquima lacunoso para a face abaxial, com canais secretores voltados para a face adaxial (Figura 5-A,B). A folha é anfiestomática em razão da presença de estômatos em ambas as faces, assim como dispõe de extensões de bainha ao longo do mesofilo, sendo classificada como folha heterobárica (Figura 5-C,D). No entanto, não foi possível observar alterações anatômicas nas folhas expandidas que pudessem ter sido causadas pela exposição ao herbicida.

O teste histoquímico com o cloreto Férrico evidenciou a presença de compostos fenólicos totais no mesofilo das folhas expandidas, nos parênquimas paliçádico e lacunoso, bem como nas células epidérmicas (Figura 5-E,F). Entretanto, sem alterações aparentes na intensidade da reação entre o grupo controle e o maior tratamento (800g i.a ha⁻¹).

A superfície das folhas expandidas do grupo controle são glabras, com superfície irregular, cera epicuticular em aglomerados com formato de rosetas e presença de estômatos paracíticos em ambas as faces da folha (Figura 6-A,B). Não houve obliteração dos estômatos e

nem ruptura nas ceras epidérmicas na folha dos tratamentos ao final do experimento (Figura 6-C,D).

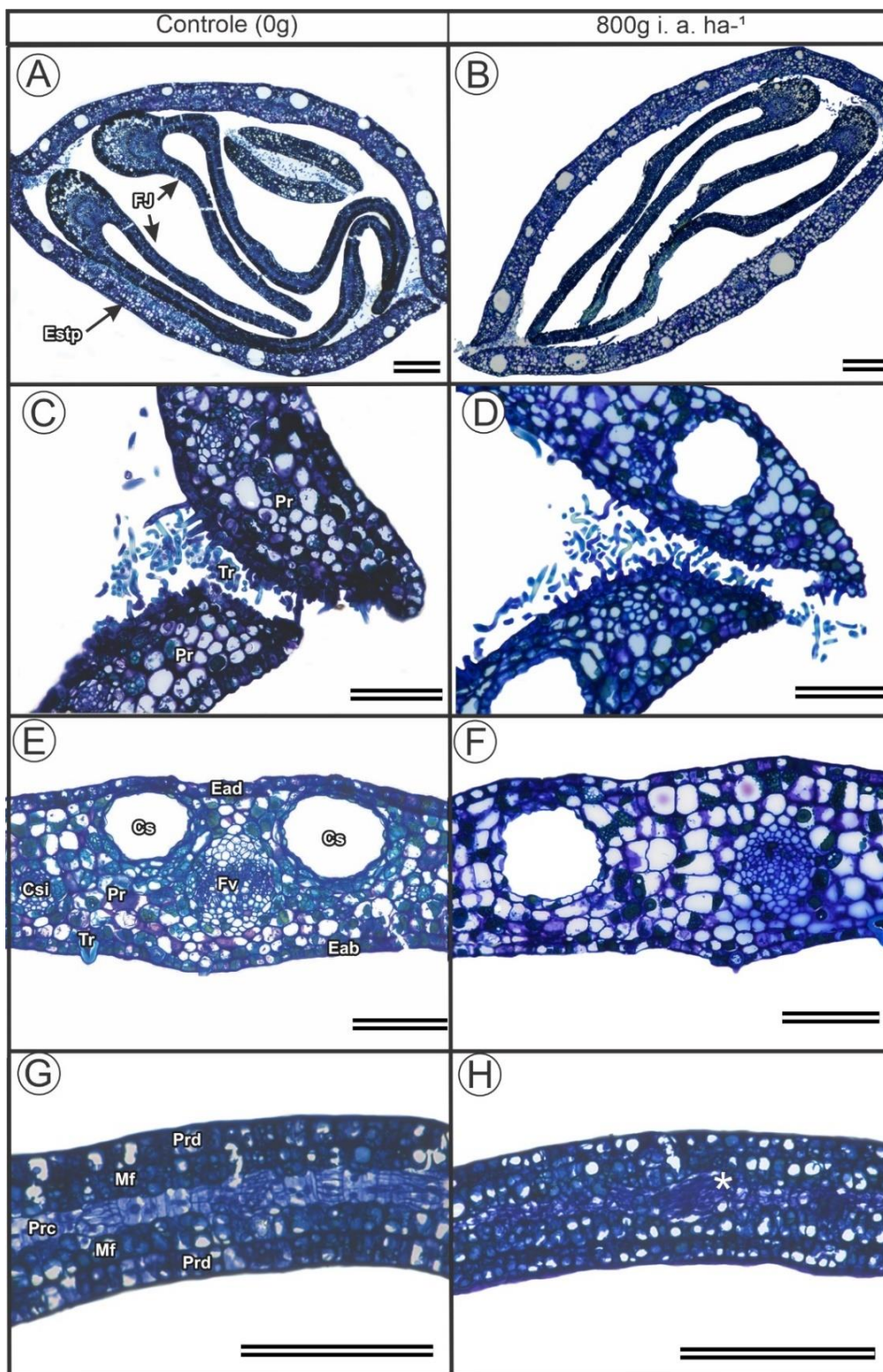


Figura 4. Avaliação anatômica das estípulas (C-F) e folhas jovens (G-H) de *Hymenaea stigonocarpa* após exposição ao glifosato. (A,C,E,G): Controle; (B,D,F,H): 800g i.a. ha⁻¹. FJ: folha jovem; Estp: estípula; Ead: epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial; Pr: parênquima; Prc: procâmbio Tr: tricomas; Cs: canal secretor; Fv: feixe vascular; Prd: protoderme; Mf:

meristema fundamental. Sinal em asterisco (*) evidencia o desarranjo de células nos folíolos jovens. Barra 100 μ m.

