

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS - AGRONOMIA

***Pouteria torta* e *Alibertia edulis*: ESPÉCIES NATIVAS DO
CERRADO INDICADORAS DA AÇÃO DO GLYPHOSATE**

Autora: Sueisla Lopes Rezende Silva

Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

Rio Verde - GO
Agosto – 2016

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS - AGRONOMIA

***Pouteria torta* e *Alibertia edulis*: ESPÉCIES NATIVAS DO
CERRADO INDICADORAS DA AÇÃO DO GLYPHOSATE**

Autora: Sueisla Lopes Rezende Silva

Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, Área de concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde - GO
Agosto – 2016

Silva, Sueisla Lopes Rezende

S586p *Pouteria torta* e *Alibertia edulis*: Espécies nativas do Cerrado indicadoras da ação do glyphosate / Sueisla Lopes Rezende Silva. –

Rio Verde. – 2016.

92 f. : il.

Tese (Doutorado) – Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, 2016.

Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

Bibliografia

1. Fotossíntese. 2. Ácido chiquímico. 3. Atividade enzimática. 4. Bioindicadores. I. Título. II. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

CDD: 581.981

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-GRONOMIA

Pouteria torta e *Alibertia edulis*: ESPÉCIES NATIVAS
DO CERRADO INDICADORAS DA AÇÃO DO
GLYPHOSATE

Autora: Sueisla Lopes Rezende Silva
Orientador: Dr. Alan Carlos Costa

TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 23 de agosto de 2016.

Dra. Marisa Domingos
Avaliador externo
Instituto de Botânica

Dr. Marcos Antonio Oliva Cano
Avaliador interno
Universidade Federal de Viçosa

Dra. Kelly Juliane Telles Nascimento
Avaliador externo
PNPD - IF Goiano Campus Rio Verde

Dr. Fábio Henrique Dyszy
Avaliador interno
IF Goiano Campus Rio Verde

Dr. Alan Carlos Costa
Presidente da banca
IF Goiano Campus Rio Verde

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e me dar força para seguir em frente, permitindo a concretização desse sonho.

Ao meu esposo Jean Carlos, por entender minhas ausências, pela paciência diária e por viver os meus sonhos.

A minha filha, Maria Luísa, pelo amor incondicional, por tornar os meus dias mais coloridos e ser a razão desta conquista.

Aos meus pais, Lindomar e Maria Aparecida, que abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar. Pelo exemplo de sabedoria, humildade, dedicação, perseverança e pelo apoio incondicional durante todas as etapas da minha vida.

Ao meu irmão, Wender Lopes Rezende, pelo exemplo de fé e orações, pelo apoio, incentivo, amizade e alegria.

Ao Professor Alan Carlos Costa, pela orientação e sábios ensinamentos transmitidos, exemplo de dedicação e profissionalismo. Muito obrigada pelo incentivo e amizade ao longo desses anos de convívio.

A pós-doutora Kelly Julianne Telles do Nascimento, que, com paciência e dedicação, auxiliou na minha condução até este ponto, pela precisão nos conhecimentos técnicos transmitidos, pelas sugestões no manuscrito e, também, pela amizade e palavras de apoio nos momentos de dificuldade.

A pós-doutora Andrea Nunes Pedrosa, pela colaboração com as análises de microscopia eletrônica de varredura, pelas sugestões, entusiasmo e amizade.

A minha coorientadora Professora Clarice Aparecida Megguer, pelos conselhos, carinho e inestimável amizade.

Ao meu coorientador Professor Fábio Henrique Dyszy, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, sugestões e contribuições.

A pós-doutora Caroline Müller, pelas contribuições e sugestões no manuscrito, pelos conselhos e convivência agradável.

Aos professores Marco Antônio Oliva Cano e Marisa Domingos, pelas valiosas contribuições, questionamentos e sugestões, que em muito contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao professor Adriano Jakelaitis e ao Cássio, pela ajuda e disponibilidade, em especial durante a implementação dos experimentos.

A família Ecofisiologia, amigos pregressos e atuais, que participam da minha história, composta por Márcio, Jônatas, Adinan, Fátima, Karen, Viviane, Vanessa, Priscila Oliveira, Gabriela, Marta, Derly, Dêmily, Marília, Verônica, Roberto, Camila, Gabriel, Robson, Yasmim, pelos momentos agradáveis que passamos juntos, pelas risadas, pela disponibilidade e dedicação nas análises realizadas.

As minhas amigas queridas Priscila Ferreira e Luciana, pela ajuda nos experimentos, pela convivência e conversas sempre tão agradáveis, pelo ombro amigo e confiança ao longo desses anos. “Há amigos mais chegados que irmãos” Provérbios 18:24.

Em especial, ao “meu filho” Ailton, pelo companheirismo em todas as etapas do meu doutorado, pela simpatia, profissionalismo e disposição em ajudar em todos os momentos necessários para execução deste trabalho e, também pela amizade.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, pela oportunidade de realização do doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e as demais agências de fomento, pelo apoio financeiro para a execução dos projetos de pesquisa.

A todos meus colegas e amigos de pós-graduação e do Instituto Federal Goiano, pela amizade, companheirismo e pelo compartilhamento de conhecimentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias-Agronomia, pela dedicação e ensinamentos repassados durante toda minha jornada de acadêmica.

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este estudo se tornasse realidade, **MUITO OBRIGADA.**

BIOGRAFIA DA AUTORA

SUEISLA LOPES REZENDE SILVA, filha de Maria Aparecida Rezende e Lindomar Lopes Gouveia, nasceu dia 26 de junho de 1987, na cidade de Jataí, Goiás.

Em março de 2006, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Goiás, graduando-se em dezembro de 2009.

Em fevereiro de 2010, iniciou no curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, no Instituto Federal Goiano – Campus de Rio Verde, obtendo título de mestre em fevereiro de 2012.

Em março de 2013, iniciou no curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, sob a orientação do Professor Alan Carlos Costa.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	xv
RESUMO GERAL	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
OBJETIVO	7
CAPÍTULO I	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Material vegetal e as condições de crescimento	14
2.2. Imposição dos tratamentos.....	15
2.3. Avaliação das trocas gasosas	15
2.4. Avaliação de Imagens de fluorescência da clorofila a	15
2.5. Determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos	16
2.6. Avaliação de Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	16
2.7. Determinação dos sintomas visíveis	16
2.8. Análise estatística	17
3. RESULTADOS	18
3.1 Variáveis microclimáticas.....	18
3.2 Trocas gasosas	18

3.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	22
3.4. Concentração de pigmentos cloroplastídicos.....	27
3.5. Microscopia eletrônica de varredura.....	29
3.6. Sintomas visíveis	32
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO II.....	43
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	46
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Material Vegetal e Condições de Crescimento.....	50
2.2. Imposição dos tratamentos.....	50
2.3. Determinação dos sintomas de fitotoxicidade do glyphosate.....	51
2.4. Análises bioquímicas	51
2.5. Análise estatística	54
3. RESULTADOS	55
4. DISCUSSÃO	65
5. CONCLUSÕES	70
6. REFERÊNCIAS.....	72
CONCLUSÃO GERAL.....	76

ÍNDICE DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I.....13

Tabela 1. Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E), relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a), fluorescência inicial da clorofila a (F_0), rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_v'/F_m') e coeficiente de extinção não fotoquímica ($Y-NPQ$) de plantas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* tratadas com glyphosate.....20

CAPÍTULO II.....43

Tabela 1. Atividades da fenilalanina amônia liase (FAL), polifenol oxidase (PPO) peroxidases (POX), 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), compostos fenólicos totais, aminoácidos solúveis totais, proteínas solúveis totais e malondialdeído (MDA) de plantas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* tratadas com glyphosate.....56

Tabela 2. Concentração de ácido chiquímico em folhas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* tratadas com glyphosate.....60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	8
Figura 1. Taxa fotossintética (A) [A – B], condutância estomática (g_s) [C – D], taxa transpiratória (E) [E – F] e relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) [G e H] nas plantas de <i>Pouteria torta</i> e <i>Alibertia edulis</i> em resposta às doses crescente de glyphosate (A, G e H), e da interação entre as doses crescentes do glyphosate com o tipo de folha avaliada (B e D), além da interação entre às doses crescentes do glyphosate com as horas após aplicação do herbicida (HAA) (C, E e F). Os dados são médias de $n = 24$ (A, G e H), $n = 4$ (B, C, D, E e F).....	21
Figura 2. Fluorescência inicial da clorofila a (F_0) [A e B] e rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) [C e D] nas plantas de <i>Pouteria torta</i> e <i>Alibertia edulis</i> em resposta às doses crescente do glyphosate (A e B) e da interação entre as doses crescentes do glyphosate com as horas após aplicação do herbicida (HAA) (C e D). Os dados são médias de $n = 24$ (A e B), $n = 4$ (C e D).	23
Figura 3. Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_v'/F_m') [A e B] e coeficiente de extinção não fotoquímica (Y-NPQ) [C e D] nas plantas de <i>Pouteria torta</i> e <i>Alibertia edulis</i> em resposta às doses crescente do glyphosate (C) e da interação entre as doses crescentes do glyphosate com as horas após aplicação do herbicida (HAA) (A, B e D). Os dados são médias de $n = 4$ (A, B e D), $n = 24$ (C).....	24
Figura 5. Imagens de fluorescência inicial da clorofila a (F_0), rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_v'/F_m') e coeficiente de extinção não fotoquímica (Y-NPQ) nas folhas localizadas no ápice (F1) e no terço médio (F3) das plantas de em <i>Alibertia edulis</i> tratadas com as doses de 0, 200, 400 e 800 g e. a. ha^{-1} do glyphosate às 24, 312 e 1.728 horas após aplicação do herbicida (HAA). A escala de cor, abaixo das imagens, corresponde aos valores de 0 (preto) a 100 (rosa).26	26
Figura 6. Concentrações de clorofila a [A e B], clorofila b [C e D], clorofila total [E e F] e carotenoides [G e H] nas plantas de <i>Pouteria torta</i> e <i>Alibertia edulis</i> em respostas às doses crescentes do glyphosate (A, B e H) e da interação entre as doses crescentes do glyphosate com as horas após aplicação do herbicida (HAA) (C, D, E, F e G). Os dados são médias de $n = 8$ (A, B e H), $n = 4$ (C, D, E, F, e G).	28

Figura 7. Eletromicrografias das superfícies foliares de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis*. Visão geral da superfície adaxial de folhas localizadas no ápice (F1) e no terço médio (F3) de plantas submetidas às doses de 0, 200, 400 e 800 g e.a h⁻¹ de glyphosate. 30

Figura 8. Eletromicrografias da superfície foliar de *Pouteria torta*. Folhas apicais (F1) (A – D); Folhas do terço médio (F3) (E – F). Visão geral da superfície adaxial (A); detalhes das ceras epicuticulares da superfície abaxial (seta) e presença de estômatos (ES) (B); estômato sadio do controle (C); estômatos danificados submetidas a dose de 800 g e.a h⁻¹ de glyphosate (D); visão geral do dano aos estômatos (seta), estriamento das células subsidiárias e a superfície epidérmica de folhas submetidas a dose de 400 g e.a h⁻¹ de glyphosate (E). Detalhe em maior aumento do dano no complexo estomático (F). 31

Figura 9. Eletromicrografias da superfície foliar de *Alibertia edulis*. Superfície abaxial com presença de tricomas e estômatos (A); detalhe dos estômatos (ES), tricomas (TR) e presença de ceras (Ce) nas folhas apicais (F1) não tratadas com glyphosate (B); visão geral da superfície adaxial de folhas do ápice (F1) não tratadas com glyphosate (C); visão geral da superfície adaxial de folhas do ápice (F1) submetidas a dose de 800 g e.a h⁻¹ de glyphosate (D). 32

Figura 10. Sintomas visíveis em folhas localizadas no ápice (F1) e terço médio (F3) [A] de *Pouteria torta* submetidas a doses crescentes do glyphosate (0, 200, 400 e 800 g a. e ha⁻¹) às 312 horas após a aplicação do herbicida. Ausência de sintomas visíveis em folhas F1 e F3 [B] de *Alibertia edulis* submetidas a doses crescentes do glyphosate (0, 200, 400 e 800 g a. e ha⁻¹) às 1.728 horas após aplicação do herbicida. 33

CAPÍTULO II 43

Figura 1. Concentração do ácido chiquímico [A e B], atividades da 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) [C e D], peroxidase (POX) [E e F], polifenoloxidase (PPO) [G e H] e fenilalanina amônia-liase (FAL) [I e J], em folhas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* em função das doses do glyphosate (A, B, C, D, E, F, G e H) e da interação entre as doses do glyphosate e horas após aplicação (I). Os dados são médias de $n = 8$ (A, B, C, D, E, F, G e H), $n = 4$ (I). As barras representam o desvio padrão da média ($n = 4$) (F). 58

Figura 2. Concentração do ácido chiquímico em folhas em desenvolvimento e completamente expandidas de *Pouteria torta*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=8$... 59

Figura 3. Atividade da 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (A), e concentração de compostos fenólicos totais (B) em folhas de *Alibertia edulis* em função das horas após aplicação do glyphosate. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n = 16$ 61

Figura 4. Concentrações de compostos fenólicos totais [A e B], aminoácidos solúveis totais [C e D], proteínas solúveis totais [E e F] e de malondialdeído (MDA) [G e H] em folhas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* submetidas às doses do glyphosate [A, B, C, D, E e F] e da interação entre as doses do glyphosate e horas após aplicação (G). Os dados são médias de $n = 8$ (A, C, E) e $n = 4$ (G). As barras representam o desvio padrão da média ($n = 4$) (B, D, F e H). 62

Figura 5. Concentração de compostos fenólicos totais (A) e de aminoácidos solúveis totais (B) em folhas de *Pouteria torta* em função das horas após aplicação do glyphosate. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n = 16$ 63

Figura 6. Sintomas visíveis de folhas de *Pouteria torta* às 312 horas após a aplicação em resposta as diferentes doses de glyphosate [A (0 g. e. a ha⁻¹), B (200 g. e. a ha⁻¹), C (400 g. e. a ha⁻¹) e D (800 g. e. a ha⁻¹)] e ausência de sintomas visíveis em folhas de *Alibertia edulis* às 1.728 horas após aplicação em resposta às mesmas doses de glyphosate descritos acima para *P. torta*. 64

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES

Y (NPQ)	Coeficiente de extinção não fotoquímica	
A	Taxa fotossintética	($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
Car	Carotenoides	($\mu\text{g cm}^{-2}$)
C_i/C_a	Relação entre concentração interna e externa de CO_2	
Cl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>	($\mu\text{g cm}^{-2}$)
Cl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>	($\mu\text{g cm}^{-2}$)
Cl totais	Clorofilas totais	($\mu\text{g cm}^{-2}$)
CO_2	Dióxido de carbono	
<i>E</i>	Taxa transpiratória	($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
EPSPs	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína
EROs	Espécies reativas de oxigênio	
ETR	Taxa relativa de transporte de elétrons	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
F_0	Fluorescência inicial	
F1	Folhas do ápice	
F3	Folhas do terço médio	
FAL	Fenilalanina amônia-liase	$\mu\text{mol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína
FSII	Fotossistema II	
Fv/Fm	Rendimento quântico potencial do fotossistema II	
Fv'/Fm'	Rendimento quântico efetivo do fotossistema II	
G_s	Condutância estomática	($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio	
HAA	Horas após aplicação	
MDA	Malonaldeído	(mmol/g Massa Fresca)
PEP	Fosfoenolpiruvato	
POX	Peroxidases	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína
PPO	Polifenol oxidase	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína
S3P	Shiquimato-3-fosfato	
TBA	Ácido tiobarbitúrico	
TCA	Ácido tricloroacético	

RESUMO GERAL

REZENDE-SILVA, SUEISLA LOPES. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2016. ***Pouteria torta* e *Alibertia edulis*: Espécies nativas do cerrado indicadoras da ação do glyphosate.** Orientador: Dsc. Alan Carlos Costa. Coorientadores: Dsc^a. Clarice Aparecida Megguer e Dsc. Fábio Henrique Dyszy.

As transformações ocorridas no Cerrado, decorrente da alta demanda agrícola, acarretam o uso intensivo de defensivos agrícolas, cujos impactos nos ecossistemas naturais ainda são poucos reportados. A seleção de plantas nativas com capacidade de bioindicação pode ser importante instrumento para o monitoramento e preservação do meio ambiente. Nesse contexto, as respostas fisiológicas e bioquímicas das espécies nativas do Cerrado *Pouteria torta* (Mart.) Radlk e *Alibertia edulis* Rich à ação do glyphosate foram investigadas. Objetivou-se com este estudo avaliar o potencial do uso das plantas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* como bioindicadoras da ação do herbicida glyphosate, além de selecionar biomarcadores responsivos mediante o estudo das características fisiológicas e bioquímicas em ambas as plantas. Foram conduzidos quatro experimentos independentes, sendo um para *P. torta* e o outro para *A. edulis*. Em ambos os ensaios os tratamentos consistiram da aplicação do glyphosate nas doses de 0 (controle), 200, 400 e 800 g e. a. ha⁻¹. Foram realizados estudos para avaliar o efeito do glyphosate nas trocas gasosas, na fluorescência da clorofila *a*, na concentração de pigmentos cloroplásticos, na morfoanatomia foliar, e ainda a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidases, polifenol oxidase e 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, bem como as concentrações de ácido chiquímico, compostos fenólicos,

aminoácidos e proteínas solúveis totais e de malondialdeído, além da ocorrência de sintomas visíveis em ambas as espécies. Os resultados revelaram que a sensibilidade diferiu entre as duas espécies estudadas, sendo *P. torta* mais responsiva aos efeitos tóxicos do glyphosate. Em *P. torta*, o glyphosate promoveu efeitos negativos no desempenho fotossintético, na concentração de clorofilas, na superfície epicuticular e estômatos, além de sintomas de fitotoxicidade, comprovada pela ocorrência de cloroses e necroses foliares e pela desestabilização das membranas celulares, além do comprometimento na síntese de aminoácidos, proteínas e compostos fenólicos e acúmulo de ácido chiquímico, resultante da inibição da enzima EPSPs. Por outro lado, *A. edulis* apresentou capacidade intrínseca de tolerar os efeitos tóxicos do herbicida, pois mesmo ocorrendo redução no processo fotossintético, na atividade da EPSPs, com resultante acúmulo de ácido chiquímico, isso não foi suficiente para comprometer a síntese dos principais metabólitos da via do chiquimato, bem como a integridade das membranas celulares. Isso foi evidenciado pela inalteração na síntese de aminoácidos e proteínas, na estrutura das membranas e pela ausência de sintomas de fitotoxicidade. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que *P. torta* é uma espécie bioindicadora, podendo ser usada como referencial dos efeitos deletérios do glyphosate em ecossistema de Cerrado. Os biomarcadores fisiológicos e bioquímicos responsivos ao glyphosate encontrados em *A. edulis* permitem classificar essa espécie como potencial biosensora da ação do glyphosate.

PALAVRAS-CHAVE: fotossíntese, fluorescência da clorofila *a*, ácido chiquímico, atividade enzimática, bioindicadores.

ABSTRACT

REZENDE-SILVA, SUEISLA LOPES. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, August, 2016. ***Pouteria torta* and *Alibertia edulis*: Cerrado native species indicators of glyphosate action.** Advisor: Dsc. Alan Carlos Costa. Co-Advisors: DSc. Clarice Aparecida Megguer and DSc. Fábio Henrique Dyszy.

Changes in the Brazilian Cerrado, due to high agricultural demand, results in the intensive use of agrochemicals, and impacts on natural ecosystems are still poorly reported. The selection of native plants with bioindication capacity may be an important tool for monitoring and preserving the environment. In this context, we investigated the physiological and biochemical responses of native species from Cerrado, *Pouteria torta* (Mart.) Radlk and *Alibertia edulis* Rich, exposed to glyphosate. The aim of this study was to evaluate the potential of *Pouteria torta* and *Alibertia edulis* plants as bioindicators of the glyphosate action, and select responsive biomarkers according to the study of the physiological and biochemical characteristics in both plants. Four independent experiments were conducted with plants of *P. torta* and *A. edulis*. The experiments consisted in the application of glyphosate at four doses: 0 (control), 200, 400 and 800 g *a.e.* ha⁻¹. After exposure, effects of glyphosate on gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, chloroplast pigments concentration, leaf morphoanatomy, activity of phenylalanine ammonia lyase, peroxidases, polyphenol oxidase and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and the shikimic acid concentrations of,

phenolics, amino acids and soluble protein and malondialdehyde, as well as the occurrence of visible symptoms were evaluated in both species. The results showed that the sensitivity differed between the two species, and *P. torta* was more responsive to the toxic effects of glyphosate. In *P. torta*, glyphosate promoted negative effects on the photosynthetic performance, chlorophyll concentration, epicuticular surfaces and stomata, and visible phytotoxic symptoms, such as leaf chlorosis and necrosis and the destabilization of cellular membranes. In addition glyphosate affected the synthesis of amino acids, proteins and phenolic compounds and accumulation of shikimic acid, resulting from the inhibition of EPSPs. On the other hand, *A. edulis* presented an intrinsic ability to tolerate the toxic effects of the herbicide, because even with a reduction in the photosynthetic process and the activity of the EPSPs, resulting in accumulation of shikimic acid, this was not enough to compromise the synthesis of the main metabolites of the shikimate pathway, and the integrity of cell membranes. This was evidenced by the unchanged synthesis of amino acids and proteins, structure of the membranes and by the absence of phytotoxicity symptoms. Based on these results, we concluded that *P. torta* is a potential bioindicator species of the deleterious effects of glyphosate in the Cerrado ecosystem. Moreover, we concluded that the physiological and biochemical responses to glyphosate observed in *A. edulis* allow us to classify this species as a potential biosensor of glyphosate action.

KEY WORDS: photosynthesis, chlorophyll *a* fluorescence, shikimic acid, enzyme activity, bio-indicators.

INTRODUÇÃO GERAL

Os Cerrados são savanas sazonais que ocupam mais de dois milhões de Km², representando 23% da área total do Brasil (Ratter et al, 1997). Esse bioma apresenta vários tipos fisionômicos, concentrando cerca de um terço da biodiversidade nacional e 5% da flora e da fauna mundial (Batlle-Bayer et al, 2010). Porém, nos últimos anos as transformações ocorridas no Cerrado, decorrentes da alta demanda agrícola (Santos et al, 2016), trouxeram danos ambientais, tais como a fragmentação de habitats (Franco et al, 2014), degradação de ecossistemas, alterações nos regimes de queimadas, desequilíbrios no ciclo do carbono e possivelmente modificações climáticas regionais (Klink, 2005).

Concomitante à elevada produção de grãos na região do Cerrado, ocorre a intensificação no uso de herbicidas (Santos et al, 2016). Dentre eles, o glyphosate se destaca em relação aos demais, é não seletivo, de baixo custo e amplamente utilizado no manejo de plantas daninhas no Brasil e no Mundo (Duke e Powles, 2008). Depois de aplicado nas folhagens, esse herbicida é rapidamente absorvido através da cutícula (Kirkwood et al, 2000) e translocado pelo floema em direção aos tecidos meristemáticos (Yamada, 2007). Sua penetração é fortemente influenciada pelas características morfológicas das folhas, tais como a distribuição das ceras epicuticulares, composição química e polaridade da cutícula (De la Cruz et al, 2016). Nas ceras epicuticulares existem componentes hidrofílicos, como a cutina e pectina, por onde a difusão de herbicidas solúveis em água, como o glyphosate, podem atravessar (Yilmaz e Dane, 2012).

Ao ser absorvido, o glyphosate compete pelo sítio de ligação da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, E.C. 2.5.1.19) que catalisa a transferência de parte

do grupo enolpiruvil do fosfoenol piruvato (PEP) para o grupo 5-hidroxil do chiquimato 3-fosfato (S3P), produzindo o enolpiruvilchiquimato-3-fosfato e fosfato inorgânico na rota do ácido chiquímico (Herrmann e Weaver, 1999; Orcaraya et al, 2012). A inibição da EPSPs se dá através de mecanismo competitivo, em que a molécula de glyphosate compete com o fosfoenolpiruvato pelo sítio ativo da EPSPs (Mobin et al, 2015). Uma intrincada rede de interações entre substrato/inibidor e enzima é realizada através de ligações de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas, envolvendo pelo menos 20 aminoácidos (Schönbrunn et al, 2001).

Em consequência da inibição da enzima EPSPs pelo glyphosate ocorre o acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos (Rojano-Delgado et al, 2012; Schrübbers et al, 2014), resultando em alterações na síntese de proteínas e aminoácidos (Zulet et al, 2013), de clorofilas (Zobiolo et al, 2012), na atividade de enzimas, tais como fenilalanina amônia liase (Fal) (Maroli et al, 2015; Mobin et al, 2015), além de comprometimento na fotossíntese e na fluorescência da clorofila *a* (Yanniccara et al, 2012; Mateos-Naranjo 2013; Gomes et al, 2016; Gomes e Juneau, 2016).

A aplicação inadequada de herbicidas pode acarretar a dispersão das gotas para as plantas não alvo, provocando fitointoxicação e danos às espécies vegetais (Alves et al, 2000; Gusmão et al, 2011; Egan et al, 2014). Isso pode acarretar a contaminação ambiental e perda da biodiversidade no entorno dos plantios agrícolas (Boutin, 2014; Egan et al, 2014) mediante a fitotoxicidade foliar (Schrübbers et al, 2014), ou mesmo desencadear a morte de plantas sensíveis poucos dias após a sua aplicação (Yamada e Castro, 2007). Nesse cenário, o biomonitoramento é importante ferramenta para estimar os efeitos de herbicidas na contaminação de remanescentes de vegetação nativa.

O bimonitaramento requer a identificação de plantas sensíveis, as quais indiquem a condição do ambiente em relação a contaminantes. As plantas que apresentam sintomas visíveis de fitotoxicidade em resposta a determinando xenobiótico é classificada como bioindicadoras (Fränzle, 2003; De Termmerman et al, 2004; Larcher, 2006). No entanto, nem todas as plantas são sensíveis ao ponto de manifestar efeitos fitotóxicos decorrentes do contaminante no ambiente, mas respondem com mudanças em nível fisiológico e/ou bioquímico, o que as caracterizam como plantas com potencial biossensor (De Termmerman et al, 2004). As respostas fisiológicas, bioquímicas e morfológicas induzidas pelos contaminantes são denominadas de biomarcadores, proporcionam informação sobre o estado de saúde do ambiente (Walker et al, 1996).

Nos últimos anos, estudos apontaram que a condutância estomática (Yanniccaria et al, 2012), a fluorescência da clorofila *a* (Silva et al, 2014), o acúmulo de ácido chiquímico (Schrübbbers et al, 2014; Gomes et al, 2016) e do metabólito glioxilato (Rojano-Delgado et al, 2012) são bons biomarcadores do efeito do herbicida glyphosate em plantas de *Lolium perenne*, *Raphanus sativus*, *Coffea arabica*, *Salix miyabeana* e biótipos de *Lolium* spp. No entanto, estudos visando identificar plantas com potencial bioindicador, bem como a identificação de biomarcadores responsivos aos efeitos tóxicos do glyphosate em ambiente de Cerrado são incipientes. Assim, a seleção e validação de plantas nativas com capacidade de bioindicação pode ser importante instrumento para o monitoramento e preservação do meio ambiente. Nesse contexto, as respostas fisiológicas e bioquímicas das espécies nativas do Cerrado: *Pouteria torta* (Mart.) Radlk e *Alibertia edulis* Rich, em resposta à ação do glyphosate foram investigadas. As espécies *P. torta* e *A. edulis*, pertencente às famílias Sapotaceae e Rubiaceae, respectivamente, foram escolhidas para este estudo por serem de ampla distribuição no Cerrado. Essas espécies são plantas arbóreas, de fácil propagação via sementes e de crescimento relativamente rápido (Almeida et al, 1998; Lorenzi, 2002; Perfeito et al, 2005) quando comparada a outras nativas do Cerrado. Por isso, o interesse em se estudar o potencial dessas espécies para o biomonitoramento da ação do glyphosate no Cerrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, S. P., Proença, C. E. B., Sano, S. M., Ribeiro, J. F., 1998. Cerrado: Espécies vegetais úteis. Embrapa, Brasília.
- Alves, L.W.R.; Silva, J.B.; Souza, I.F., 2000. Efeito da aplicação de subdoses dos herbicidas glyphosate e oxyfluorfen, simulando deriva sobre a cultura de milho (*Zea mays* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, v.24, n.4, p.889-897.
- Battle-Bayer, L., Batjes, N. H., Prem S., 2010. Bindraban Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 137, p. 47 – 58.
- Boutin, C., Strandberg, B D., S.K.D., Mathiassen, P.J. T., 2014. Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications?, *Environmental Pollution*. 185, 295-306.
- De la Cruz, R. A., Barro, F., Domínguez-Valenzuela, J. A., & De Prado, R. (2016). Physiological, morphological and biochemical studies of glyphosate tolerance in *Mexican Cologania* (*Cologania broussonetii* (Balb.) DC.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 98, 72-80.
- De Temmerman, L., Bell, J.N.B.J., Garrec, P., Klumpp, A., Krause, G.H.M., Tonneijck, A.E.G., 2004. Biomonitoring of air pollution with plants e considerations for the future. 2004. In: A. Klumpp, W. Ansel, G. Klumpp (Eds.), *Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness*, Cuvillier Verlag, Gottingen, pp. 337-373.
- Duke, S.O. & Powles, S.B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64, 319–325.
- Egan, J. F., Bohnenblust, E., Goslee, s. Mortensen, D., Tooker, J., 2014. Herbicide drift can affect plant and communities. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 185, 77-87.
- Franco, A. C., Rossatto, D. R., Silva, L. C. R., Ferreira, C. S., 2014. Cerrado vegetation and global change: The role of functional types, resource availability and disturbance in regulating plant community responses to rising CO₂ levels and climate warming. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 26, 19-38.
- Fränzle, O. Bioindicators and environmental stress assessment., 2003. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, v.6, p.41- 84.
- Gomes, M. P., Juneau, P., 2016. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide?. *Environmental Pollution*.

- Gomes, M. P.; Manac'h, S. G. le; 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*. V. 130, P. 65-70.
- Gusmão, G.A., Neto, R. M. R., Yamashita, O. M., 2011. Simulated drift of glyphosate in jenipapo (*Genipa americana* L.) young plants. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v.10, n.1, p.13-19.
- Herrmann, K. M., Weaver, L. M., 1999. "The shikimate pathway." *Annual Review of Plant Biology* 50.1 (1999): 473-503.
- Kirkwood, R. C., Hetherington, R., Reynolds, T. L., & Marshall, G., 2000. Absorption, localisation, translocation and activity of glyphosate in barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* (L) Beauv): influence of herbicide and surfactant concentration. *Pest management science*, 56(4), 359-367.
- Klink, C. A., & Machado, R. B. (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1(1), 147-155.
- Larcher, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RIMA, 2006. 531p.
- Lorenzi, H., *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2002. 1 Nova Odessa, 4 ed. São Paulo: Ed. Plantarum, 368p.
- Maroli, A. S., Nandula, V., Dayan, F. E., Duke. S., Gerard, P., Tharayi, N., 2015. Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an *Amaranthus palmeri* biotype. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 9199-9209.
- Mateos-Naranjo, E., & Perez-Martin, A. 2013. Effects of sub-lethal glyphosate concentrations on growth and photosynthetic performance of non-target species *Bolboschoenus maritimus*. *Chemosphere*, 93(10), 2631-2638.
- Mobin, M., Wu, C.H, Tewari, R. K., Paek, K.Y., 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 (PCTOC)*, 120, (1), 291-301.
- Orcaraya, L., Zulet., Zabalza, A.Z., Royuela, M., 2012. Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate, *Journal of Plant Physiology*, v.169, p. 27-33.
- Perfeito, J. P.; Santos, M. L.; López, K. S. E.; Paula, J. E.; silveira, D., 2005. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, p.183-186, 2005.
- Ratter, J. A., Ribeiro, J. F., Bridgewater, S., 1997. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*. 80, 223–230.
- Rojano-Delgado, A. M., Cruz-Hipolito, H., De Prado, R., De Castro, M. D. L., Franco, A. R., 2012. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. utilis plants. *Phytochemistry*, 73 (1), 34- 41.
- Santos, W.F., Procópio, S.O., Silva, A.G., Fernandes, M.F., Barroso, A.L.L., 2016. Weed phytosociological and floristic survey in agricultural areas of southwestern Goiás region. *Planta Daninha, Viçosa-MG*, v. 34, n. 1, p. 65-80.
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S., Wolfgang Kabsch, W., 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *PNAS*, v. 96, n. 4, p. 1376–1380.
- Schrübbers, L. C., Valverde, B. E., Sørensen, J.C., Cedergreen, N., 2014. Glyphosate spray drift in *Coffea arabica* – Sensitivity of coffee plants and possible use of

- shikimic acid as a biomarker for glyphosate exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 115, 15-22.
- Silva, F., Costa, A., Pereira Alves, R., Megguer, C., 2014. Chlorophyll Fluorescence as an Indicator of Cellular Damage by Glyphosate Herbicide in *Raphanus sativus* L. Plants. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 2509-2519.
- Walker, C.H.; Hopkin, S.P.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis. Londres, 321p., 1996.
- Yamada, T.; Castro, P.R.C.E., 2007. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agrônômicas. International Plant Nutrition Institute . Piracicaba: Informações Agrônômicas, 24p. (Boletim Técnico 119).
- Yannicaria, M., Istilart, C., Giménez, D. O., Castro, A. M., 2012. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. *Crop Protection*. v.32, p. 12-16.
- Yilmaz, G., Dane, F., 2012. Phytotoxicity Induced by Herbicide and Surfactant on stomata and epicuticular wax of Wheat. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(6), 7757-7765.
- Zobiolo, L. H. S., Kremer, R. J, de Oliveira, Jr. R. S., Constantin, J., 2012. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175, 319–330.
- Zulet, A., Gil-Monreal., Villamor, J. G., Zabalza, A., Renier A. L., Hoorn., 2013. Proteolytic Pathways Induced by Herbicides That Inhibit Amino Acid Biosynthesis. *Plos One*, v. 8.

OBJETIVO

Objetivou-se com este estudo avaliar o potencial das plantas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* como bioindicadoras da ação do herbicida glyphosate, além de selecionar biomarcadores responsivos mediante estudo das características fotossintéticas e bioquímicas em ambas as plantas.

CAPÍTULO I

BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DA AÇÃO DO GLYPHOSATE EM DUAS ESPÉCIES NATIVAS DO CERRADO BRASILEIRO

(Normas de acordo com a revista Pesticide Biochemistry and Physiology)

RESUMO

Com o aporte do crescente uso do glyphosate no ecossistema do Cerrado, a identificação de biomarcadores fisiológicos sensíveis à ação desse herbicida, bem como seleção de espécies bioindicadoras nativas desse bioma, pode contribuir para obtenção de um método sustentável de manejo do impacto do glyphosate no ambiente. Neste sentido, objetivou-se, neste estudo, avaliar e caracterizar possíveis alterações no metabolismo fotossintético de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk e *Alibertia edulis* Rich tratadas com glyphosate e, assim, definir biomarcadores apropriados e específicos da ação desse herbicida, além de definir o potencial bioindicador das duas espécies nativas do Cerrado. Foram conduzidos dois experimentos independentes para *P. torta* e *A. edulis*, em que os tratamentos consistiram da aplicação do glyphosate nas doses de 0 (controle), 200, 400 e 800 g e. a. ha⁻¹. Foram realizados estudos para avaliar o efeito do glyphosate nas trocas gasosas, na fluorescência da clorofila *a*, na concentração de pigmentos cloroplastídicos e na morfoanatomia foliar. De modo geral, o glyphosate promoveu alterações no metabolismo fotossintético em ambas as espécies. Os resultados revelaram que *P. torta* possui maior sensibilidade ao glyphosate, particularmente pela intensificação dos efeitos negativos no desempenho fotossintético, na concentração de clorofilas, na superfície epicuticular e estômatos. Os sintomas de fitotoxicidade em *P. torta* estão relacionados com os danos fotossintéticos e morfoanatômicos, assim, *P. torta* é uma espécie bioindicadora, podendo ser usada como referencial dos efeitos deletérios do glyphosate em ecossistema de Cerrado. Por outro lado, *A. edulis*, demonstrou diante dos tratamentos, notável tolerância ao glyphosate, com ausência de danos às clorofilas e fitotoxicidade foliar, entretanto tenha promovido diminuição no processo fotossintético.

PALAVRAS-CHAVE: herbicida, fotoproteção, fotoinibição, fitotoxicidade.

ABSTRACT

With the increasing use of glyphosate in the Cerrado ecosystem, identifying physiological biomarkers of this herbicide action, as well as selecting bioindicator native species of this biome, may contribute to achieving a sustainable method of managing the impact of glyphosate on the environment. In this sense, the aim of this study was to evaluate and characterize possible changes in the photosynthetic metabolism and leaf morphoanatomy of *Pouteria torta* (Mart.) Radlk and *Alibertia edulis* Rich treated with glyphosate and thus set appropriate and specific biomarkers of the action of this herbicide, in addition to defining the bioindicator potential of these two Cerrado native species. Two independent experiments were conducted to *P. torta* and *A. edulis*. The treatments consisted of glyphosate application at doses of 0 (control), 200, 400 and 800 g a. e. ha⁻¹. There were evaluated the effect of glyphosate on gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, chloroplast pigments concentration and leaf morphoanatomy. In general, glyphosate promoted changes in photosynthetic metabolism in both species. Results showed that *P. torta* is more sensitive to glyphosate, because of the negative effects intensification on the photosynthetic performance, chlorophyll concentration, epicuticular surface and stomata. Symptoms of phytotoxicity in *P. torta* are related to the photosynthetic and morphoanatomic damage, thus *P. torta* is a bioindicator species and can be used as a reference of the deleterious effects of glyphosate in the Cerrado ecosystem. On the other hand, *A. edulis* has shown remarkable tolerance to the glyphosate treatment, neither with damage to chlorophylls nor foliar phytotoxicity, even showing a decrease in the photosynthetic process.