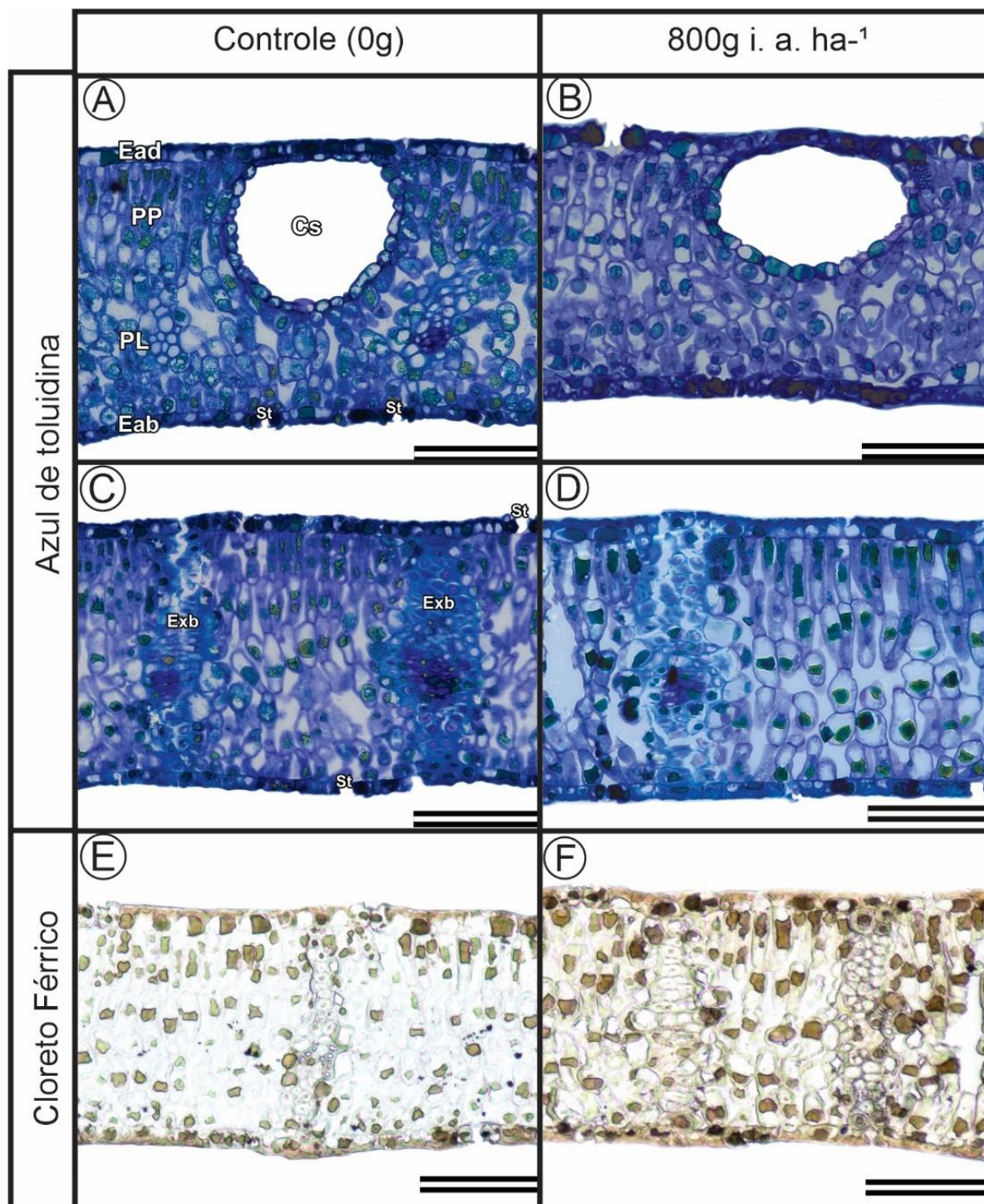


Figura 5. Caracterização anatômica e presença de compostos fenólicos em folhas expandidas de *Hymenaea stigonocarpa* após 65 dias da aplicação do herbicida. (A,C,E): Controle;(B,D,F): 800g i.a. ha⁻¹. A cor amarronzada em E-F indica reação positiva a presença de compostos fenólicos, sem diferença de reação entre os tratamentos. Ead: epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial; PP: parênquima paliádico; PL: parênquima lacunoso; Cs: canal secretor; Exb: extensão de bainha; St: estômato. Barra 100 μ m.

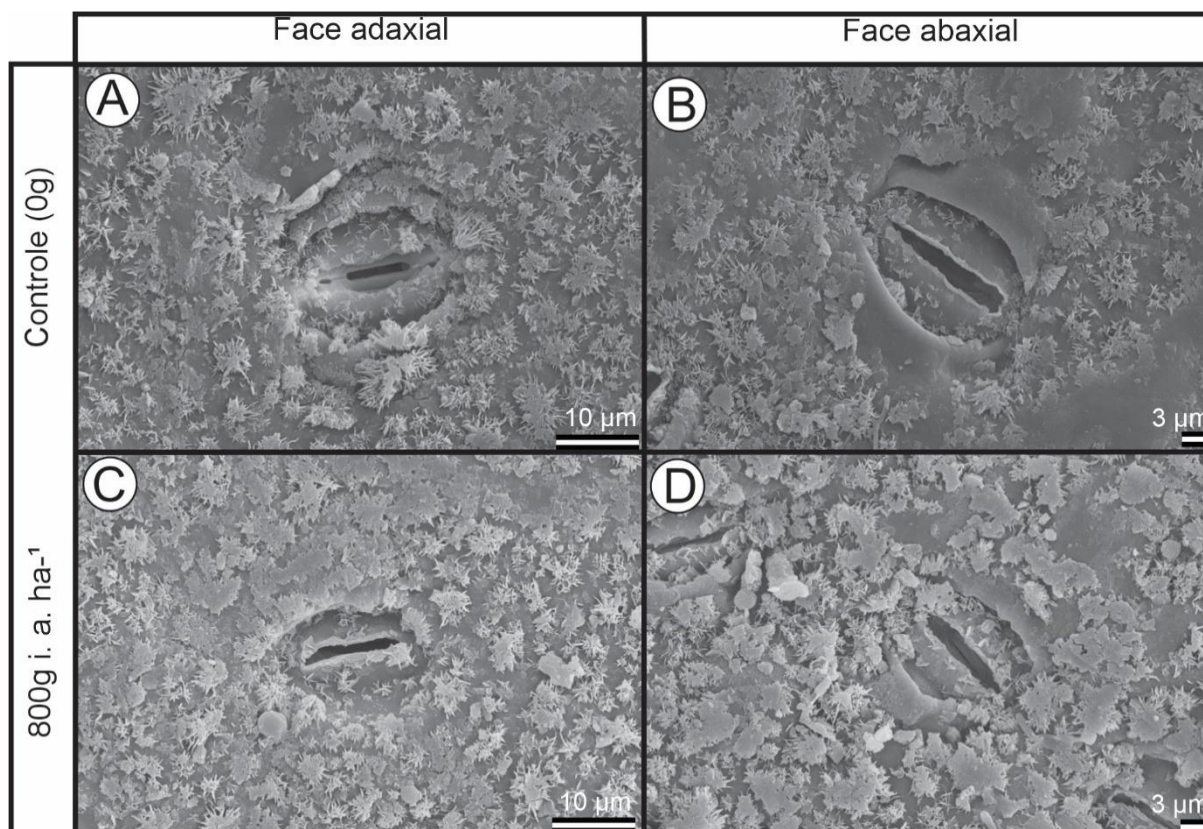


Figura 6. Caracterização da superfície foliar das folhas expandidas de *Hymenaea stigonocarpa* aos 65 dias após a aplicação do herbicida (DAA), sem alterações micromorfológicas entre os tratamentos. A: Controle, face adaxial; B: Controle, face abaxial; C: 800g i.a. ha⁻¹, face adaxial; D: 800g i.a. ha⁻¹, face abaxial. Barras 10 e 3 μm.

Taxa de Liberação de Eletrólitos (TLE)

Não houve alteração significativa na taxa de liberação de eletrólitos capaz de evidenciar danos sobre as membranas da espécie estudada (Tabela 1).

Doses	TLE%	Rank
0 g i.a. ha ⁻¹	32.45a	10
200 g i.a. ha ⁻¹	41.78a	18
400 g i.a. ha ⁻¹	43.56a	22
800 g i.a. ha ⁻¹	43.42a	20

Tabela 1. Taxa de liberação de eletrólitos (TLE), em mudas de *Hymenaea stigonocarpa* submetidas a diferentes concentrações de glifosato. Medianas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Friedman ($p > 0.05$).

Concentração dos pigmentos cloroplastídicos

O conteúdo das clorofilas *a* (Figura 7-A), clorofilas *b* (Figura 7-B), clorofilas totais (Figura 7-C) e dos carotenoides (Figura 7-D) não foram afetados pelo herbicida aos 65 dias após a aplicação ($p>0,05$).

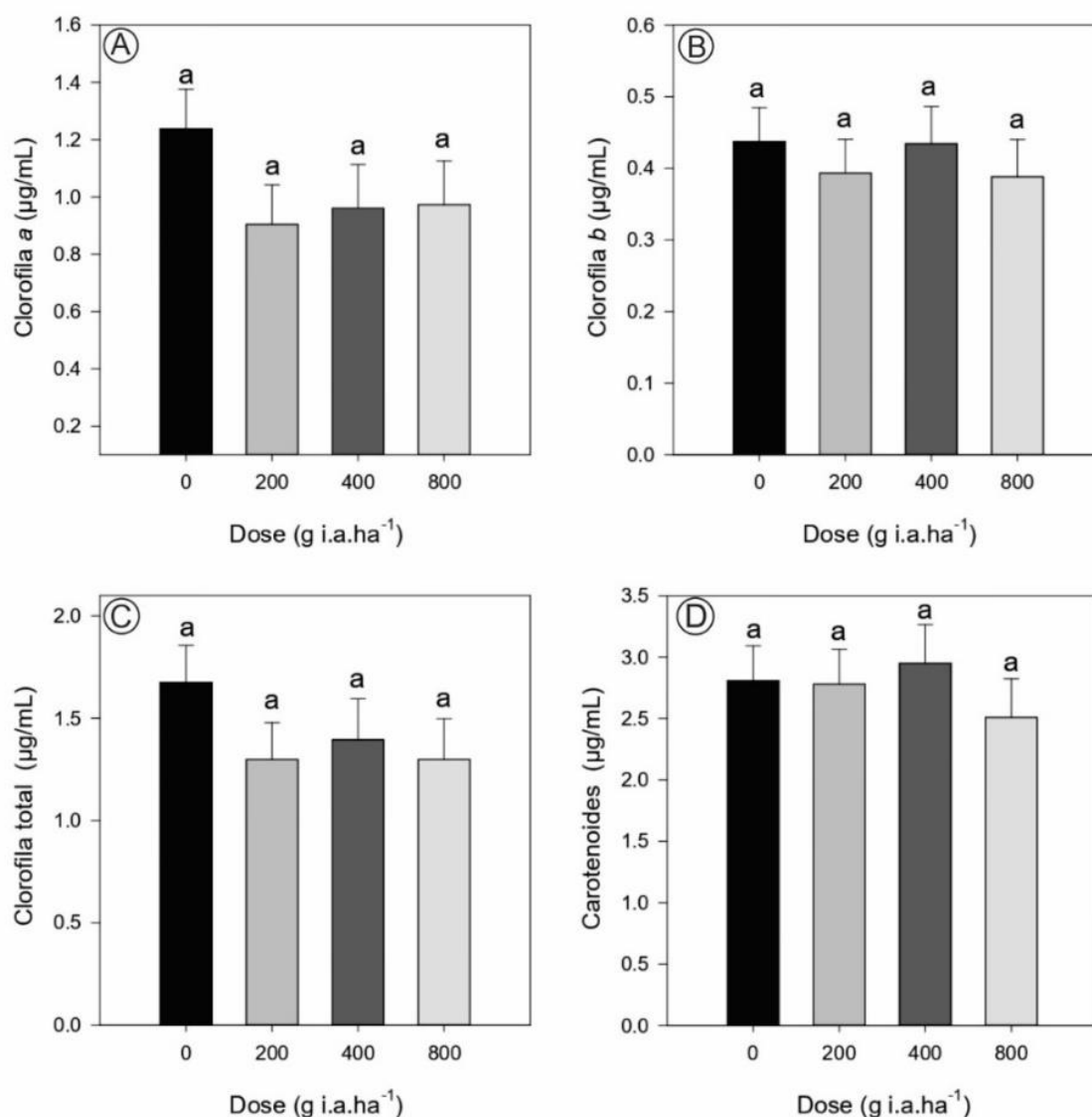


Figura 7. Conteúdo de pigmentos cloroplastídicos nas folhas expandidas de *Hymenaea stigonocarpa* aos 65 dias após a aplicação do herbicida (DAA). A: Teor de clorofila *a*; B: Teor de clorofila *b*; C: Teor de clorofila total; D: Teor de carotenoides. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Barras = erro padrão.