KEY WORDS: herbicide, photoprotection, photoinhibition, phytotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

Os Cerrados são savanas sazonais que ocupam mais de dois milhões de Km², representando cerca de 23% do território brasileiro (Ratter et al, 1997). Esse bioma é constituído por vários tipos fitofisionômicos, em que se concentram alto índice de espécies endêmicas (Myers et al, 2000). Apesar da sua elevada importância ecológica, nos últimos anos cerca da metade da área original do Cerrado foi transformada em pastagens e culturas anuais (Ratter et al, 1997; Klink e Machado 2005), culminando na fragmentação de habitats e degradação do ecossistema (Franco et al, 2014, Klink e Machado 2005, Battle-Bayer et al, 2010). Essas alterações ao longo dos anos caracterizam o Cerrado como uma das áreas prioritárias para conservação, estando entre um dos hotspots mundiais (Myers et al, 2000).

Concomitante ao aumento de áreas destinadas à produção agrícola, a intensificação no uso de herbicidas é notória. A aplicação de herbicidas é essencial para a produção em larga escala de alimentos (Belo et al, 2016), no entanto, desencadeia efeitos negativos ao ambiente (Freemark e Boutin 1995; Belo et al, 2016). O glyphosate (N-fosfometil- glicina), amplamente utilizado no Brasil e no Mundo, é um herbicida não seletivo, pós-emergente e de baixo custo (Duke e Powles, 2008). Quando aplicado, o glyphosate é rapidamente absorvido pelas folhas e translocado pelo floema em direção aos tecidos meristemáticos (Yamada e Castro, 2007). Ao inibir a 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, E.C. 2.5.1.19), esse herbicida promove a desregulação da rota do ácido chiquímico, comprometendo a síntese de proteínas e aminoácidos (Zulet et al, 2013). Embora de forma ainda não elucidada, o glyphosate causa perturbações no processo fotossintético e na eficiência fotoquímica do fotossistema II, além de afetar a concentração de pigmentos cloroplastídicos (Yamada e Castro, 2007; Yannicaria et al, 2012; Mateos-Naranjo 2013; Zobiolo et al, 2012;

Gomes et al, 2016). Recentemente, Gomes e Juneau (2016) reportaram que o efeito negativo do glyphosate sobre a fotossíntese de plantas de *Lemna minor* se deu fundamentalmente pela interferência no fluxo de elétrons mitocondrial.

Em áreas de agricultura intensiva, os herbicidas podem alcançar plantas não alvo por meio de deriva e escoamento (Boutin e Jobin, 1998; Boutin 2014). Nos últimos anos, os efeitos potenciais dos herbicidas em vegetação adjacente a áreas agriculturáveis tem sido alvo de estudos por meio do bimonitoramento (Boutin et al, 2014; Egan et al, 2014). Esse método baseia-se na seleção de plantas com sensibilidade ao xenobiótico de interesse de estudo (Klumpp et al, 1994). Essas espécies, de modo geral, apresentam alterações a nível fisiológico e bioquímico, além de resultar em efeitos visíveis que caracterizam fitotoxicidade. Essas alterações, em conjunto, tornam possível o emprego de determinada espécie como bioindicadora de estresse ambiental (Larcher 2006, Fränzle, 2003; De Termmerman et al, 2004). Porém, nem todas as espécies manifestam sintomas visíveis do estresse, mas respondem com mudanças a nível fisiológico e/ou bioquímico, o que as caracterizam como plantas com potencial biossensor (De Termmerman et al, 2004). As alterações fisiológicas, bioquímicas e/ou morfológicas causadas nos organismos pelos contaminantes são definidas como biomarcadores (Walker, 1998). Alterações no controle estomático (Yannicaria et al, 2012), na concentração de pigmentos cloroplastídicos (Gomes et al, 2016), na performance da taxa fotossintética e fluorescência da clorofila *a* (Dewez et al, 2008 e Kumar et al, 2014) e fitotoxicidade foliar (Benham et al, 2010) são potenciais biomarcadoras, que podem ser utilizadas na avaliação do impacto no ambiente desencadeado por xenobióticos (Lam e Gray 2003).

Com o aporte do crescente uso do glyphosate no Cerrado, a identificação de biomarcadores sensíveis à ação desse herbicida, bem como seleção de espécies bioindicadoras nativas desse bioma, podem fornecer um método sustentável de manejo do impacto do glyphosate no ambiente. Nesse contexto, a ampla distribuição, aliada à facilidade de multiplicação via semente, das espécies *Pouteria torta* (Mart.) Radlk (família Sapotaceae) e *Alibertia edulis* Rich (família Rubiaceae) (Almeida et al, 1998; Perfeito et al, 2005) as tornam promissoras para serem utilizadas em programas de biomonitoramento do Cerrado Brasileiro.

No presente estudo, foi investigada a hipótese de que plantas de *P. torta* e *A. edulis* possuem sensibilidade ao herbicida glyphosate, e resultará em alterações específicas no metabolismo fotossintético, que permitirão identificar biomarcadores da

ação desse herbicida. As alterações no metabolismo fotossintético poderão ser utilizadas para caracterizar o potencial bioindicador de ambas as espécies. Portanto, objetivou-se neste estudo avaliar e caracterizar possíveis alterações no metabolismo fotossintético de *P. torta* e *A. edulis* tratadas com glyphosate e, assim, definir biomarcadores apropriados e específicos da ação desse herbicida, além de definir o potencial bioindicador das duas espécies nativas do Cerrado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e as condições de crescimento

A multiplicação das plantas *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* se deu através de sementes. Frutos de *Pouteria torta* foram coletados na fazenda Santo Antônio, 16° 26' 29" S, 51° 7' 11" W, Iporá, Goiás, Brasil. Os frutos de *Alibertia edulis* foram coletados na fazenda Rio Preto, 18° 20' 29" S, 50° 8' 14" W, município de Rio Verde, Goiás, Brasil. Os frutos foram despulpados em peneira, e suas sementes lavadas e secas em local ventilado e sombreado, e posteriormente semeadas em areia lavada. Após 60 dias, as mudas foram transferidas para vasos de polietileno contendo 10 kg de substrato [preparado a partir da mistura de solo do tipo Latossolo Vermelho distroférrico e areia (2:1)], apresentaram as seguintes características químicas: pH em H₂O de 4,7; 2,6 mg/dm⁻³ de P; 14 mg/dm⁻³ de K; 0,75 cmolc/dm⁻³ de Ca; 0,22 cmolc/dm⁻³ de Mg; 3,1 cmolc/dm⁻³ de H+Al; 13,0 g dm⁻³ de matéria orgânica e 24,4% de saturação por bases. Com base nessa análise, a adubação do substrato foi realizada por vaso com adição de 1,52 g de ureia; 6,9 g fósforo; 6,9 g de potássio e 0,4 g de micronutrientes (aplicada por vaso) (Fritted Traced Elements® - São Paulo, Brasil). Plantas das duas espécies com 12 meses de idade, padronizadas quanto ao tamanho e vigor, foram utilizadas para a realização dos experimentos, e foram conduzidas em casa de vegetação aclimatizada. As variáveis microclimáticas (umidade e temperatura) da casa de vegetação foram monitoradas durante todo o período experimental mediante estação meteorológica modelo WATCH DOG (Weather Station, Spectrum Technologies, In., Aurora. IL, USA).

2.2. Imposição dos tratamentos

No período de setembro a novembro de 2013 foram realizados dois experimentos concomitantes, sendo um para a espécie *P. torta* e o outro para *A. edulis*. Para ambos os experimentos, os tratamentos consistiram da aplicação do herbicida glyphosate [Roundup Transorb®, sal de isopropilamina, contendo 480 g L⁻¹ do equivalente ácido (g e. a. ha⁻¹)] nas seguintes doses: 0, 200, 400 e 800 g e. a. ha⁻¹. O herbicida foi pulverizando mediante pulverizador costal (Herbicat® Catanduva, Brasil), munido de barra com quatro pontas de pulverização e bico da série XR Teejet® (XR11002-VP), com pressão constante de 3,0 bar mantida por CO₂ comprimido e volume de calda de 110,02 L ha⁻¹.

2.3. Avaliação das trocas gasosas

As trocas gasosas foram mensuradas em folhas localizadas no ápice (F1) (folhas jovens) e no terço médio (F3) (folhas expandidas) das plantas, às 24, 48, 72, 144, 264 e 312 horas após aplicação (HAA) para *P. torta* e às 24, 48, 72, 264, 312 e 1.728 HAA para *A. edulis*. Foram mensuradas as variáveis de taxa fotossintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa transpiratória (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), relação entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a) e taxa respiratória. As medições foram realizadas com analisador de gases infravermelho portátil (IRGA, modelo LI-6400XTR, LI-COR, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos). As medições de A , g_s , E e C_i/C_a foram realizadas entre 8h e 11h da manhã utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração atmosf\u00e9rica de CO₂ de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade ambiente de $75 \% \pm 2$.

2.4. Avalia\u00e7\u00e3o de Imagens de fluoresc\u00eancia da clorofila a

As an\u00e1lises de imagens da fluoresc\u00eancia da clorofila *a* foram realizadas nas mesmas folhas utilizadas para as medi\u00e7\u00f5es das trocas gasosas, conforme descrito acima. As mensura\u00e7\u00f5es foram realizadas \u00e0s 1, 6, 12, 24, 240 e 312 HAA para *P. torta* e \u00e0s 1, 6, 12, 24, 48, 72, 312 e 1.728 HAA para *A. edulis*. Esses tempos foram escolhidos para

avaliar os possíveis efeitos iniciais da ação do glyphosate. Foram obtidos os parâmetros de fluorescência inicial (F_0), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_v'/F_m') e coeficiente de extinção não fotoquímica (Y) NPQ utilizando fluorômetro de imagem de fluorescência da clorofila *a* modelo Imaging-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Alemanha). As imagens dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram processadas por meio do software Win.

2.5. Determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos

A metodologia descrita por Silva et al, (2014), com modificações, foi utilizada para determinar a concentração de pigmentos cloroplastídicos em discos foliares (18 cm²) oriundos de folhas localizadas no terço médio (F3) da planta. As coletas dos discos foliares foram realizadas às 24 e 312 HAA para *P. torta* e às 24 e 1.728 HAA para *A. edulis*. Os resultados foram expressos segundo proposto por Wellburn et al, (1997).

2.6. Avaliação de Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliação da superfície foliar o total de 40 fragmentos foliares medindo aproximadamente 5 cm² foram coletados das folhas localizadas no ápice (F1) e no terço médio (F3) das plantas de *P. torta* e de *A. edulis* às 312 e 1.728 HAA, respectivamente. As amostras foram fixadas em Karnovsky (1965) e armazenadas em etanol 70 %. Para as análises, as amostras foram previamente desidratadas em série acetônica crescente (80 %, 90 %, 100 %), acetona:HMDS (1:1) por 30 minutos e HMDS puro até a total evaporação do solvente (Araújo et al, 2003, modificado). Posteriormente, as amostras foram aderidas a suporte metálico (stubs) com fita dupla face e metalizadas com ouro, em metalizador (empregando-se equipamento Bal-Tec SCD 030, Geisenhein, Germany), para posterior observação em microscópio de varredura (Philips XL series XL 20). Essas análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Anatomia Vegetal do Instituto de Botânica de São Paulo.

2.7. Determinação dos sintomas visíveis

As plantas foram fotografadas a fim de verificar mudanças visíveis provocadas pelo glyphosate nas folhas F1 e F3 de *P. torta* e *A. edulis*, respectivamente, avaliada às

312 HAA e 1.728 HAA mediante observações visuais. Para registro foram realizadas imagens utilizando câmara Fujifilm FinePix (SL300®, Brasil).

2.8. Análise estatística

Neste estudo foram conduzidos dois experimentos independentes, sendo um para a espécie *P. torta* e outro para *A. edulis*. Para as análises de trocas gasosas e imagem da fluorescência da clorofila *a*, os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial de 4 (doses) x 6 (tempos de avaliação) x 2 (folhas de avaliação) com 4 repetições. O delineamento de blocos ao acaso em esquema fatorial de 4 (doses) x 2 (tempos de avaliação) com quatro repetições foi utilizado para a determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, ajustes de modelos de regressão e ao teste *F*. Os softwares SISVAR e SigmaPlot V.10 (SPSS Inc., USA) foram utilizados para as análises estatísticas e para a confecção dos gráficos, respectivamente.

3. RESULTADOS

3.1 Variáveis microclimáticas

Durante todo o período experimental houve 65 % (± 5) de umidade relativa média e temperaturas médias de 28 °C (± 5 , diurna) e 22 °C (± 5 , noturna). A pequena variação microclimática demonstra que os resultados obtidos neste estudo foram decorrentes exclusivamente do efeito do herbicida glyphosate, pois as espécies *P. torta* e *A. edulis* não foram expostas a outros estresses ambientais.

3.2 Trocas gasosas

O glyphosate promoveu comprometimento na performance das trocas gasosas e na fluorescência da clorofila *a* de ambas as espécies, mas de maneira mais pronunciada em *P. torta* (Tabela 1). Essa espécie apresentou redução substancial na *A* quando submetida à dose de 200 g e.a h⁻¹, com tendência de estabilização nas doses superiores (Figura 1 A). Concomitante com o decréscimo na *A*, a *gs* diminuiu em resposta às doses crescentes do glyphosate e com o tempo de avaliação (Figura 1 C). O glyphosate e o tempo de avaliação também desencadearam decréscimos na taxa transpiratória em *P. torta* (Figura 1 E), porém em menor proporção quando comparada ao decréscimo observado na *gs* (Figura 1 E). De modo inverso, a *Ci/Ca* em *P. torta* aumentou de maneira linear em resposta ao incremento das doses de glyphosate (Figura 1 G). Em *A. edulis* houve diminuição gradativa tanto na *A* quanto na *gs* em resposta ao incremento das doses de glyphosate (Figura 1 B e D). Essa resposta ocorreu de forma mais expressiva nas folhas localizadas no ápice (F1) em relação às do terço médio (F3) das

plantas, sobretudo para a *gs* (Figura 1 B e D). A *E* apresentou decréscimos em resposta ao aumento das doses do glyphosate e do tempo de avaliação (Figura 1 H), ao passo que, independente do tratamento, a C_i/C_a permaneceu inalterada em *A. edulis* (Figura 1 F e H). Independentemente da espécie, o glyphosate não alterou a taxa respiratória (dados não mostrados).

Tabela 1. Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E), relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a), fluorescência inicial da clorofila a (F_0), rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_v'/F_m') e coeficiente de extinção não fotoquímica (Y-NPQ) de plantas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* tratadas com glyphosate.

<i>Pouteria torta</i>									
Variáveis	GL	A	g_s	E	C_i/C_a	F_0	F_v/F_m	F_v'/F_m'	Y-NPQ
<i>Valores F</i>									
Doses	3	105.45**	5.54**	4.43**	15,84**	11.05**	33.87**	11.03**	17.99**
Horas	5	14.54*	11.14**	13.50**	1.06 ^{ns}	8.16**	17.62**	4.47**	1.54 ^{ns}
Folhas	1	5.60 ^{ns}	0.35 ^{ns}	0.03 ^{ns}	11.75**	1.68 ^{ns}	5.67 ^{ns}	14.23**	4.42 ^{ns}
Doses x Horas	15	1.01 ^{ns}	4.22 ^{ns}	4.49**	1.22 ^{ns}	1.66 ^{ns}	5.59**	4.08**	0.96 ^{ns}
Doses x Folhas	3	1.91 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.09 ^{ns}	1.73 ^{ns}	1.02 ^{ns}	2.69 ^{ns}	1.57 ^{ns}
Horas x Folhas	5	0.12 ^{ns}	0.73 ^{ns}	0.46 ^{ns}	1.07 ^{ns}	1.00 ^{ns}	2.39 ^{ns}	1.80 ^{ns}	1.24 ^{ns}
Doses x Horas x Folhas	15	0.55 ^{ns}	0.62 ^{ns}	0.53 ^{ns}	0.88 ^{ns}	0.65 ^{ns}	1.32 ^{ns}	1.03**	0.82 ^{ns}
CV (%)	-	23,39	31.24	29,35	14,60	26,98	11,58	24,36	12,92
<i>Alibertia edulis</i>									
Doses	3	18.51**	16.27**	15.94**	2.48*	9.21**	74.38*	4.59**	11.44*
Horas	5	3.75*	18.38**	11.68**	17.22*	11.73**	12.23**	10.33**	1.57 ^{ns}
Folhas	1	9.16*	38.86**	26.09**	0.84 ^{ns}	0.77 ^{ns}	2.24 ^{ns}	3.20 ^{ns}	2,51 ^{ns}
Doses x Horas	15	1.53 ^{ns}	1.55 ^{ns}	3.14**	1.05 ^{ns}	1.56 ^{ns}	0.00**	2.95**	3,93**
Doses x Folhas	3	4.19*	5.29**	2.84 ^{ns}	2.09 ^{ns}	2.17 ^{ns}	1.50 ^{ns}	1.20 ^{ns}	1.46 ^{ns}
Horas x Folhas	5	1.14 ^{ns}	4.18**	5.62**	1.23 ^{ns}	1.56 ^{ns}	2.36 ^{ns}	1.10 ^{ns}	1.40 ^{ns}
Doses x Horas x Folhas	15	1.06 ^{ns}	1.14 ^{ns}	5.62 ^{ns}	0.37 ^{ns}	0.257 ^{ns}	0.00 ^{ns}	1.10 ^{ns}	0.60 ^{ns}
CV (%)	-	23,95	14,56	30,71	6,89	4,93	10,18	22,78	16,95

ns, não significativo; ** significativo ao nível de 1%, * significativo ao nível de 5% pelo teste de F .