Quantificação do ácido chiquímico

As diferentes concentrações da deriva simulada de Glifosato sobre *H. stigonocarpa* provocaram alterações na concentração do ácido chiquímico nas folhas. As menores concentrações foram encontradas nas doses de 400 e 800 g i.a. ha⁻¹ (Figura 8).

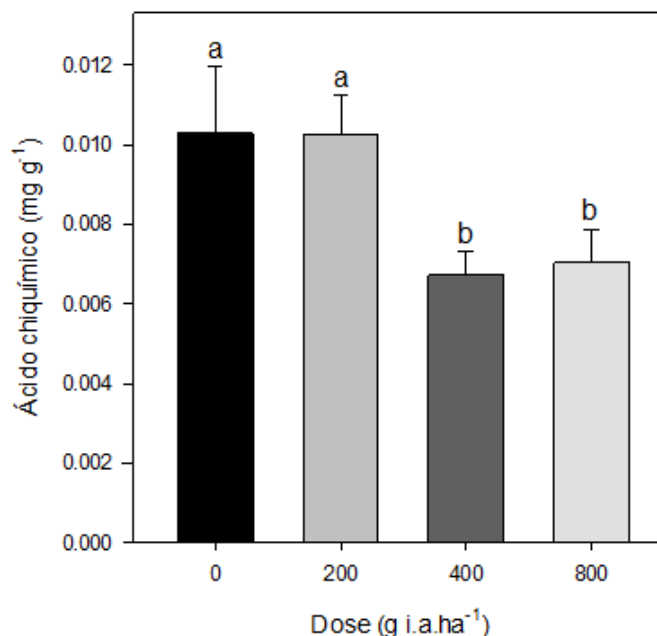


Figura 8. Concentração de ácido chiquímico nas folhas de *Hymenaea stigonocarpa* aos 65 dias após a aplicação do herbicida. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Avaliação das trocas gasosas

Com exceção da concentração de carbono interno (Ci), os demais parâmetros avaliados nas trocas gasosas foram alterados pelo herbicida glifosato.

Não foi possível observar interação entre os fatores dose e tempo sobre as taxas fotossintéticas (*A*) e transpiratórias (*E*), no entanto, ambos os fatores foram significativos de maneira independente. Em *A* (dose, $p=0.00004$), observou-se redução de 19,16% aos 7DAA em relação ao dia anterior a aplicação (1DAT), seguidas de incremento aos 14 DAA e posterior queda ao final do experimento (Figura 6-A). Já em *E* (dose, $p=0.00022$), as menores taxas transpiratórias foram observadas aos primeiros 14 DAA, seguidos de incremento de 16,46% aos 65 DAA (Figura 6-B).

Em *Gs* foi possível observar a interação entre os fatores ($p=0.028$), onde o tempo de exposição manifestou influência sobre as taxas de condutância estomática, apresentando alterações significativas aos 14 e 65 DAA (Figura 6-C). Já na avaliação da concentração de carbono interno nas folhas (Ci), somente o tempo foi fator influenciador nas respostas ao

herbicida ($p < 0,01$). Houve redução na concentração na primeira semana pós-aplicação, seguidas de incremento gradual ao 14 e 65 DAA (Figura 6-D).

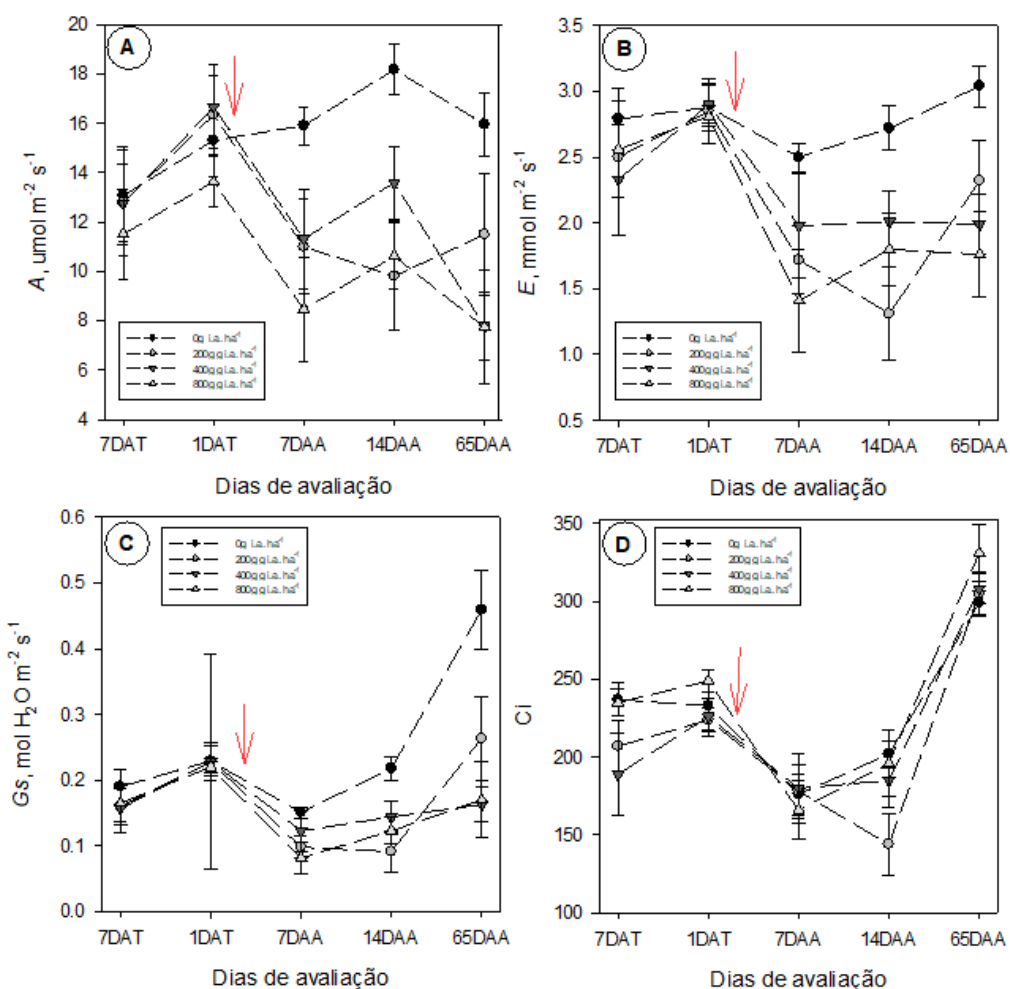


Figura 6. Avaliação do comportamento das trocas gasosas de *Hymenaea stigonocarpa* em dias antes (DAT) e pós aplicação do herbicida (DAA), separados pela seta vermelha. A: Taxa fotossintética – (A), B: Condutância estomática – (Gs), C: Concentração de carbono interno – (Ci) e D: Taxa transpiratória (E).