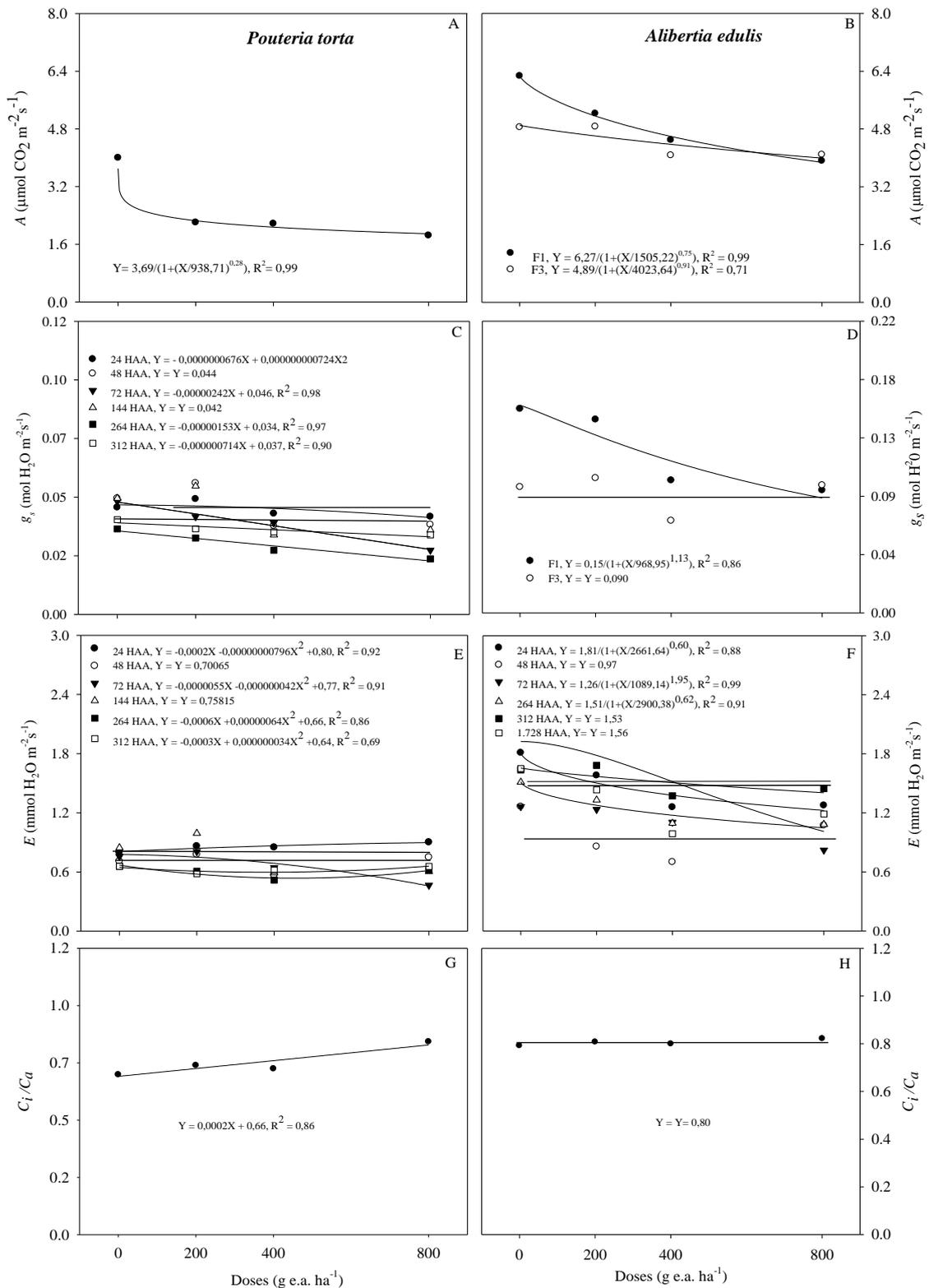


Figura 1. Taxa fotossintética (A) [A – B], condutância estomática (g_s) [C – D], taxa transpiratória (E) [E – F] e relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) [G e H] nas plantas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* em resposta às doses crescente de glyphosate (A, G e H), e da interação entre as doses crescentes do glyphosate com o tipo de folha avaliada (B e D), além da interação entre às doses crescentes do glyphosate com as horas após aplicação do herbicida (HAA) (C, E e F). Os dados são médias de $n = 24$ (A, G e H), $n = 4$ (B, C, D, E e F).

3.3. Fluorescência da clorofila *a*

Independentemente da espécie estudada, o glyphosate desencadeou alterações nas variáveis de fluorescência da clorofila *a*, porém de forma mais expressiva em *P. torta*. Nessa espécie houve danos na funcionalidade do complexo antena dos tilacoides em resposta ao glyphosate, evidenciado pelo aumento de F_o (Figura 2 A) e na dissipação não fotoquímica (Y) NPQ (Figura 3 C). Essas alterações ocorreram mesmo nas menores doses do herbicida, sobretudo a partir de 240 HAA. *P. torta* submetida a doses crescentes do herbicida apresentou decréscimos proeminentes na F_v/F_m (Figura 2 C) e na F_v'/F_m' (Figura 3 A) às 240 HAA. A diminuição na eficiência fotoquímica, evidenciada pela redução na F_v/F_m e F_v'/F_m' e incremento na F_o e (Y) NPQ (Figura 2 B e D; 3 B e C) também ocorreu em *A. edulis*, porém em proporção muito inferior à observada em *P. torta*.

As colorações marrom e vermelho-escura observadas na Figura 4, decorrentes da avaliação da F_o , F_v/F_m e F_v'/F_m' evidenciam que houve perda na capacidade fotossintética em *P. torta*, principalmente quando essa espécie foi submetida a dose de 800 g e. a. ha⁻¹ a partir de 240 HAA. Em contraste, em *A. edulis* não foram observadas grandes alterações na imagem de fluorescência da clorofila *a*, independentemente do tempo de avaliação e da dose do herbicida testada (Figura 5).

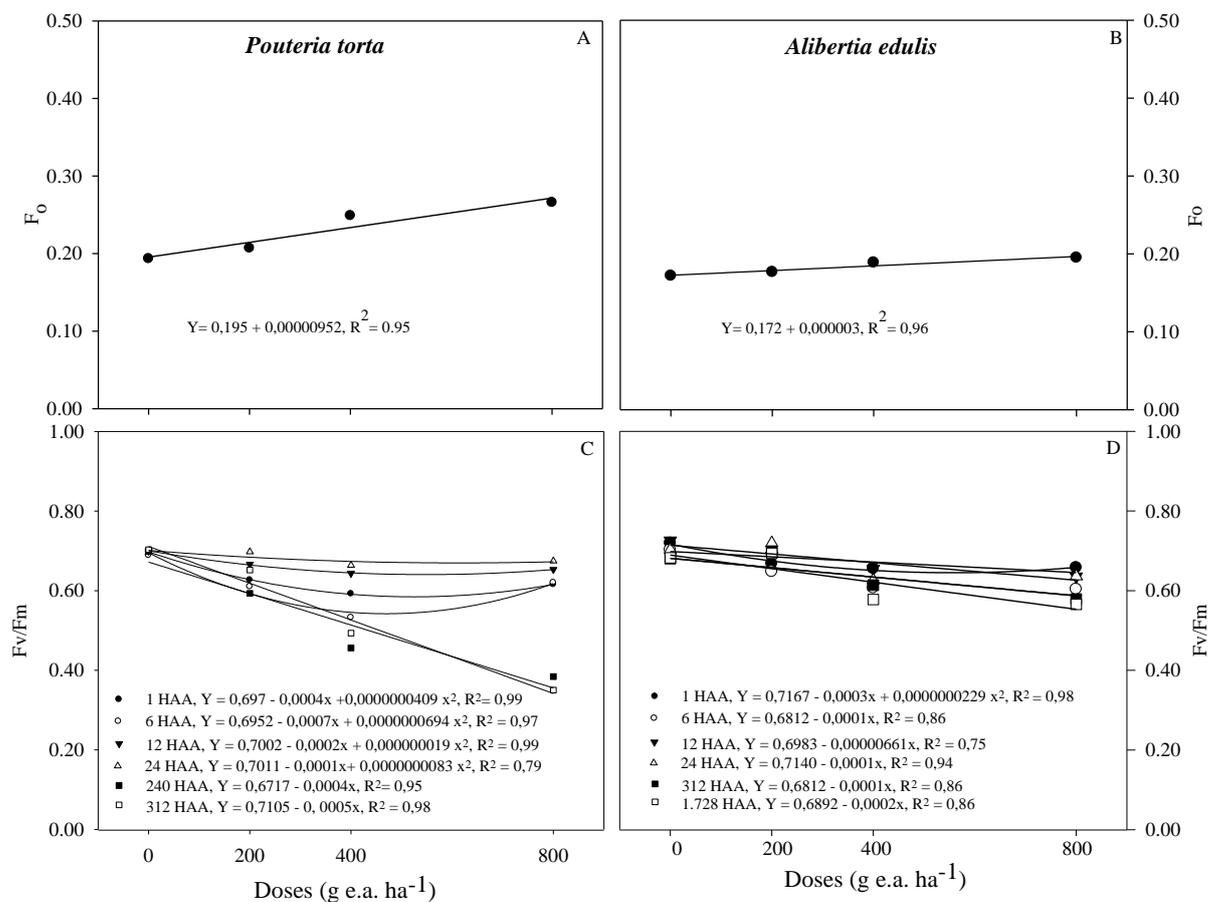


Figura 2. Fluorescência inicial da clorofila *a* (F₀) [A e B] e rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) [C e D] nas plantas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* em resposta às doses crescente do glyphosate (A e B) e da interação entre as doses crescentes do glyphosate com as horas após aplicação do herbicida (HAA) (C e D). Os dados são médias de *n* = 24 (A e B), *n* = 4 (C e D).

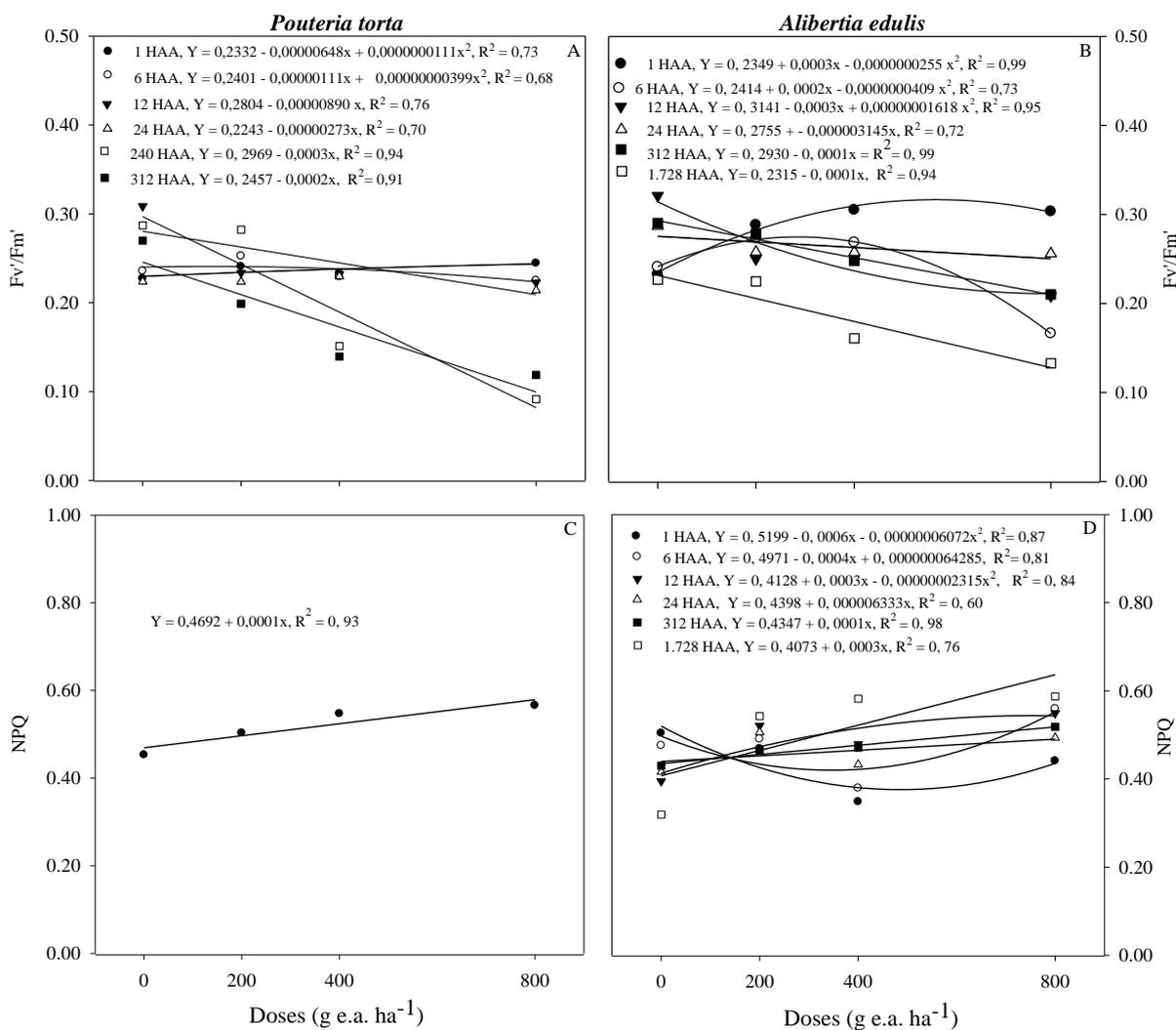


Figura 3. Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Fv'/Fm') [A e B] e coeficiente de extinção não fotoquímica (Y-NPQ) [C e D] nas plantas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* em resposta às doses crescente do glyphosate (C) e da interação entre as doses crescentes do glyphosate com as horas após aplicação do herbicida (HAA) (A, B e D). Os dados são médias de n = 4 (A, B e D), n = 24 (C).

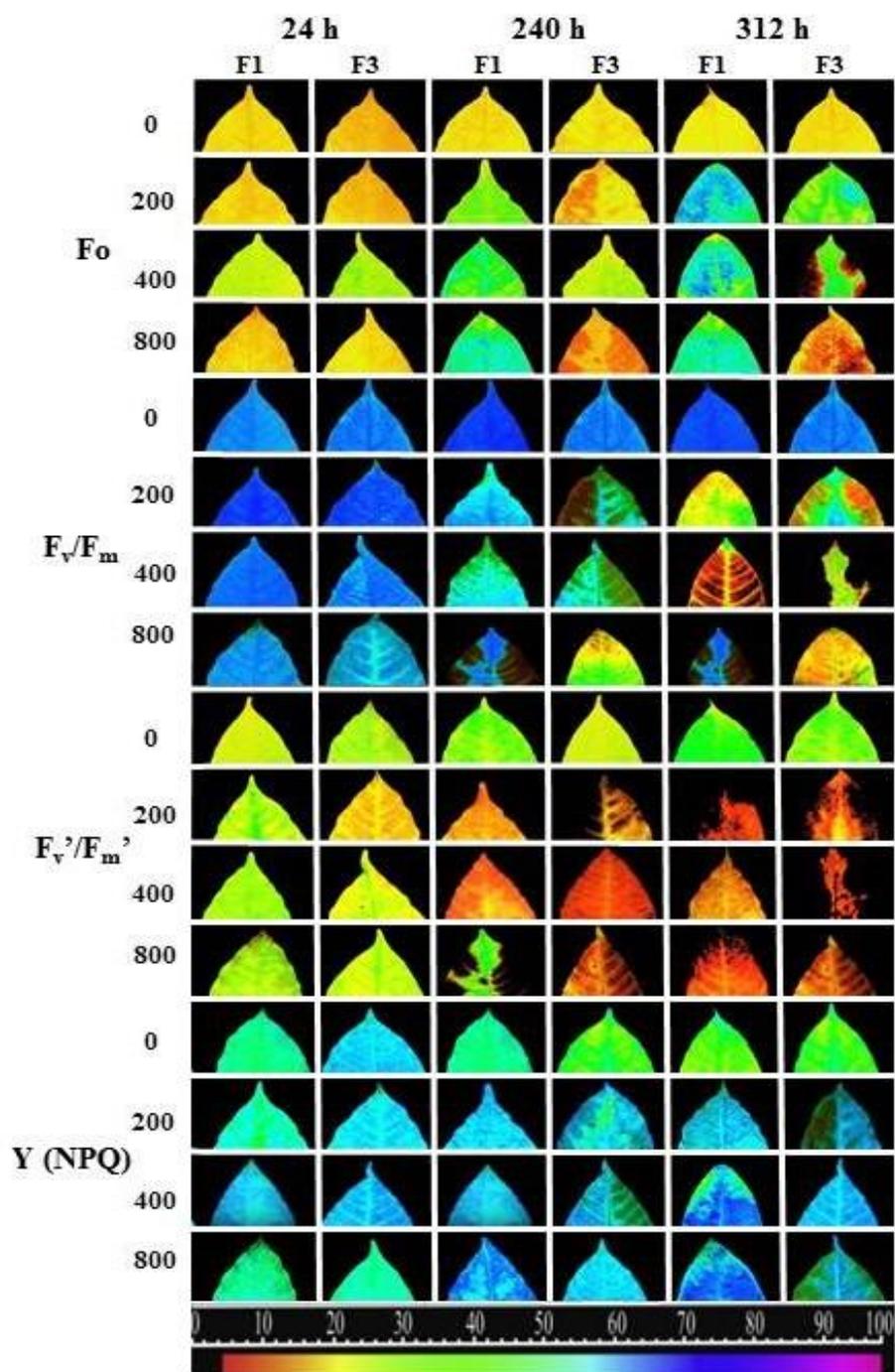


Figura 4. Imagens da fluorescência inicial da clorofila a (F_0), rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_v'/F_m') e coeficiente de extinção não fotoquímica ($Y-NPQ$) nas folhas localizadas no ápice (F1) e no terço médio (F3) das plantas de *Pouteria torta* tratadas com as doses de 0, 200, 400 e 800 g e. a. ha^{-1} do glyphosate às 24, 240 e 312 horas após aplicação do herbicida (HAA). A escala de cor, abaixo das imagens, corresponde aos valores de 0 (preto) a 100 (rosa).

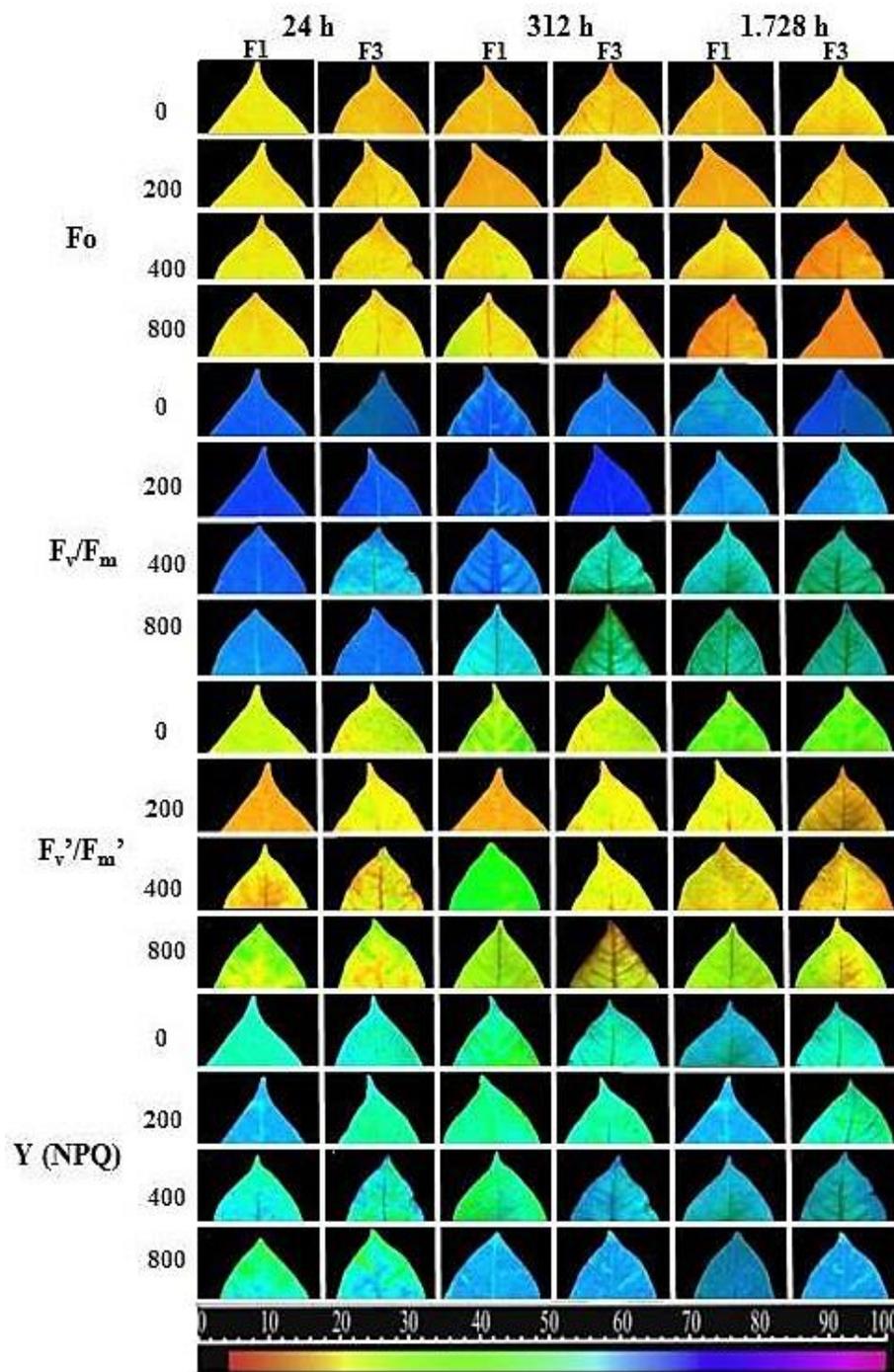


Figura 5. Imagens de fluorescência inicial da clorofila a (F_0), rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_v'/F_m') e coeficiente de extinção não fotoquímica (Y -NPQ) nas folhas localizadas no ápice (F1) e no terço médio (F3) das plantas de em *Alibertia edulis* tratadas com as doses de 0, 200, 400 e 800 g e. a. ha⁻¹ do glyphosate às 24, 312 e 1.728 horas após aplicação do herbicida (HAA). A escala de cor, abaixo das imagens, corresponde aos valores de 0 (preto) a 100 (rosa).

3.4. Concentração de pigmentos cloroplastídicos

A concentração de pigmentos cloroplastídicos foi afetada pelo glyphosate apenas em *P. torta*. Nessa espécie, a concentração de clorofila *a* diminuiu em resposta ao incremento das doses do glyphosate (Figura 6 A). Houve diminuição nas concentrações de clorofila *b* e clorofilas *totais* em *P. torta* submetidas a doses crescentes do herbicida às 312 HAA, porém, sem resposta às 24 HAA (Figura 6 E - C). Em contraste, nessa espécie a concentração de carotenoides aumentou com o incremento da dose do glyphosate às 312 HAA (Figura 6 G). Em *A. edulis* a concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas *totais* não alterou com as doses e HAA (Figura 6 B, D - F). Entretanto, observa-se nessa espécie aumento na concentração de carotenoides com incremento das doses do herbicida (Figura 6 H).

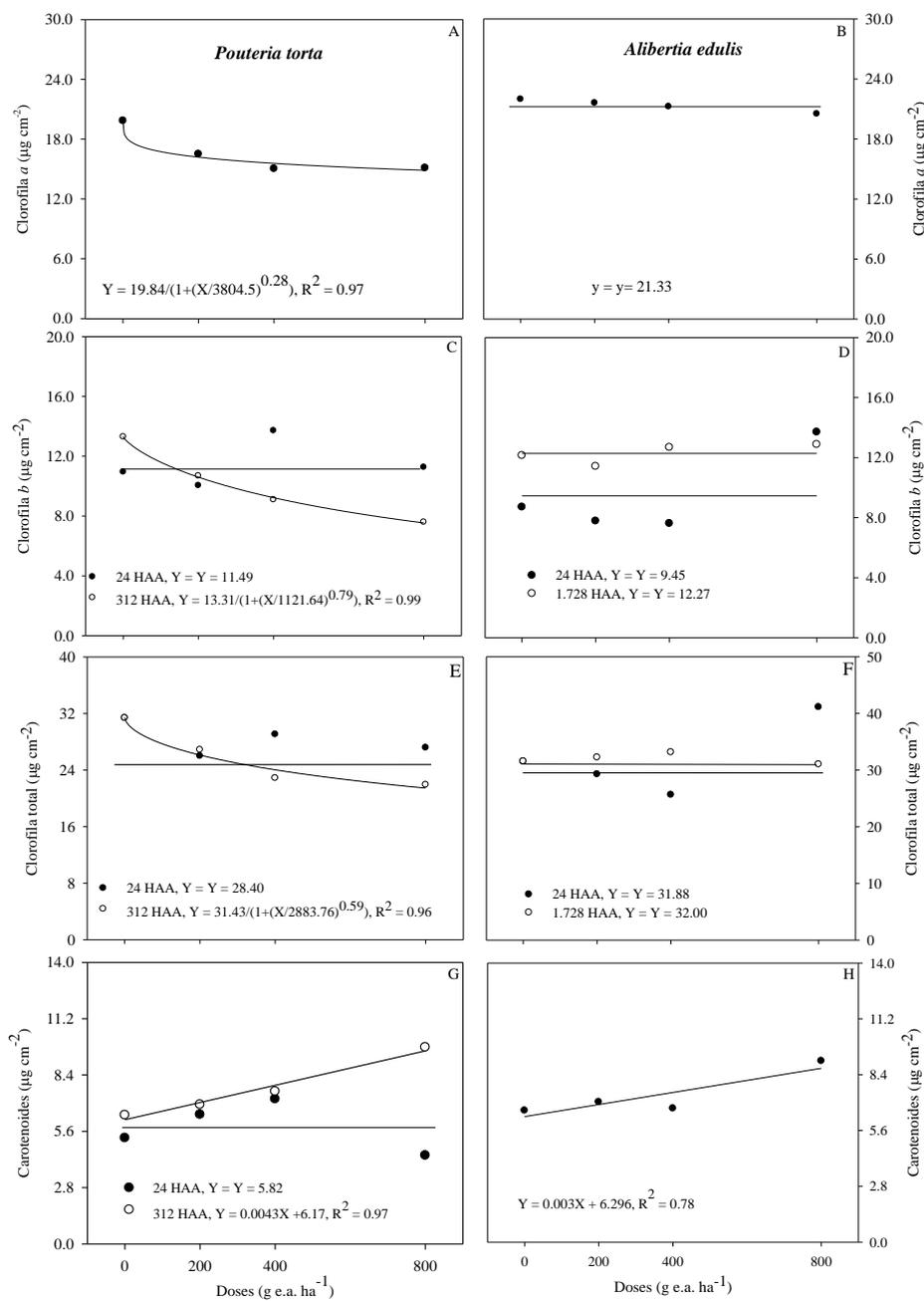


Figura 6. Concentrações de clorofila *a* [A e B], clorofila *b* [C e D], clorofila total [E e F] e carotenoides [G e H] nas plantas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* em respostas às doses crescentes do glyphosate (A, B e H) e da interação entre as doses crescentes do glyphosate com as horas após aplicação do herbicida (HAA) (C, D, E, F e G). Os dados são médias de $n = 8$ (A, B e H), $n = 4$ (C, D, E, F, e G).

3. 5. Microscopia eletrônica de varredura

Corroborando os dados fisiológicos o glyphosate desencadeou, de modo geral, maiores alterações morfoanatômicas em *P. torta* quando comparada à *A. edulis* (Figura 7). Em *P. torta* o glyphosate promoveu a erosão da cera epicuticular a partir da dose de 200 g. e.a. h⁻¹, e a intensidade do dano, ocorreu proporcionalmente de acordo com incremento das doses, tanto nas folhas do ápice (F1), quanto nas folhas do terço médio (F3) (Figura 7). Em *A. edulis*, após a aplicação do glyphosate não foram observadas alterações nas superfícies epidérmicas, como erosão e/ou degradação das ceras epicuticulares, com o incremento das doses de glyphosate, em ambas as folhas avaliadas (Figura 7).

P. torta possui na superfície foliar adaxial depósitos de ceras epicuticulares em forma de placa e ausência de tricomas (Figura 8 A). As folhas são hipoestomáticas, os estômatos ocorrem aleatoriamente e isolados com padrão anomocítico (Figura 8 B). Nessa espécie, o glyphosate provocou a plasmólise das células subsidiárias e desornamentação das ceras epicuticulares nas folhas do ápice (F1), quando expostas a dose de 800 g e.a h⁻¹ (Figura 8 D). Além de promover o estriamento das células subsidiárias em folhas localizadas no terço médio (F3) quando submetidas a doses superiores a 400 g. e.a h⁻¹ (Figuras 8 E e F).

Observou-se na superfície abaxial das folhas de *A. edulis*, a presença de tricomas tectores simples e estômatos do tipo paracítico (Figura 9 B). As folhas são hipoestomáticas. Destaca-se que nessa espécie não houve danos e modificações na morfologia das células estomáticas (face abaxial) e na superfície epidérmica das células (face adaxial) com o tratamento de glyphosate (Figuras 9 A, B, C e D, respectivamente).

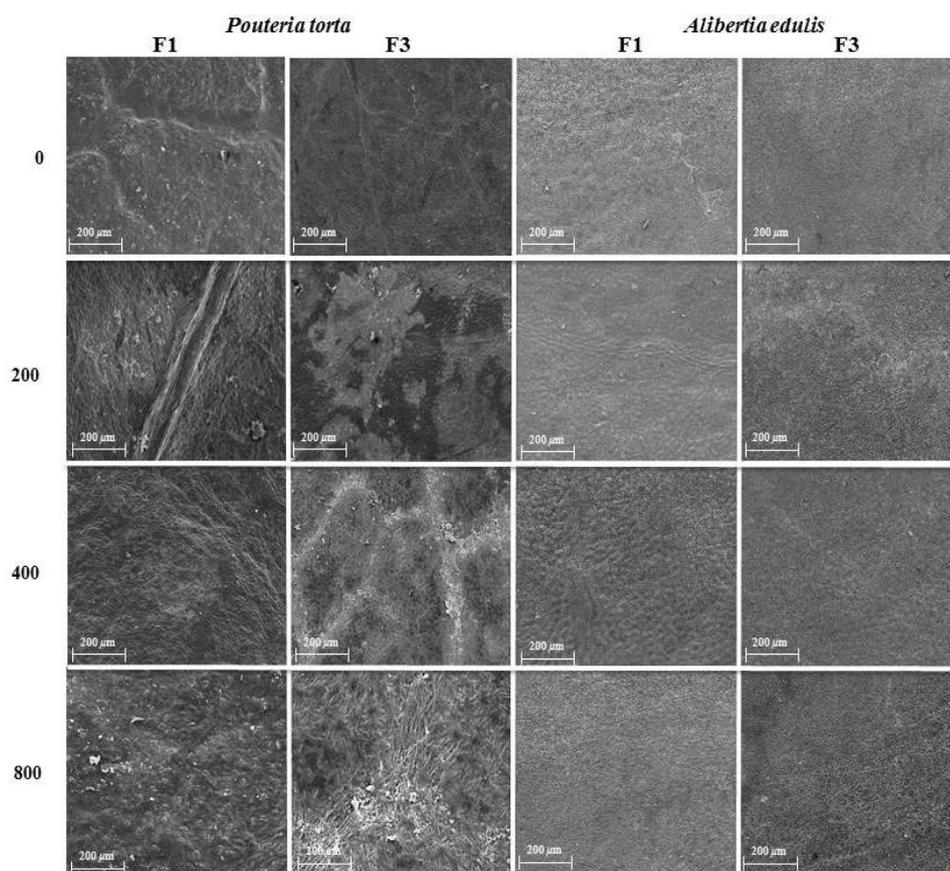


Figura 7. Eletromicrografias das superfícies foliares de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis*. Visão geral da superfície adaxial de folhas localizadas no ápice (F1) e no terço médio (F3) de plantas submetidas às doses de 0, 200, 400 e 800 g. e.a h⁻¹ de glyphosate.

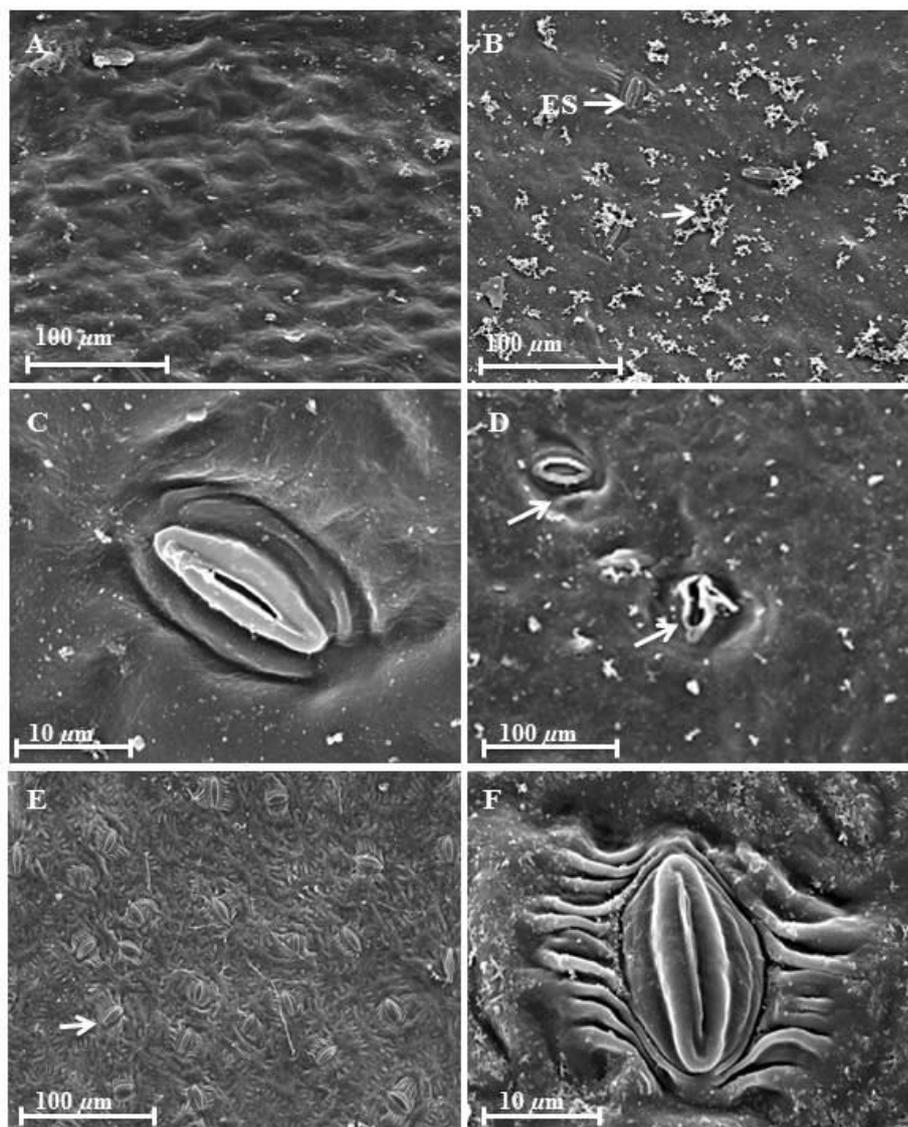


Figura 8. Eletromicrografias da superfície foliar de *Pouteria torta*. Folhas apicais (F1) (A – D); Folhas do terço médio (F3) (E – F). Visão geral da superfície adaxial (A); detalhes das ceras epicuticulares da superfície abaxial (seta) e presença de estômatos (ES) (B); estômato sadio do controle (C); estômatos danificados submetidas a dose de 800 g e.a h⁻¹ de glyphosate (D); visão geral do dano aos estômatos (seta), estriamento das células subsidiárias e a superfície epidérmica de folhas submetidas a dose de 400 g e.a h⁻¹ de glyphosate (E). Detalhe em maior aumento do dano no complexo estomático (F).

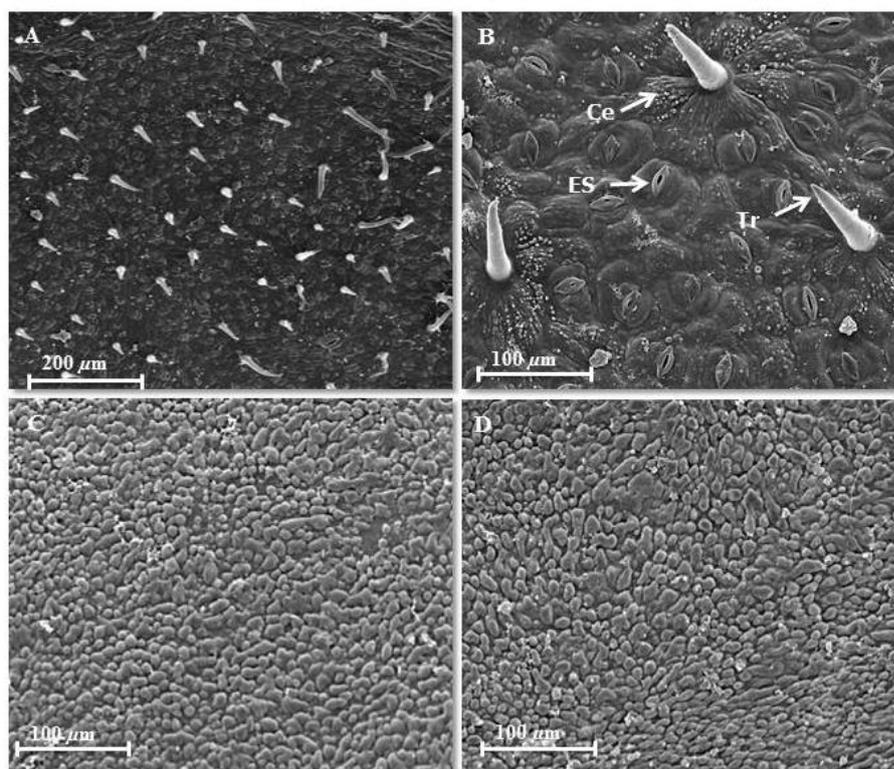


Figura 9. Eletromicrografias da superfície foliar de *Alibertia edulis*. Superfície abaxial com presença de tricomas e estômatos (A); detalhe dos estômatos (ES), tricomas (TR) e presença de ceras (Ce) nas folhas apicais (F1) não tratadas com glyphosate (B); visão geral da superfície adaxial de folhas do ápice (F1) não tratadas com glyphosate (C); visão geral da superfície adaxial de folhas do ápice (F1) submetidas a dose de 800 g e.a h⁻¹ de glyphosate (D).

3.6. Sintomas visíveis

P. torta apresentou clorose e necrose no tecido foliar, de forma mais expressiva nas folhas apicais (F1), a partir da dose de 200 g e.a h⁻¹, os sintomas progrediram com incremento das doses (Figura 10 A). *A. edulis* não apresentou sintomas de fitotoxidez independente das doses de glyphosate e folhas avaliadas (Figura 10 B).