DISCUSSÃO

Neste trabalho observamos que o glifosato foi absorvido pela espécie, sendo possível detectar alterações nas concentrações de ácido chiquímico na matéria fresca foliar. As mudas de *H. stigonocarpa* apresentaram sintomas visuais apenas nas folhas jovens. A análise visual é uma ferramenta importante para avaliar a sensibilidade de espécies nativas que são expostas aos herbicidas, por meio do monitoramento e caracterização de possíveis sintomas (Borges et al., 2021). Em *H. stigonocarpa* não houve sinais de fitotoxicidade nas folhas expandidas, apenas em folhas jovens próximas ao meristema apical caulinar. A presença de sintomas nestas folhas pode estar relacionada com o padrão de translocação fonte-dreno no floema. Folhas jovens em

expansão necessitam de aporte de açúcares e fotoassimilados, sendo que, folhas já expandidas são fontes primárias destes compostos (Taiz et al., 2017). No processo de translocação, as moléculas de glifosato absorvidas pela planta seguem a mesma rota dos fotoassimilados, sendo transportadas para as regiões mais jovens e meristemáticas (Monquero et al., 2004). Em geral, folhas em estágios iniciais de expansão apresentam cutículas delgadas e se tornam mais espessas ao passo em que se expandem (Zhu et al., 2018) o que, aliado a translocação do herbicida para regiões com alta atividade metabólica, pode provavelmente ter contribuído para uma maior sensibilidade ao herbicida neste estágio de desenvolvimento foliar.

Outro aspecto observado nas folhas jovens de *H. stigonocarpa* foi a redução da expansão foliar. Timms e Wood (2020) ao avaliar indivíduos de *Rubus idaeus*, observaram folhas menores nas plantas que receberam doses de glifosato se comparadas ao grupo controle. Herbicidas à base de glifosato ao inibirem a ação enzimática da EPSPS também interrompem a síntese de triptofano, um dos produtos da via do chiquimato (Fuchs et al., 2022; Jiang et al., 2013). Este composto por sua vez é precursor da formação do ácido indolilacético (AIA), responsável pelo crescimento e expansão celular na formação dos tecidos, ou seja, indiretamente provocando alterações no processo de desenvolvimento destas folhas. Todavia não contemplamos neste trabalho o teor de hormônios vegetais em função das respostas pós-aplicação do herbicida nas plantas, sendo sugerido para trabalhos futuros.

A composição química e o padrão de deposição das ceras epicuticulares sobre a superfície foliar influenciam no grau de absorção dos herbicidas pulverizados sob as plantas, assim como a presença de tricomas (Monquero, Cury e Christoffoleti, 2005). Neste trabalho não observamos alterações na micromorfologia das folhas expandidas de *H. stigonocarpa*, que apresentaram superfície íntegra e sem sinais de rupturas das ceras aos 65 dias pós aplicação do herbicida. Resultados semelhantes foram encontrados por Rezende-Silva et al. (2022) ao avaliarem a tolerância da planta nativa *Alibertia edulis* também ao glifosato. Vale ressaltar que, não houve alteração significativa na taxa de liberação de eletrólitos capaz de evidenciar danos sobre as membranas da espécie estudada, corroborando o resultado das análises micromorfológicas das folhas expandidas de *H. stigonocarpa*. Espécies que são tolerantes a presença de herbicidas em geral apresentam ausência de danos micromorfológicos na superfície foliar (De la Cruz et al., 2016; Monquero et al. 2004b), onde as ceras epicuticulares atuam como mecanismo indireto de tolerância ao glifosato reduzindo a absorção do herbicida e em consequência sua translocação para as demais regiões do corpo da planta (Trezzi et al., 2020).

Assim como nas análises visuais, não houve sinais de danos anatômicos nas folhas expandidas avaliadas, semelhante ao encontrado por Faria (2020) e Faria et al. (2021) ao

submeterem duas espécies do gênero *Hymenaea* ao glifosato. Em estudos para avaliar os efeitos provocados em plantas nativas por poluentes atmosféricos, a anatomia vegetal se revela como importante ferramenta prognóstica, uma vez que os danos microscópicos precedem os danos fisiológicos e visuais (Freitas-Silva et al., 2020; Sant'Anna-Santos et al., 2019). Portanto, reiteramos que a integridade da superfície foliar de *H. stigonocarpa* esteja estritamente relacionada com as respostas anatômicas e visuais, pois a organização e deposição de cera presentes nesta espécie podem provavelmente constituir uma barreira a absorção do herbicida. Vale ressaltar que a absorção do herbicida é em maior parte mediada pela cutícula, sendo suas características essenciais na determinação de tolerância ou sensibilidade das espécies expostas (Trezzi et al., 2020; De la Cruz et al., 2016). Estudos adicionais para quantificar e caracterizar a composição química da parede periclinal externa da epiderme, bem como o uso de marcadores radioativos para avaliar os níveis de absorção do glifosato serão necessários esclarecer as respostas de *H. stigonocarpa* ao glifosato.

Neste trabalho, os testes histoquímicos evidenciaram a presença de compostos fenólicos espalhados em todo o mesofilo das folhas expandidas de *H. stigonocarpa*. Faria (2020) ao avaliar a mesma espécie exposta ao glifosato, observou nas folhas a ausência destes compostos, indicando que as plantas provavelmente não sofreram estresse oxidativo. No entanto, a divergência de respostas pode provavelmente estar relacionada a influência de componentes de variação ambiental e genética, uma vez que a presença e a posição dos compostos fenólicos no mesofilo constituem caráter taxonômico para as espécies do clado *Hymenaea* (Pinto et al. 2018). Também destacamos a presença de canais secretores nas folhas e estípulas, já descritos para esta espécie por Paiva e Machado (2007) como canais secretores de resina.

Os parâmetros de trocas gasosas foram afetados na primeira semana pós-aplicação do herbicida, mas apresentaram melhora aparente nas semanas subsequentes, e sem alterações no conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Observamos que, as taxas de condutância estomática variaram em todos os tratamentos durante o período de avaliação, sendo reduzidas na primeira semana pós aplicação e aparente recuperação nas semanas subsequentes. Yannicari et al. (2012) observaram reduções na taxa de condutância estomática no segundo dia de avaliação em biótipos sensíveis de *Lolium perene*, já em biótipos tolerantes ao herbicida ocorreram somente cinco dias após a exposição. Rezende-Silva et al. (2022) ao avaliarem as respostas de plantas nativas sensíveis e tolerantes ao glifosato, observaram que os parâmetros de trocas gasosas podem não ser biomarcadores úteis em plantas nativas tolerantes, uma vez que a resposta também pode estar associada ao tempo de exposição e a idade da folha. A assimilação líquida de carbono (A) e a taxa de transpiração (E) são diretamente afetadas pela movimentação da

abertura estomática. Mesmo não sendo o mecanismo alvo de ação do Glifosato, reações em cascata decorrentes da perturbação da via do chiquimato podem indiretamente provocar alterações nas trocas gasosas (Gomes et al., 2017). Entre elas podemos citar o balanço hormonal, onde a interrupção da formação de aminoácidos aromáticos pode modificar a produção de fitohormônios, dentre auxinas e o ácido abscísico (ABA) (Fuchs et al., 2022; Jiang et al., 2013). O ABA pode induzir o fechamento de estômatos temporariamente como resposta ao estresse, sendo que, a posição desta estrutura sob a superfície foliar pode conferir sensibilidade as variações causadas por estresse abiótico (Zhang et al., 2022; Yaran, Negin e Moshelion 2019; Jalakas et al., 2018).

Os indivíduos de *H. stigonocarpa* não apresentaram alterações significativas no teor de clorofilas totais e carotenoides aos 65 dias pós aplicação do herbicida. Santos et al. (2020) também observaram a ausência de alterações nos pigmentos em mudas de *Cenostigma macrophyllum* expostas ao glifosato. Mesmo com evidências de tolerância ao herbicida, espécies nativas podem apresentar respostas diferentes relacionadas ao teor de pigmentos fotossintéticos. Por exemplo podemos citar *Alibertia edulis*, também considerada tolerante ao glifosato, apresentou redução das concentrações de clorofilas totais e aumento de carotenoides entre as diferentes concentrações do herbicida (Rezende-silva et al., 2022). Os autores afirmam por meio de análise multivariada dos parâmetros avaliados que os teores de ácido chiquímico, aliados aos pigmentos fotossintéticos, contribuíram cerca de 88,19% das alterações causadas pelo glifosato nesta espécie. Em razão da variação de respostas aos teores de pigmentos por espécies nativas, sugerimos mais pontos de avaliação do teor de pigmentos em *H. stigonocarpa*.

Não houve alterações no teor de ácido chiquímico que pudessem indicar a ação do herbicida aos 65 dias após a aplicação, uma vez que as menores concentrações foram observadas nos tratamentos de 400 e 800 g i. a. ha⁻¹. Tendo em vista que o glifosato age diretamente na inibição da enzima EPSPS, é esperado que o acúmulo do ácido chiquímico ocorra nos tratamentos que recebem diferentes doses do herbicida, sendo este um importante biomarcador em espécies nativas sensíveis (Freitas-Silva et al., 2020; Rezende-Silva et al., 2019). Algumas espécies tolerantes ao glifosato podem não apresentar diferenças no teor de ácido chiquímico, indicando a presença de mecanismos de tolerância que podem ou não atuar diretamente sobre o sítio-alvo do herbicida (Nandula et al., 2008). *Convolvulus arvensis* acumulou ácido chiquímico nas primeiras 48 horas após a aplicação de glifosato, seguidas de reduções nas concentrações do ácido após o sexto dia de avaliação (Huang et al., 2019), sendo explicado pela superexpressão da EPSPS. No entanto, nossos dados não contemplam avaliações iniciais dos teores de ácido chiquímico nos primeiros dias após a pulverização de glifosato,

sendo necessários estudos adicionais para avaliar o comportamento de *H. stigonocarpa* e confirmar a existência de possíveis mecanismos de tolerância relacionados a ajustes metabólicos.

Diante das diferentes respostas de plantas nativas em contato com o herbicida glifosato, se faz cada vez mais necessário compreender os mecanismos que envolvem a sensibilidade ou tolerância à presença de herbicidas. As informações obtidas podem contribuir para a elaboração de planos de manejos adequados para a conservação das espécies ou na recuperação de áreas degradadas. Portanto, mesmo em face ao estresse desencadeado pelo herbicida, a espécie também se mostrou tolerante a presença do Glifosato neste estudo, assim como reportado por Faria (2020).