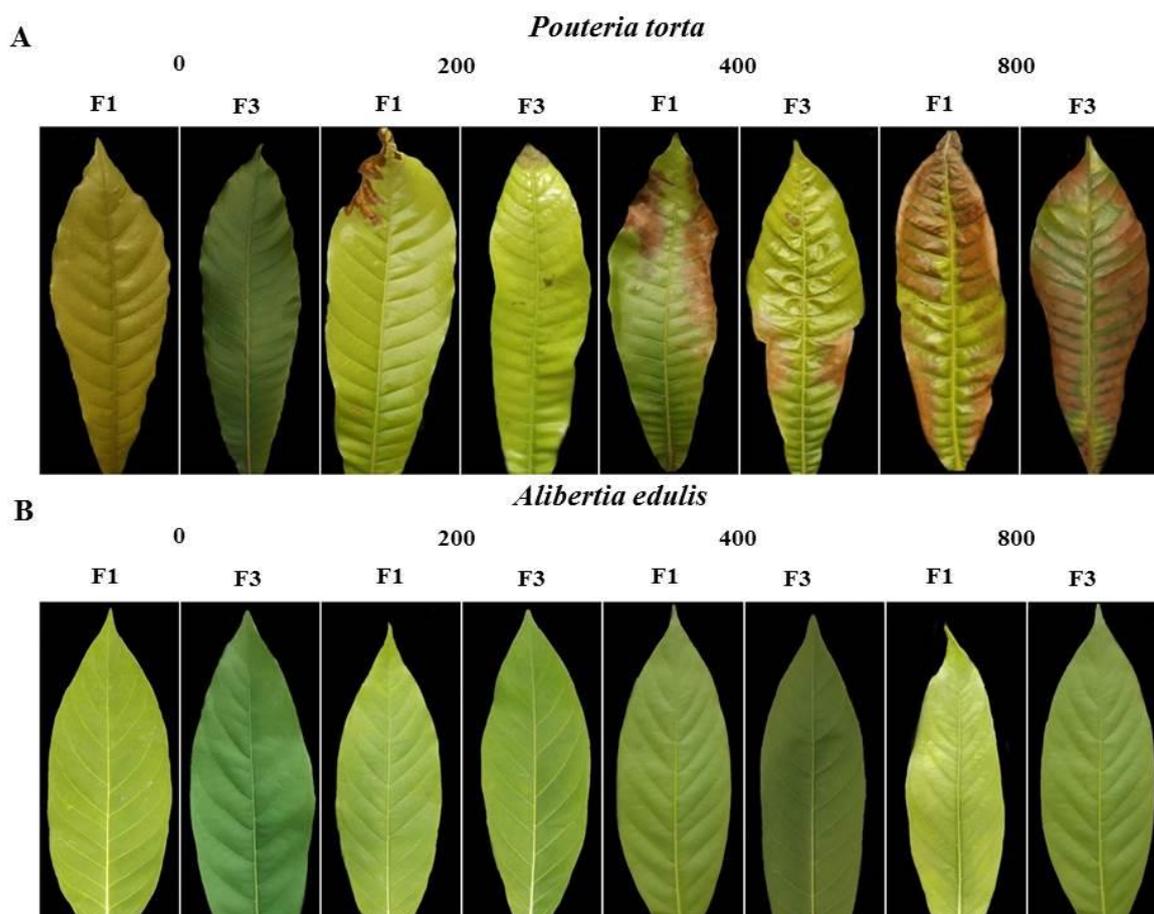


Figura 10. Sintomas visíveis em folhas localizadas no ápice (F1) e terço médio (F3) [A] de *Pouteria torta* submetidas a doses crescentes do glyphosate (0, 200, 400 e 800 g a. e ha⁻¹) às 312 horas após a aplicação do herbicida. Ausência de sintomas visíveis em folhas F1 e F3 [B] de *Alibertia edulis* submetidas a doses crescentes do glyphosate (0, 200, 400 e 800 g a. e ha⁻¹) às 1.728 horas após aplicação do herbicida.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, o glyphosate desencadeou erosão da cera na superfície foliar com consequente alteração na distribuição das ceras epicuticulares de *P. torta*, favorecendo, possivelmente, o maior contato e absorção desse herbicida. Isso pôde ter contribuído substancialmente para a ocorrência dos danos severos na performance fotossintética observados em *P. torta*. O glyphosate depois de aplicado é rapidamente absorvido através da cutícula (Kirkwood et al, 2000; Yamada e Castro 2007) e sua penetração é fortemente influenciada pelas características das ceras epicuticulares (De la Cruz et al, 2016), dentre outros fatores. Em contraste, a inalteração na superfície foliar observada em *A. edulis* traz evidências de que a tolerância ao glyphosate, nessa espécie, está relacionada, ao menos em parte, à robustez da sua cutícula. Essa evidência está de acordo com a informação reportada por Yilmaz e Dane (2012), os quais observaram que a cera epicuticular é considerada uma barreira eficaz contra a absorção de herbicidas solúveis em água, como o glyphosate. Assim, em casos em que herbicidas promovem a remoção da cera, por erosão, aumenta consideravelmente a possibilidade de absorção de herbicidas (Alves et al, 2014) e, conseqüentemente, ocorrência de danos celulares. Isso provavelmente ocorreu em *P. torta*. Resultados semelhantes aos observados nessa espécie foram reportados por outros autores (Rojano-delgado, 2012; Yilmaz e Dane, 2012).

A absorção do glyphosate está diretamente relacionada à fitotoxicidade foliar em plantas sensíveis (Schrübbbers et al, 2014). Os sintomas de clorose e necrose foliar observados em *P. torta* estão intimamente relacionados com a ocorrência de degradação clorofilas pelo glyphosate, seja de forma direta ou indireta. Essa degradação desencadeou a ocorrência de dano fotooxidativo e, conseqüente, comprometimento na performance fotossintética de *P. torta*. De maneira similar, Radwan et al, (2016) e

Gomes et al, (2016) relataram recentemente que o glyphosate promove estresse oxidativo, que culmina na diminuição do teor de clorofilas e nas trocas gasosas em *Arachis hypogaea* L. A fitotoxicidade (Schrübbers et al, 2014) e a diminuição na concentração de clorofilas são sintomas amplamente reportados em plantas tratadas com glyphosate (Huang et al, 2012; Radwan, 2016). O efeito do glyphosate sobre as clorofilas pode estar relacionado tanto com a sua degradação quanto a inibição de sua síntese (Zobiolo et al, 2011). Há evidências de que a inibição na biossíntese de clorofilas pelo glyphosate ocorre via redução da formação do ácido δ -aminolevulínico, que é precursor de porfirinas (Kielak et al, 2011; Radwan, 2016). E, considerando que a diminuição no teor de clorofilas está intimamente relacionada com os sintomas de fitotoxicidade e com o decréscimo na fotossíntese (Zobiolo et al, 2010; Zobiolo et al, 2011), a diminuição na concentração de clorofilas em *P. torta* é bom biomarcador de danos causados pelo glyphosate.

Embora o processo fotossintético não seja alvo principal da ação do glyphosate (Munoz-Rueda et al, 1986), estudos tem relatado o efeito negativo deste herbicida nas trocas gasosas (Yannicaria et al, 2012) e na eficiência fotoquímica do FSII (Gomes et al, 2016). Neste estudo, o glyphosate desencadeou limitações na fotossíntese tanto estomáticas quanto bioquímicas em *P. torta*, evidenciadas pelos incrementos na resistência estomática e na C_i/C_a , respetivamente. A menor g_s em *P. torta* desencadeada pelo glyphosate se deu via indução de plasmólise das células subsidiárias dos estômatos. O aumento na C_i/C_a em *P. torta* tratadas com glyphosate evidencia que houve comprometimento na fixação de carbono no ciclo de Calvin mediante, possivelmente, à diminuição da regeneração da RuBP, segundo reportado por Olesen e Cedergreen (2010) e Yannicaria et al, (2012). Existem evidências de que a inibição da EPSPs pelo glyphosate e, conseqüentemente, o acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos, desregula o fluxo de carbono no ciclo de Calvin (Orcaraya et al, 2012; Gomes et al, 2014). Em adição, o comprometimento nas trocas gasosas pelo glyphosate pode estar diretamente relacionado com a redução na atividade da Rubisco por esse herbicida (Yannicaria et al, 2012, Mateos-Naranjo, 2013).

Diferente ao observado em *P. torta*, as alterações no processo fotossintético em *A. edulis* estão associadas apenas a limitações estomáticas, uma vez que não houve alteração na C_i/C_a . Nesse caso, a indução parcial do fechamento estomático em *A. edulis* resultou na diminuição na g_s e na E . Yannicaria et al (2012) sugeriram que a g_s é um parâmetro sensível para avaliar a sensibilidade e a resistência de plantas ao

glyphosate, antes da ocorrência de sintomas visíveis de fitotoxicidade. Os resultados observados em *P. torta* e *A. edulis* reforçam a hipótese de que a *gs* seja um biomarcador sensível aos efeitos do glyphosate. Corroborando com os dados deste estudo, a *gs* foi bastante responsiva ao glyphosate em *Hordeum vulgare* (Olesen e Cedergreen, 2010) e biótipos de *Lolium perenne* (Yannicari et al, 2012).

A diminuição na *A* em *P. torta* está diretamente associada ao impacto do glyphosate sobre a integridade do aparato fotoquímico, por causa da diminuição no rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII; Fv/Fm). Neste estudo, a Fv/Fm foi mais comprometida em *P. torta* em relação à *A. edulis*, indicando que essa variável seja bom biomarcador de sensibilidade ao glyphosate. A intensa redução na Fv/Fm em *P. torta*, tratada com glyphosate, indica a ocorrência de fotoinibição nessa espécie. A fotoinibição ocorre quando há excesso de energia não utilizada, via redução na performance fotossintética (Maxwell e Johnson 2000; Mateos-Naranjo, 2013). A intensidade da fotoinibição está associada ao equilíbrio entre o fotodano e a capacidade de reparação (Takahashi e Badger, 2010). Neste estudo, o aumento na dissipação de calor via ativação do ciclo das xantofilas em *P. torta* tratada com glyphosate, evidenciado pelo aumento dos carotenoides e no coeficiente de extinção não fotoquímica Y(NPQ), não foram suficientes para conter os efeitos negativos desencadeados pelo glyphosate ao FSII. E, considerando que o aumento no NPQ seja um mecanismo de proteção do aparato fotossintético contra os efeitos deletérios do excesso de energia (Jiang et al, 2006; Guirao et al, 2013), conclui-se que esse mecanismo de fotoproteção foi eficiente apenas em *A. edulis*.

Concomitantemente ao incremento no Y(NPQ), neste estudo observa-se aumento na F_0 em ambas as espécies. Esse resultado traz as primeiras evidências que a sensibilidade ao glyphosate em plantas do Cerrado está relacionada a maior ativação dos processos de dissipação de energia via fluorescência e calor, uma vez que esses processos foram mais exacerbados em *P. torta* em relação à *A. edulis*. Dessa forma, F_0 e Y(NPQ) apresentam potencial para serem empregados como biomarcadores dos efeitos do glyphosate em plantas sensíveis.

5. CONCLUSÕES

1. A extensão do dano na superfície epicuticular, os efeitos deletérios nos estômatos e a diminuição na concentração de clorofilas em *P. torta* são potenciais biomarcadores da sensibilidade ao glyphosate;

2. Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, F_0 e $Y(NPQ)$ são potenciais biomarcadores da ação do glyphosate em *P. torta* e *A. edulis*, ao passo que a F_v/F_m é bom biomarcador dos efeitos tóxicos do glyphosate apenas em *P. torta*;

3. As respostas obtidas pelas trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e na concentração de pigmentos cloroplásticos evidenciaram a ocorrência de danos fotoinibitórios e a ativação de mecanismo de fotoproteção através do aumento de F_0 e $Y(NPQ)$;

4. Os sintomas de visíveis de fitotoxicidade em *P. torta* estão relacionados com os danos fotossintéticos e morfoanatômicos. Assim, *P. torta* é uma espécie bioindicadora, podendo ser usada como referencial dos efeitos deletérios do glyphosate em ecossistema de Cerrado.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dr^a. Marisa Domingos (Instituto de Botânica de São Paulo), pela contribuição para o desenvolvimento deste projeto. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Projeto Sisbiota Brasil, ao Fundo de Financiamento de Estudos de Projetos e Programas, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e ao Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, S. P., Proença, C. E. B., Sano, S. M., Ribeiro, J. F., 1998. Cerrado: Espécies vegetais úteis. Embrapa, Brasília.
- Alves, R. M., Inacio, E. M., Monquero, P. A., Meneghin, S. P., & Hirata, A., 2014. Leaf-surface characterization and the effects of the herbicide saflufenacil on the leaves of weeds. *Brazilian Journal of Agricultural Sciences/Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 9(4).
- Araújo, J.C, Téran, F.C, Oliveira, R.A, Nour, E. A. A, Montenegro, M. A. P., Campos, J. R., Vazoller, R. F., 2003. Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. *Journal of Electron Microscopy* v. 52, p. 429–433.
- Batlle-Bayer, L., Batjes, N. H., Prem S., 2010. Bindraban Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 137, p. 47-58.
- Benham, S.E., Broadmeadow, M.S.J., Schaub, M., Calatayud, V., Bussotti, F., 2010. Using commercial tree nurseries to monitor visible ozone injury e an evaluation. *Forest Ecology and Management*. v. 260, p. 1824 -1831.
- Belo, A. F., Pires, F. R., Bonomo, R., Filho, A. C., Tennis, L. H. O., 2016. Sulfentrazone phytoremediation under field conditions. *Revista Caatinga, Mossoró*, v. 29, n. 1, p. 119 – 126.
- Boutin, C., Jobin, B., 1998. Intensity of agricultural practices and effects on adjacent habitats. *Ecol. Appl.*, 8 (2), pp. 544–557.
- Boutin, C., Strandberg, B D., S.K.D., Mathiassen, P.J. T., 2014. Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications?, *Environ. Pollut.* 185, 295-306.
- De la Cruz, R. A., Barro, F., Domínguez-Valenzuela, J. A., & De Prado, R. (2016). Physiological, morphological and biochemical studies of glyphosate tolerance in *Mexican Cologania* (*Cologania broussonetii* (Balb.) DC.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 98, 72-80.
- De Temmerman, L., Bell, J.N.B.J., Garrec, P., Klumpp, A., Krause, G.H.M., Tonneijck, A.E.G., 2004. Biomonitoring of air pollution with plants e considerations for the future. 2004. In: A. Klumpp, W. Ansel, G. Klumpp (Eds.), *Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness*, Cuvillier Verlag, Gottingen, pp. 337-373.

- Dewez, D., Didur, O., Vincent-Héroux, J., & Popovic, R. 2008. Validation of photosynthetic-fluorescence parameters as biomarkers for isoproturon toxic effect on alga *Scenedesmus obliquus*. *Environmental pollution*, 151(1), 93-100.
- Duke, S.O. & Powles, S.B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64, 319–325.
- Egan, J. F., Bohnenblust, E., Goslee, s. Mortenssen, D., Tooker, J., 2014. Herbicide drift can affect plant and communities. *Agricu. Ecosyst. Environ.* 185, 77-87.
- Franco, A. C., Rossatto, D. R., Silva, L. C. R., Ferreira, C. S., 2014. Cerrado vegetation and global change: The role of functional types, resource availability and disturbance in regulating plant community responses to rising CO₂ levels and climate warming. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 26, 19-38.
- Fränzle, O. Bioindicators and environmental stress assessment., 2003. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, v.6, p.41- 84.
- Freemark, K., & Boutin, C., 1995. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: a review with special reference to North America. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 52 (2), 67-91.
- Gomes, M. P., Juneau, P., 2016. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide?. *Environmental Pollution*. V. 218, p. 402-409.
- Gomes, M. P; Manac’h, S. G. le; 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*. V. 130, P. 65-70.
- Huang, J., Silva, E.N., Shen, Z., Lu, H. 2012. Effects of glyphosate on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and physicochemical properties of cogongrass (*Imperata cylindrical* L.) *Plant Omics*, 5(2), p.177-183.
- Karnovsky, M.J, 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 27: 137-138.
- Kirkwood, R. C., Hetherington, R., Reynolds, T. L., Marshall, G., 2000. Absorption, localisation, translocation and activity of glyphosate in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L) Beauv): influence of herbicide and surfactant concentration. *Pest management science*, 56(4), 359-367.
- Klink, C. A., Machado, R. B. (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1(1), 147-155.
- Klumpp, A., Klumpp, G., & Domingos, M., 1994. Plants as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution*, 85(1), 109-116.
- Kumar, K. S., Dahms, H. U., Lee, J. S., Kim, H. C., Lee, W. C., & Shin, K. H., 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 51-71.
- Lam, P. K, Gray, J. S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar Pollut Bull.* 46 (2):182-6.
- Larcher, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RIMA, 2006. 531p.
- Lucotte, M., Juneau, P., 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid (AMPA), an overview. *Journal of Experimental Botany*. 65, 4691–4703.
- Mateos-Naranjo, E., & Perez-Martin, A. 2013. Effects of sub-lethal glyphosate concentrations on growth and photosynthetic performance of non-target species *Bolboschoenus maritimus*. *Chemosphere*, 93(10), 2631-2638.

- Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51(345):659-68.
- Myers, N. R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca G. A. B., Kent J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- Olesen, C.F.; Cedergreen, N. Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Pest Management Science*, v.66, p. 536-542, 2010.
- Perfeito, J. P.; Santos, M. L.; López, K. S. E.; Paula, J. E.; Silveira, D., 2005. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, p.183-186, 2005.
- Radwan, D.E.M., Fayez, K.A., 2016. Photosynthesis, antioxidant status and gas-exchange are altered by glyphosate application in peanut leaves. *Photosynthetica* v. 54.
- Ratter, J. A., Ribeiro, J. F., Bridgewater, S., 1997. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann. Bot.* 80, 223–230.
- Rojano-Delgado, A. M., Cruz-Hipolito, H., De Prado, R., De Castro, M. D. L., Franco, A. R., 2012. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. utilis plants. *Phytochemistry*, 73 (1), 34- 41.
- Schrübbers, L. C., Valverde, B. E., Sørensen, J.C., Cedergreen, N., 2014. Glyphosate spray drift in *Coffea arabica* – Sensitivity of coffee plants and possible use of shikimic acid as a biomarker for glyphosate exposure. *Pestic. Biochem. Physiol.* 115, 15-22.
- Silva, F., Costa, A., Pereira Alves, R., Megguer, C., 2014. Chlorophyll Fluorescence as an Indicator of Cellular Damage by Glyphosate Herbicide in *Raphanus sativus* L. Plants. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 2509-2519.
- Walker, C. H., 1998. Biomarker Strategies to Evaluate the Environmental Effects of Chemicals. *Environmental Health Perspectives* vol 106.
- Walker, C.H.; Hopkin, S.P.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis. Londres, 321p., 1996.
- Wellburn, A. R., 1997. 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* n.144, p.307-313.
- Yamada, T.; Castro, P.R.C.E., 2007. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. *International Plant Nutrition Institute* . Piracicaba: *Informações Agronômicas*, 24p. (Boletim Técnico 119).
- Yannicaria, M.; Istilart, C.; Giménez, D. O.; Castro, A. M., 2012. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. *Crop Protection*. v.32, p. 12-16.
- Yilmaz, G., & Dane, F., 2012. Phytotoxicity Induced by Herbicide and Surfactant on stomata and epicuticular wax of Wheat. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(6), 7757-7765.
- Zobiolo, L. H. S., de Oliveira, R. S., Kremer, R. J., Constantin, J., Bonato, C. M., & Muniz, A. S., 2010. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(3), 182-193.
- Zobiolo, L. H. S., Kremer, R. J., de Oliveira, Jr. R. S., Constantin, J., 2012. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175, 319–330.
- Zobiolo, L. H., Kremer, R. J., Oliveira, R. S., 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.