CONCLUSÃO

Os indivíduos de *Hymenaea stigonocarpa* apresentaram poucas alterações sobre os parâmetros avaliados que pudessem comprometer a sobrevivência da espécie. A superfície foliar e o mesofilo das folhas expandidas se mantiveram íntegros após o contato com o herbicida, apresentando alterações visuais somente em folhas jovens próximas ao meristema apical caulinar. A ausência de alterações micromorfológicas sugerem que as ceras epicuticulares da espécie possam atuar como barreira física à absorção do glifosato. Com este estudo podemos observar a presença de ácido chiquímico nas plantas, entretanto sem alterações significativas que pudessem ser causadas pelo herbicida após 65 dias de avaliação. Os parâmetros de trocas gasosas apresentaram recuperação aparente após a redução das taxas na primeira semana após a aplicação do herbicida. Os resultados reiteram o primeiro registro de tolerância ao glifosato em *H. stigonocarpa*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. E. S.; FRIEDRICH, K.; TYGEL, A. F. MELGAREJO, L.; CARNEIRO F. F. E. Use of genetically modified crops and pesticides in Brazil: growing hazards. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 22, n. 10, p. 3333-3339, 2017.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**. v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL (ANDEF). **Manual de tecnologia de aplicação de produtos fitossanitários**. São Paulo: Linea Creativa, 2010. Disponível em: <http://www.lpv.esalq.usp.br/sites/default/files/Leitura%20-%20Manual%20Tecnologia%20de%20Aplicacao.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- BATISTA, P. F.; COSTA, A. C.; MEGGUER, C. A.; LIMA, J. S.; SILVA, F. B.; GUIMARÃES, D. S.; ALMEIDA, G. M.; NASCIMENTO, K. J. T. *Pouteria torta*: a native species of the Brazilian Cerrado as a bioindicator of glyphosate action. **Brazilian Journal of Biology**. v. 78, n. 2, p. 296-305, 2018.
- BONIFACE, P. K.; FERREIRA, S. B.; KAISER, C. R. Review: Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 14, n. 4, n. 206, p. 673-679, 2017.
- BORGES, M. P. S.; SILVA, D. V.; SOUZA, M. F.; SILVA, T. S.; TEÓFILO, T. M. S.; SILVA, C. C.; PAVÃO, Q. S.; PASSOS, A. B. R. J.; SANTOS, J. B. Glyphosate effects on tree species natives from Cerrado and Caatinga Brazilian biome: Assessing sensitivity to two ways of contamination. **Science of the Total Environment**. v. 769, n. 144113, 2021.
- CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. **Jatobá-do-Cerrado *Hymenaea stigonocarpa***. Circular técnica N° 133. Embrapa Florestas, 2007. 8 f.
- CRUZ, C. E. S.; FREITAS-SILVA, L.; RIBEIRO, C.; SILVA, L. C. Physiological and morphoanatomical effects of glyphosate in *Eugenia uniflora*, a Brazilian plant species native to the Atlantic Forest biome. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 21334–21346, 2021.
- DE LA CRUZ, R. A.; BARRO, F.; DOMÍNGUEZ-VALENZUELA, J. A.; DE PRADO, R. Physiological, morphological and biochemical studies of glyphosate tolerance in Mexican Cologania (*Cologania broussonetii* (Balb.) DC.). **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 98, p. 72-80, 2016.
- DENG, W.; DUAN, Z.; LI, Y.; PENG, C.; YUAN, S. Multiple Resistance Mechanisms Involved in Glyphosate Resistance in *Eleusine indica*. **Plants**. v. 11, n. 23, p. 3.199, 2022.
- FARIA, G. S.; CARLOS, L.; JAKELAITIS, A.; VASCONCELOS-FILHO, S. C.; LOURENÇO, L. L.; COSTA, A. M.; GONÇALVES, I. A. Tolerance of *Hymenaea courbaril* L. to glyphosate. **Ecotoxicology**. v. 31, n. 1, p. 168-177, 2021.
- FARIA, Giselle Santos de. **Tolerância de duas espécies de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L. e *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) ao glifosato**. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias - Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias - Agronomia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2020.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Expdes: An R Package for ANOVA and experimental designs. **Applied Mathematics**. vol. 5, p. 2952-2958, 2014.

- FREITAS-SILVA, L.; ARAÚJO, T. O.; NUNES-NESE, A.; RIBEIRO, C.; COSTA, A. C.; SILVA, L. C. Evaluation of morphological and metabolic responses to glyphosate exposure in two neotropical plant species. **Ecological Indicators**. v. 113, p. 1-11, 2020.
- FREITAS-SILVA, L.; DINIZ e CASTRO, N.; SILVA, L. C. Morphoanatomical and biochemical changes in *Zeyheria tuberculosa* exposed to glyphosate drift. **Botany**, v. 99, n. 2, p. 91–98, 2021.
- FUCHS, B.; LAIHONEN, M.; MUOLA, A.; SAIKKONEN, K.; DOBREV, P. I.; VANKOVA, R.; HELANDER, M. A Glyphosate-Based Herbicide in Soil Differentially Affects Hormonal Homeostasis and Performance of Non-target Crop Plants. **Frontiers in Plant Science**. v. 12, p. 1-10, 2022.
- GIANESSI, Leonard P. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. **Pest Management Science**. v. 69, n. 10, p. 1099-1105, 2013.
- GOMES, M. P.; LE MANAC'H, S. G.; HÉNAULT-ETHIER, L.; LABRECQUE, M.; LUCOTTE, M.; JUNEAU, P. Glyphosate-Dependent Inhibition of Photosynthesis in Willow. **Frontiers in Plant Science**. v. 8, p. 1-13, 2017.
- GOMES, M. P.; SMEDBOL, E.; CHALIFOUR, A.; ETHIER, L. H.; LABRECQUE, M.; LEPAGE, L.; LUCOTTE, M.; JUNEAU, P. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of Experimental Botany**. v. 65, n. 17, p. 4961-4703, 2014.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D.I. **The waterculture method for growing plants without soil**. Berkeley, California: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p.
- HUANG, Z.; LIU, Y. ZHANG, C.; JIANG, C.; HUANG, H.; WEI, S. Molecular basis of natural tolerance to glyphosate in *Convolvulus arvensis*. **Scientific Reports**. v. 9, n. 8133, p. 1-10, 2019.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- JALAKAS, P.; MERILO, E.; KOLLIST, H.; BROSCHE, M. ABA-mediated regulation of stomatal density is OST1-independent. **Plant Direct**. v. 2, n. 9, p. 1-7, 2018.
- JIANG, L. X.; JIN, L. G.; GUO, Y.; TAO, B.; QIU, L. J. Glyphosate effects on the gene expression of the apical bud in soybean (*Glycine max*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 437, p. 544–549, 2013.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.
- KARNOVSKY, Morris J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 137-138, 1965.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**. v. 1, p. 147–155, 2005.
- KRAUS, J.E., ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.
- LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol. 1**. Nova Odessa, SP Editora Plantarum Ltda, 1992. 368 p.
- MERTENS, M.; HOSS, S.; NEUMANN, G.; AFZAL, J.; REICHENBECHER, W.

Glyphosate, a chelating agent—relevant for ecological risk assessment? **Environmental Science and Pollution Research**. v. 65, p. 5298-5317, 2018.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; MATAS, J. A.; HEREDIA, A. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta Daninha**. v. 22, n. 2, p. 203-210, 2004b.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; OSUNA, M. D.; DE PRADO, R.A. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. **Planta Daninha**. v. 23, n. 1, p. 123-132, 2005.

MONQUERO, P. A.; CURY, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**. v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.

NANDULA, V. K.; REDDY, K. N.; POSTON, D. H.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Glyphosate Tolerance Mechanism in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) from Mississippi. **Weed Science**. v. 3, n. 56, p. 344-349, 2008.