Zulet, A., Gil-Monreal, Villamor, J. G., Zabalza, A., Renier A. L., Hoorn., 2013. Proteolytic Pathways Induced by Herbicides That Inhibit Amino Acid Biosynthesis. *Plos One*, v. 8.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM DUAS ESPÉCIES NATIVAS DO CERRADO COMO BIOMARCADORES DA AÇÃO DO GLYPHOSATE

(Normas de acordo com a revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*)

RESUMO

Embora o Cerrado seja um ecossistema de savana que se destaca pela alta diversidade em fauna e flora, com cerca de 2 milhões de km² de extensão original, atualmente mais de 50% do Cerrado foi convertido em áreas agriculturáveis e pastagens. Nesse ecossistema desenvolve-se expressiva produção de grãos concomitantes com o aumento do uso de pesticidas, que tem intensificado a perda da biodiversidade desse bioma. Dentre os herbicidas, glyphosate se destaca em relação aos demais, pois é utilizado em grande intensidade e frequência em escala global. Objetivou-se neste estudo avaliar e caracterizar possíveis alterações no metabolismo bioquímico de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* tratadas com glyphosate e, assim, definir biomarcadores da ação desse herbicida, além de definir o potencial bioindicador das duas espécies nativas do Cerrado. Foram conduzidos experimentos independentes para *P. torta* e *A. edulis*, em que os tratamentos consistiram da aplicação do glyphosate nas doses de 0 (controle), 200, 400 e 800 g e. a. ha⁻¹. Foram avaliadas as atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidases, polifenol oxidase e 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, bem como as concentrações de ácido chiquímico, compostos fenólicos, aminoácidos e proteínas solúveis totais e de malondialdeído em ambas as espécies. Os resultados revelaram que a sensibilidade diferiu entre as duas espécies estudadas, sendo *P. torta* mais responsiva aos efeitos tóxicos do glyphosate. *P. torta* apresentou um conjunto de biomarcadores bioquímicos sensíveis ao glyphosate, além dos sintomas visíveis de fitotoxicidade, sendo, portanto indicada como bioindicadora da ação desse herbicida em vegetação nativa dos Cerrados. Embora *A. edulis* tenha apresentado pouca sensibilidade ao glyphosate, não apresentando sintomas de fitotoxicidade, nessa espécie também foram identificados

biomarcadores responsivos a esse herbicida, que permitem classificar a mesma como potencial biosensora da ação do glyphosate.

PALAVRAS-CHAVE: bioindicadores, biomacardores, chiquimato, agricultura. fitotoxicidade.

ABSTRACT

Although Cerrado is a savannah ecosystem that has a high diversity of flora and fauna and originally covered 2 million km², over 50% of Brazilian Cerrado has been converted into agricultural areas and pastures. In this ecosystem, intense grain production has been accompanied by an increase in chemical pesticide use especially herbicides. This has intensified the loss of its biodiversity. Glyphosate is the most common herbicide. Here, we assessed the possible biochemical changes in *Pouteria torta* and *Alibertia edulis* plants—both native Cerrado species that were challenged with glyphosate in two independent experiments. In addition, we examined whether those metabolic changes can be used as biomarkers to determine the potential of these species as phytoindicators of glyphosate action on the remnant Cerrado vegetation. In both experiments, glyphosate was used at 0, 200, 400, and 800 g a.e. ha⁻¹. The activities of the enzymes phenylalanine ammonia lyase, peroxidase, polyphenol oxidase, and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, as well as the concentrations of shikimic acid, phenolic compounds, amino acids, proteins, and malondialdehyde were evaluated. Glyphosate treatment impaired the activities of the enzymes and the concentration of metabolites particularly in the *P. torta* plants. This species exhibited a set of biochemical markers that were sensitive to glyphosate and had visual symptoms of phytotoxicity. Therefore, *P. torta* has characteristics that classify it as a phytoindicator of the action of glyphosate. *A. edulis* showed little sensitivity to glyphosate and no symptoms of phytotoxicity, but did have biochemical biomarkers of this herbicide. Thus, *A. edulis* plants may be used as a glyphosate biosensor.

KEY WORDS: bioindicators, biomarkers, shikimate, agriculture, phytotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

A intensa atividade antropogênica, apontada como uma das principais causas da perda da biodiversidade (Domingos et al, 2015), expõe os ecossistemas terrestres a diferentes classes de compostos xenobióticos. Na região do Cerrado, por exemplo, a expressiva produção de grãos vem sendo acompanhada pelo aumento do uso indiscriminado de pesticidas. Isso tem contribuído, em grande parte, para perdas de mais de 50% do montante de 2 milhões de km² da extensão original do Cerrado Brasileiro, o que o transformou em uma paisagem de vegetação nativa fragmentada (Franco et al, 2014). Ressalta-se que o Cerrado é um ecossistema de savana, considerado um dos principais centros de biodiversidade do planeta, pois apresenta alta diversidade florística e grande concentração de espécies endêmicas (Myers et al, 2000; Solórzano et al, 2012). E, dentre as várias classes de pesticidas utilizadas na região do Cerrado, o herbicida glyphosate (N-fosfometil-glicina) se destaca em relação aos demais, pois é utilizado em grande intensidade e frequência (Piola et al, 2013).

O glyphosate, por ser não seletivo, causa disfunção em processos celulares vitais de diversas espécies vegetais. Esse herbicida inibe diretamente a atividade da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, E.C. 2.5.1.19), através de mecanismo competitivo, em que a molécula do glyphosate compete com o fosfoenolpiruvato pelo sítio ativo da enzima (Schönbrunn et al, 2001; Mobin et al, 2015). Essa competição desencadeia o bloqueio da via do chiquimato e, conseqüentemente, acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos e redução na síntese de aminoácidos aromáticos, essenciais para a síntese de proteínas e de diversos compostos secundários, incluindo compostos fenólicos (Piola et al, 2013; Mobin et al, 2015).

Em áreas agrícolas o glyphosate é pulverizado diretamente nas folhagens das plantas, no entanto, uma porção do produto químico pode alcançar a vegetação adjacente, levando plantas não alvo à exposição (Gomes et al, 2014). A dispersão das

gotas pode ocorrer por meio de deriva e evaporação, podendo provocar a perda da biodiversidade no entorno dos plantios agrícolas (Alves et al, 2000, Boutin et al, 2014; Egan et al, 2014). Dessa forma, torna-se necessário monitorar os efeitos potenciais da aplicação do glyphosate nas áreas agrícolas sobre a vegetação remanescente do Cerrado. Dentre os métodos de monitoramento empregados para mensurar o impacto de xenobióticos sobre o ambiente, destaca-se o uso de plantas bioindicadoras (Furlan, 2008). As plantas bioindicadoras, de modo geral, são capazes de reagir de forma previsível e quantificável a contaminantes por ativar cascatas de sinalização específicas. A manifestação dos efeitos tóxicos de um determinado xenobiótico ocorre inicialmente a nível molecular, bioquímico ou fisiológico (biomarcadores) (Huggett et al, 1992; Lagadic et al, 1994; Burger, 2006). Em situações em que a acumulação do componente tóxico for suficiente em magnitude ou duração para sobrecarregar o organismo, efeitos deletérios como sintomas de fitotoxicidade podem ser observados em organismos sensíveis, (Bartell, 2006) denominados de bioindicadores. Adicionalmente, os biomarcadores podem auxiliar na avaliação do estado de saúde dos organismos expostos a pesticidas mesmo na ausência de sintomas aparentes, e possibilita mensurações dos efeitos subletais dos xenobióticos (Güngördüa et al, 2016), classificando esses organismos como biosensores. No caso específico do glyphosate, o acúmulo de ácido chiquímico (Schrübbers et al, 2014; Gomes et al, 2016) e do metabólito glioxilato (Rojano-Delgado et al, 2010) têm sido apontados como bons biomarcadores do efeito desse herbicida em plantas de *Coffea arabica*, *Salix miyabeana* e biótipos de *Lolium* spp, respectivamente. Vários autores têm reportado a eficiência da utilização do composto malondialdeído (MDA) como eficiente biomarcador de danos celulares acarretados por diversos xenobióticos (Damiens et al, 2007; Xing et al, 2012; Griboff et al, 2014). A atividade de enzimas do sistema antioxidativo, como a superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, além da concentração de metabólitos e proteínas são alguns dos biomarcadores amplamente empregados no biomonitoramento ambiental (Van der Oost et al, 2003; Lu et al, 2010; Vidal Liñán e Bellas, 2013; Hattab et al, 2016).

Considerando que a utilização de plantas com potencial bioindicador pode contribuir para a identificação precoce do efeito tóxico de herbicidas em remanescente de vegetação nativa do cerrado, o uso das espécies *Alibertia edulis* Rich. e *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, pertencente as famílias Rubiaceae e Sapotaceae, respectivamente, para esse fim pode ser promissor. Isso porque essas espécies possuem fácil propagação,

bom crescimento e baixa exigência nutricional (Lorenzi, 2002), características desejáveis para a seleção de espécies vegetais utilizadas em programas de monitoramento do impacto ambiental (Boutin et al, 2014). Além disso, *A. edulis* e *P. torta*, são espécies nativas amplamente distribuídas no Cerrado (Almeida et al, 1998), fato que aumenta seu potencial para utilização no monitoramento da ação dos herbicidas sobre a vegetação remanescente do Cerrado.

No presente estudo, foi investigada a hipótese de que plantas de *P. torta* e *A. edulis* possuem sensibilidade ao herbicida glyphosate, assim como as plantas nativas. Portanto, objetivou-se neste estudo avaliar e caracterizar possíveis alterações no metabolismo bioquímico de *P. torta* e *A. edulis* tratadas com glyphosate e, assim, definir biomarcadores apropriados e específicos da ação desse herbicida, além de definir o potencial bioindicador das duas espécies nativas do Cerrado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Condições de Crescimento

Os frutos de *Pouteria torta* foram coletados na fazenda Santo Antônio, 16° 26' 29" S, 51° 7' 11" W, Iporá, Goiás, Brasil. Já os frutos de *Alibertia edulis* foram coletados na fazenda Rio Preto, 18° 20' 29" S, 50° 8' 14" W, localizada no município de Rio Verde, Goiás, Brasil. Os frutos foram despulpados em peneira, e as sementes lavadas e secas em local ventilado e sombreado, sendo posteriormente semeadas em areia lavada. Após 60 dias, as mudas foram transferidas para vasos de polietileno contendo 10 kg do substrato, preparado a partir da mistura de solo do tipo Latossolo Vermelho distroférrico e areia (2:1), o qual apresentou as seguintes características químicas: pH em H₂O de 4,7; 2,6 mg/dm⁻³ de P; 14 mg/dm⁻³ de K; 0,75 cmolc/dm⁻³ de Ca; 0,22 cmolc/dm⁻³ de Mg; 3,1 cmolc/dm⁻³ de H+Al; 13,0 g dm⁻³ de matéria orgânica e 24,4% de saturação por bases. Com base nessa análise, a adubação do substrato foi realizada por vaso com adição de 1,52 g de ureia; 6,9 g fósforo; 6,9 g de potássio e 0,4 g de micronutrientes (aplicada por vaso) (Fritted Traced Elements® - São Paulo, Brazil). Plantas das duas espécies com 12 meses de idade, padronizadas quanto ao tamanho e vigor, foram utilizadas para a realização dos experimentos.

2.2. Imposição dos tratamentos

Experimentos independentes para as espécies *P. torta* e *A. edulis* foram conduzidos durante os meses de junho a agosto de 2014. Para ambos os experimentos, os tratamentos consistiram da aplicação do herbicida glyphosate (Roundup Transorb®, sal de isopropilamina com 480 g L⁻¹ do equivalente ácido) nas seguintes doses: 0 (controle), 200, 400 e 800 g e. a. ha⁻¹. As aplicações do herbicida foram realizadas

utilizando pulverizador costal (Herbicat[®] Catanduva, Brasil), munido de barra com quatro pontas de pulverização e bico da série XR Teejet[®] (XR11002-VP), com pressão constante de 3,0 bar, mantida por CO₂ comprimido, e volume de calda de 110,02 L ha⁻¹.

A partir de estudos prévios de curva-dose resposta ao glyphosate, foram testadas diferentes doses de glyphosate [0, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 g e.a. ha⁻¹] combinado com dez tempos de avaliações [24, 48, 72, 96, 144, 264, 312, 1.104, 1.416 e 1.728 horas após aplicação (HAA)] para *P. torta* e *A. edulis*. As doses e horários foram escolhidos a fim de detectar alterações bioquímicas iniciais que podem ser específicas para os efeitos do glyphosate. Esta escolha foi com base nas análises de sintomas visíveis e respostas fisiológicas de ambas as espécies (dados não mostrados).

2.3. Determinação dos sintomas de fitotoxicidade do glyphosate

A fitotoxicidade foliar do herbicida em *P. torta* e *A. edulis* foi avaliada, respectivamente, às 312 horas e 1.728 horas após a aplicação (HAA) mediante observações visuais. Para registro dos sintomas de fitotoxicidade foliar foram realizadas imagens utilizando câmara Fujifilm FinePix (SL300[®], Brasil).

2.4. Análises bioquímicas

Para investigar o efeito do glyphosate no metabolismo de ambas as espécies, determinou-se a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5), polifenol oxidase (PPO, EC 1.10.3.1), peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) e 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, E.C. 2.5.1.19), além de possíveis alterações na síntese de aminoácidos, proteínas, compostos fenólicos e estabilidade das membranas, por meio da análise de malondialdeído (MDA). Essas análises foram realizadas em folhas completamente expandidas, localizadas no terço médio, às 24 e 312 e às 24 e 1.728 HAA em *P. torta* e *A. edulis*, respectivamente. Nesse mesmo período de avaliação, determinou-se a concentração do ácido chiquímico em folhas localizadas tanto no ápice (folhas em desenvolvimento) quando no terço médio (folhas expandidas) das plantas.

A obtenção do extrato foliar para determinação da atividade das enzimas FAL, POX e PPO foi realizada conforme descrito por Nascimento et al, (2014).

A atividade da FAL foi determinada segundo a metodologia proposta por Guo et al, (2007), com algumas modificações. A reação foi iniciada após a adição de 100 µl de extrato foliar a uma mistura de reação contendo tampão borato de sódio 40 mM (pH 8,8) e L - fenilalanina 20 mM em um volume de 1 mL. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 30 °C durante 1 h, e a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de HCl 6 N. A absorbância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi medida a 290 nm . Procedimento similar foi utilizado para as amostras controle, mas a reação foi imediatamente interrompida após a adição do extrato bruto da enzima no meio de reação. O coeficiente de extinção molar de 100 M⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado para calcular a atividade de FAL (Zucker, 1965).

A atividade da POX foi determinada pela adição de 100 µl de extrato foliar a um meio de reação contendo 25 mM de tampão de fosfato de potássio (pH 6,8), 20 mM de pirogalol e 20 mM de peróxido de hidrogênio em um volume de 2 mL (Kar e Mishra, 1976). A reação foi iniciada após a adição de 15 µl de extrato foliar, e a absorbância foi determinada a 420 nm durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção de molar 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) foi utilizado para calcular a atividade da POX. A atividade da PPO foi determinada utilizando o mesmo procedimento para a POX, exceto pela omissão do peróxido de hidrogênio na mistura de reação.

A obtenção do extrato foliar para determinação da atividade da enzima EPSPs foi realizada a partir da maceração de 1 g de tecido foliar em 4 mL de solução-tampão HEPES-NaOH 50 mM (pH 7,0), glicerol 10%, β-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 0,1 mM, heptamolibdato de amônio [(NH₄)₆ Mo₇O₂₄ 4H₂O] 0,01 mM e PVP 5%. O macerado foi centrifugado a 5.000 xg por 30 min. O sobrenadante, dessanilizado em colunas de Sephadex G-25, foi utilizado como fonte de EPSPs. A temperatura foi mantida entre 0 e 4 °C durante todas as etapas do processo de extração. A atividade da EPSPs foi mensurada via a quantificação de fósforo inorgânico liberado durante a transferência do grupo enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o shiquimato-3-fosfato (S3P), conforme descrito por Forlani et al, (1994), com algumas modificações. A reação foi iniciada pela adição de 10 µL do extrato foliar dessanilizado a uma solução-tampão HEPES-NaOH 200 mM (pH 7), shiquimato-3-fosfato 1 mM, PEP 4 mM e (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ 4H₂O 5 mM . Após incubação por 20 minutos, a 28 °C, a reação foi interrompida pela adição de 500 µL da solução colorimétrica de malaquita verde 9,2 mM e (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ 4H₂O 8,5 mM em HCl 1 M, com acréscimo de 2 g L⁻¹ de 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamônio] -1-propanossulf onato (CHAPS) para a estabilização da

coloração. Após exatamente um minuto, adicionou-se 250 μL de citrato de sódio 34% (m/v). Após 15 min de incubação a temperatura ambiente, as amostras foram lidas a 660 nm. Para as amostras controle, um procedimento similar foi realizado exceto pela omissão do S3P.

A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada conforme descrito por Bradford (1976).

Para a determinação do ácido chiquímico foram coletados oito discos foliares de 6 mm (\pm 25 mg) de tecido foliar, conforme supracitado. A extração do ácido chiquímico foi realizada conforme o método proposto por Singh e Shaner (1998), com algumas modificações. Os discos foliares foram macerados em eppendorf contendo 250 μL de HCl 0,25 N. O extrato foi centrifugado a 15000 $\times g$, a 4 $^{\circ}\text{C}$, durante 25 min. O sobrenadante foi coletado para a quantificação do ácido chiquímico conforme o método descrito por Gaitonde e Gordon (1957) e Perez-Jones et al, (2005), com algumas modificações. Para a reação, adicionou-se 30 μL do sobrenadante a uma solução de ácido periódico 1%, em volume final de 500 μL . Essa mistura foi incubada em banho-maria por 45 min, a 37 $^{\circ}\text{C}$. Após esse período, acrescentou-se 500 μL de hidróxido de sódio 1 N e 300 μL de glicina 0,1 M, e as leituras foram realizadas a 380 nm. O coeficiente de extinção molar de $4,76 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para determinar a concentração do ácido chiquímico, conforme descrito por Gaitonde e Gordon (1957).

Para a determinação da concentração dos compostos fenólicos totais, 0,15 g de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 1 ml de metanol 80 % (v/v). O homogeneizado foi centrifugado a 17000 $\times g$ durante 30 min, a 4 $^{\circ}\text{C}$. A concentração dos compostos fenólicos totais foi determinada segundo o método proposto por Zieslin e Ben-Zaken (1993), com algumas modificações proposta por Rodrigues et al, (2005). A reação foi iniciada com a adição de Fenol Folin-Ciocalteu 0,2 M a 35 μL do extrato metanólico, e mantido a 25 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Após a incubação por 5 min a 25 $^{\circ}\text{C}$, adicionou-se à solução carbonato de sódio 0,1 M, a qual permaneceu incubada por 10 min a 25 $^{\circ}\text{C}$. Logo após, 765 μl de água desionizada foi adicionada à mistura, e procedeu-se novamente a incubação por 1 h a 25 $^{\circ}\text{C}$. A absorbância foi lida a 725 nm e a concentração de compostos fenólicos totais foi determinada com base em uma curva de calibração usando ácido gálico (SigmaAldrich, São Paulo, Brasil) como padrão.

O procedimento descrito por Stein e Moore (1948) foi utilizado para a determinação da concentração de aminoácidos solúveis totais. A reação foi iniciada pela

adição de 0,2 mL do extrato foliar a solução constituída de citrato de sódio 0,2 M (pH 5,0), reagente de ninhidrina 5 % em metilcelossolve e cianeto de potássio (KCN) 2% em metilcelossolve, em volume total de 1,7 mL, seguida da incubação em banho-maria a 100°C, durante 20 min. Após o resfriamento, adicionou-se 1,3 mL de etanol 60 % (v/v) e as leituras foram realizadas a 570 nm. A quantificação dos aminoácidos baseou-se em uma curva de calibração, tendo como padrão solução composta por glicina e fenilalanina.