O'BRIAN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of structure principles and selected methods**. Melbourne: Termacarphi Pty, LDT., 1981. 280 p.

OLIVEIRA, A. P. A.; CRISPIM-FILHO, A. J.; SANTOS, V. R. S.; COSTA, A.C.; SILVA, K.L.F. Physiological and morphoanatomic responses of *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Fabaceae) to glyphosate. **Revista Árvore**, v. 45, p. 1-13, 2021.

PAIVA, E. A. S.; MACHADO, S. R. Structural and ultrastructural aspects of ontogenesis and differentiation of resin secretory cavities in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae Caesalpinioideae) leaves. **Nordic Journal of Botany**. v. 4, n. 24, p. 423-431, 2007.

PINGALI, Prabhu L. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. **PNAS**. v. 31, n. 109, p. 12302-12308, 2012.

PINTO, R. B.; LUSA, M. G.; MANSANO, V. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAYER, J. L. S. Morphoanatomy of the leaflets of the *Hymenaea* clade (Fabaceae: Detarioideae) reveals their potential for taxonomic and phylogenetic studies. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 187, n. 1, p. 87-98, 2018.

QI, Y.; LI, J.; FU, G.; HE, J.; DU, L.; ZHAO, C.; ZHANG, D. Effects of herbicides on non-target plant species diversity and the community composition of fallow fields in northern China. **Scientific Reports**, v. 10, n. 9967, p. 1-10, 2020.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022.

REZENDE-SILVA, S. L.; COSTA, A. C.; DYSZY, F. H.; BATISTA, P. F.; CRISPIM-FILHO, A. J.; NASCIMENTO, K. J. T.; SILVA, A. A. *Pouteria torta* is a remarkable native plant for biomonitoring the glyphosate effects on Cerrado vegetation. **Ecological Indicators**. v. 102, p. 497-506, 2019.

REZENDE-SILVA, S. L.; COSTA, A. C.; PEDROSO, A. N. V.; BATISTA, P. F.; CRISPIM-FILHO, A. J.; ALMEIDA, G. M.; NASCIMENTO, K. J. T.; FERREIRA, L. L.; DOMINGOS, M.; SILVA, A. A. Morphophysiological indicators of the glyphosate action on Brazilian savanna plants: a multivariate analysis. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 44, n. 7, p. 1-16, 2022.

- RONEN, R.; GALUN, M. Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. **Environmental Experimental Botany**, v.24, n.3, p.239-245, 1984.
- SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A.; OLIVA, M. A.; CAMPOS, N. V.; GOMES, M. P. What precedes fluoride-response symptomatology: Microscopic or physiological damage? **Ecological indicators**. v. 107, n. 105560, 2019.
- SANTOS, V.R.S.; FILHO, A.J.C.; SANTANA, M.M.; COSTA, A.C.; SILVA, K.L.F. Análises fisiológicas e morfoanômicas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Fabaceae) submetida a diferentes concentrações de glifosato. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 5, p. 159–173, 2020.
- SILVA, F. B.; VITAL, R. G.; BATISTA, P. F.; COSTA, A. C.; JAKELAITIS, A. Drift from herbicides application on cultivated and native plants: a review. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, n. 1, p. 79-88, 2016.
- SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid Determination of Glyphosate Injury to Plants and Identification of Glyphosate-Resistant Plants. **Weed Technology**. v. 12, n. 3, p. 527-530, 1998.
- SINGH, S.; KUMAR, V.; GILL, J. P. K.; DATTA, S.; SINGH, SA.; DHAKA, V.; KAPOOR, D.; WANI, A. B.; DHANJAL, D. S.; KUMAR, M.; HARIKUMAR, A. L.; SINGH, J. Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. **International Journal of Environment Research and Public Health**. v. 17, n. 20, p. 1-18, 2020.
- STRASSBURG, B. B. N.; BROOKS, T.; FELTRAN-BARBIERI, R.; IRIBARREM, A.; CROUZEILLES, R; LOYOLA, R.; LATAWIEC, A. E.; OLIVEIRA-FILHO, F. J. B.; SCARAMUZZA, C. A. M.; SCARANO, F. R.; SOARES-FILHO, B.; BALMFORD, A. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**. v. 1, n. 99, p. 1-3, 2017.
- SZALAI, G.; JANDA, T.; PÁLDI, E.; SZIGETI, Z. Role of Light in the Development of Post-chilling Symptoms in Maize. **Journal of Plant Physiology**. v. 148, n. 3-4, p. 378-383, 1996.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.
- TIMMS, K. P.; WOOD, L. J. Sub-lethal glyphosate disrupts photosynthetic efficiency and leaf morphology in fruit-producing plants, red raspberry (*Rubus idaeus*) and highbush cranberry (*Viburnum edule*). **Global Ecology and Conservation**. v. 24, n. 01319, p. 1-10, 2020.
- TREZZI, M. M.; TEIXEIRA, S. D.; LIMA, V. A.; SCALCON, E. L.; PAGNOCELLI-JUNIOR, F. B.; SALOMÃO, H. M. Relationship between the amount and composition of epicuticular wax and tolerance of *Ipomoea* biotypes to glyphosate. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. v. 55, n. 11, 2020.
- WELBURN, Alan R. 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**. v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.
- YAARAN, A.; NEGIN, B.; MOSHELION, M. Role of guard-cell ABA in determining steady-state stomatal aperture and prompt vapor-pressure-deficit response. **Plant Science**. v. 281, p. 31-40, 2019.

YANNICCARI, M.; TAMBUSI, E.; ISTILART, C.; CASTRO, A. M. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 57, p. 210-217, 2012.

ZHANG, Q.; TANG, W.; XIONG, Z.; PENG, S.; LI, Y. Stomatal conductance in rice leaves and panicles responds differently to abscisic acid and soil drought. **Journal of Experimental Botany**. v. 73, n. 22, p. 1-13, 2022.

ZHU, X.; ZHANG, Y.; DU, Z.; CHEN, X.; ZHOU, X.; KONG, X.; SUN, W.; CHEN, Z.; CHEN, C.; CHEN, M. Tender leaf and fully expanded leaf exhibited distinct cuticle structure and wax lipid composition in *Camellia sinensis* cv Fuyun 6. **Scientific reports**. v. 8, n. 14944, p. 1-12, 2018.