Os danos celulares foram avaliados por meio da peroxidação de lipídeos mediante a concentração de MDA, conforme descrito por Cakmak e Horst (1991), porém com algumas modificações. Amostras de 0,15 g de tecido foliar foram maceradas em N₂ líquido até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de ácido tricloroacético (TCA) 1 % (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10000 xg, durante 15 min, a 4 °C. Após centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (m/v) em TCA 20 % (m/v) e incubado em banho-maria a 95 °C, por 30 min. Após esse período, a reação foi interrompida em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 9000 xg, por 10 min, e a absorbâncias específicas e inespecíficas do sobrenadante foram determinadas a 532 e 600 nm, respectivamente. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath e Packer, 1968).

2.5. Análise estatística

Foram conduzidos dois experimentos independentes, sendo um para a espécie *P. torta* e outro para *A. edulis*. Ambos os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial de 4 (doses) x 2 (tempos de avaliação) com 4 repetições. Porém, apenas para a determinação do teor de ácido chiquímico, utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso em esquema fatorial de 4 (doses) x 2 (tempos de avaliação) x 2 (folhas de avaliação) com 4 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, ajustes de modelos de regressão e ao teste *F*. Os softwares SISVAR e SigmaPlot V.10 (SPSS Inc., USA) foram utilizados para as análises estatísticas e para a confecção dos gráficos, respectivamente.

3. RESULTADOS

A maioria dos efeitos dos tratamentos sobre as variáveis analisadas foram observados para o fator doses, independentemente da espécie estudada (Tabela 1). A interação significativa entre doses x horas foi significativa apenas em *P. torta* para as variáveis FAL e MDA (Tabela 1).

Tabela 1. Atividades da fenilalanina amônia liase (FAL), polifenol oxidase (PPO) peroxidases (POX), 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), compostos fenólicos totais, aminoácidos solúveis totais, proteínas solúveis totais e malondialdeído (MDA) de plantas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* tratadas com glyphosate.

<i>Pouteria torta</i>									
Variáveis	GL	FAL	PPO	POX	EPSPs	Compostos fenólicos	Aminoácidos	Proteínas	MDA
<i>Valores de F</i>									
Doses	3	15.05**	5.82**	75.49**	6.72**	13.57**	13.78**	20.42**	14.03**
Horas	1	10.35*	0.001 ^{ns}	2.73 ^{ns}	2.78 ^{ns}	16.39**	15.70**	5.43 ^{ns}	64.79**
Doses x Horas	3	8.33**	0.13 ^{ns}	1.04 ^{ns}	1.35 ^{ns}	0.72 ^{ns}	2.48 ^{ns}	1.30 ^{ns}	7.59*
CV (%)	-	14,80	24,24	11,75	11,96	4,25	5,42	2,80	16,30
<i>Alibertia edulis</i>									
Doses	3	31,63**	30,49**	2,11 ^{ns}	8,63**	0,7 ^{ns}	0,981 ^{ns}	2,18 ^{ns}	2,12 ^{ns}
Horas	1	0,89 ^{ns}	0,01 ^{ns}	2,22 ^{ns}	5,76*	22,68**	5,441 ^{ns}	1,22 ^{ns}	3,84 ^{ns}
Doses x Horas	3	1,16 ^{ns}	0,07 ^{ns}	1,04 ^{ns}	1,85 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,507 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,60 ^{ns}
CV (%)	-	7,41	14,56	11,42	6,63	7,06	10,18	8,24	16,53

ns, não significativo; ** significativo ao nível de 1%, * significativo ao nível de 5% pelo teste de *F*.

O glyphosate promoveu alterações no metabolismo foliar das espécies *P. torta* e *A. edulis*, porém com maior intensidade na *P. torta*, evidenciando a maior sensibilidade aos efeitos tóxicos desse herbicida. Como mostra na figura 1A, o incremento das doses do glyphosate desencadeou aumento na concentração de ácido chiquímico, porém com estabilização a partir da dose de 400 (g e. a. ha⁻¹) (Figura 1). Em conformidade com os dados de ácido chiquímico, *P. torta* e *A. edulis* submetidas a doses crescentes do glyphosate apresentaram decréscimo linear na atividade da EPSPs, porém de maneira mais pronunciada na *P. torta* (Figura 1 C e D).

Independente das HAA, a atividade da enzima POX aumentou com o incremento da dose do glyphosate apenas na *P. torta* (Figura 1 E). A atividade da PPO e da FAL aumentou em ambas as espécies submetidas a doses crescentes de glyphosate, porém de maneira mais expressiva na *A. edulis* (Figura 1 G, H, I, e J). Em *P. torta*, a FAL aumentou linearmente com o incremento das doses do glyphosate às 312 HAA, porém, sem resposta às 24 HAA (Figura 1 I).

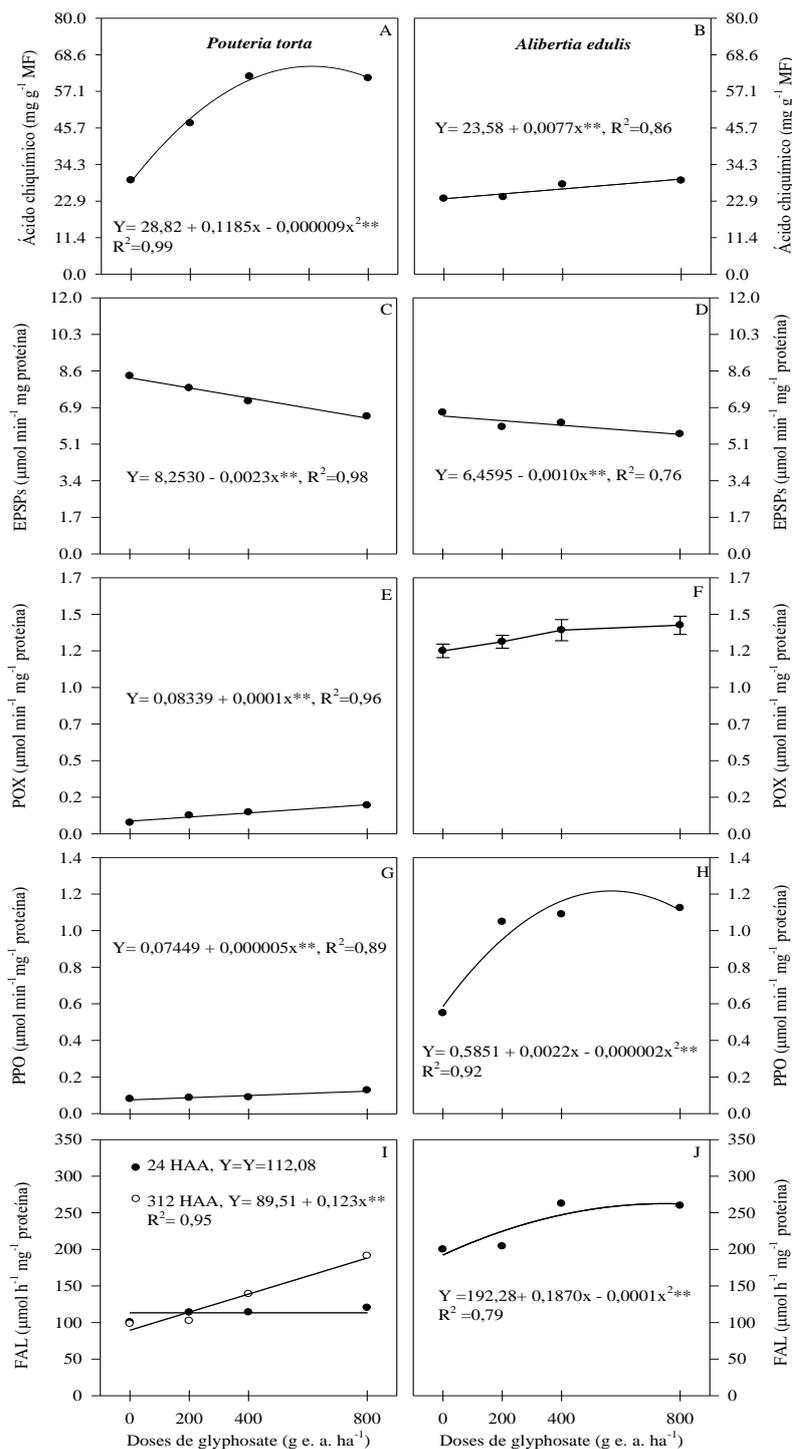


Figura 1. Concentração do ácido chiquímico [A e B], atividades da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) [C e D], peroxidase (POX) [E e F], polifenoloxidase (PPO) [G e H] e fenilalanina amônia-liase (FAL) [I e J], em folhas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* em função das doses do glyphosate (A, B, C, D, E, F, G e H) e da interação entre as doses do glyphosate e horas após aplicação (I). Os dados são médias de $n = 8$ (A, B, C, D, E, F, G e H), $n = 4$ (I). As barras representam o desvio padrão da média ($n = 4$) (F).

O glyphosate após ser absorvido, tende a se acumular em folhas jovens e meristemas, nesse sentido, analisou-se a concentração de ácido chiquímico em folhas em desenvolvimento e completamente expandidas de ambas as espécies. Interessantemente, neste estudo o acréscimo na concentração do ácido chiquímico foi 19% superior em folhas em desenvolvimento comparada às completamente expandidas (Figura 2) na *P. torta*, com nenhuma alteração significativa na *A. edulis* (Tabela 2; Figura 2).

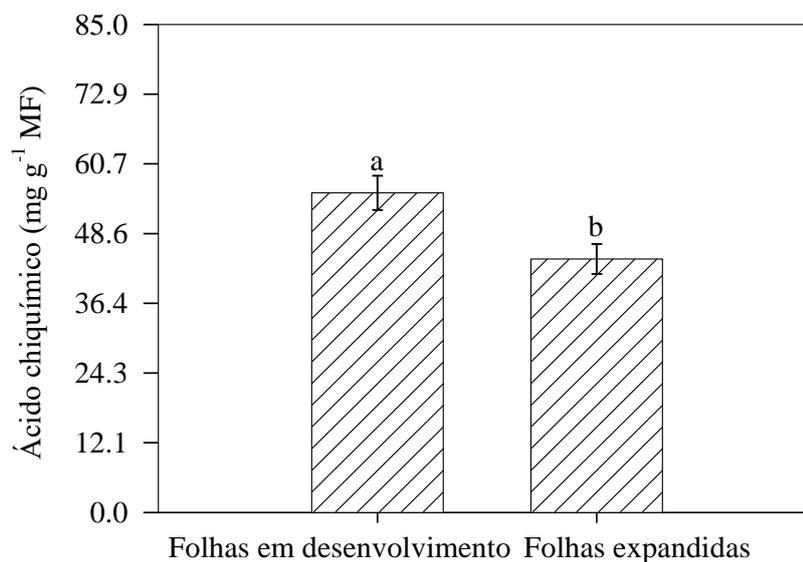


Figura 2. Concentração do ácido chiquímico em folhas em desenvolvimento e completamente expandidas de *Pouteria torta*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *F* a 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n=8$.

Tabela 2. Concentração de ácido chiquímico em folhas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* tratadas com glyphosate.

Variáveis	GL	Ácido chiquímico	
		<i>Pouteria torta</i>	<i>Alibertia edulis</i>
<i>Valores de F</i>			
Doses	3	11.15**	3.952*
Horas	1	0.001 ^{ns}	1.134 ^{ns}
Folhas	1	6.336*	0.738 ^{ns}
Doses x Horas	3	1.797 ^{ns}	1.444 ^{ns}
Doses x Folhas	3	1.533 ^{ns}	0.289 ^{ns}
Horas x Folhas	1	0.007 ^{ns}	0.289 ^{ns}
Doses x Horas x Folhas	3	0.694 ^{ns}	0.067 ^{ns}
CV (%)	-	36,65	21,60

ns, não significativo; ** significativo ao nível de 1%, * significativo ao nível de 5% pelo teste de *F*.

O decréscimo na EPSPs em *A. edulis* foi mais pronunciado às 1.728 HAA (Figura 3 A). Independente da dose do glyphosate, a concentração de compostos fenólicos totais em *A. edulis* aumentou às 1.728 HAA em relação às 24 HAA (Figura 3 B).

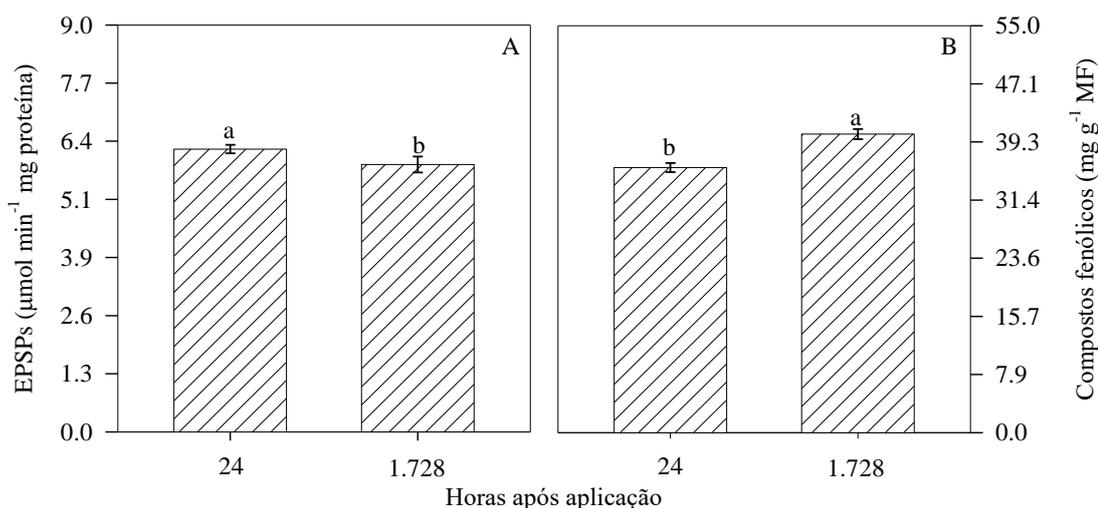


Figura 3. Atividade da 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (A), e concentração de compostos fenólicos totais (B) em folhas de *Alibertia edulis* em função das horas após aplicação do glyphosate. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *F* a 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n = 16$.

Decréscimos nas concentrações de compostos fenólicos totais, aminoácidos e proteínas (Figuras 4 A, C e E), bem como aumento na concentração de MDA foram observados na *P. torta* com o incremento das doses de glyphosate (Figura 4 G). O aumento no MDA com o incremento das doses e das horas após a aplicação do glyphosate ocorreu de maneira mais pronunciada às 312 HAA (Figura 4 G). Diferentemente do observado em *P. torta*, não houve alterações nas concentrações de compostos fenólicos, aminoácidos solúveis totais, proteínas solúveis totais e de MDA em *A. edulis*, independentemente dos tratamentos aplicados (Figuras 4 B, D, F e H). Ressalta-se que às 312 HAA os decréscimos de compostos fenólicos totais e aminoácidos na *P. torta* foram mais proeminentes comparados às 24 HAA (Figuras 5 A e B).

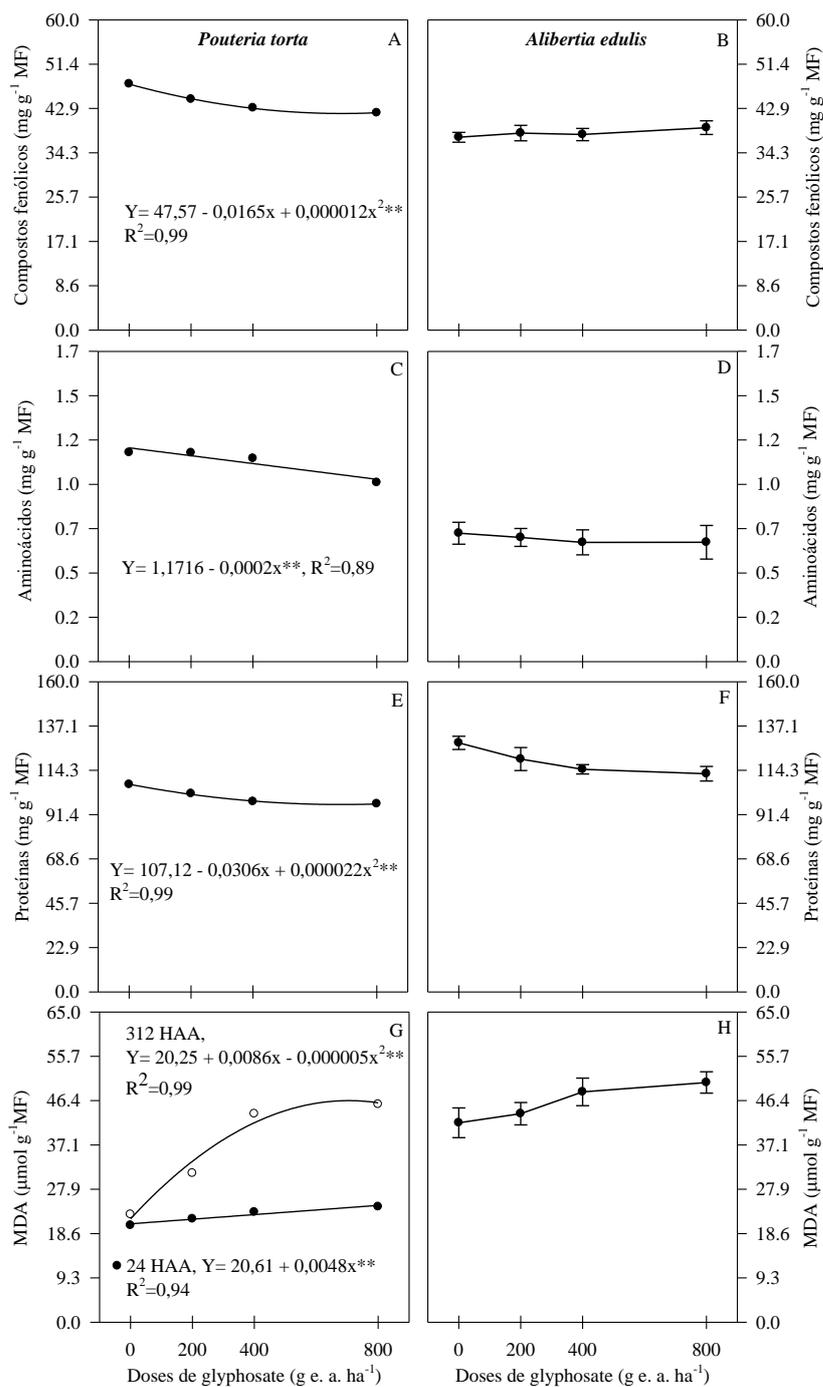


Figura 4. Concentrações de compostos fenólicos totais [A e B], aminoácidos solúveis totais [C e D], proteínas solúveis totais [E e F] e de malondialdeído (MDA) [G e H] em folhas de *Pouteria torta* e *Alibertia edulis* submetidas às doses do glyphosate [A, B, C, D, E e F] e da interação entre as doses do glyphosate e horas após aplicação (G). Os dados são médias de $n = 8$ (A, C, E) e $n = 4$ (G). As barras representam o desvio padrão da média ($n = 4$) (B, D, F e H).

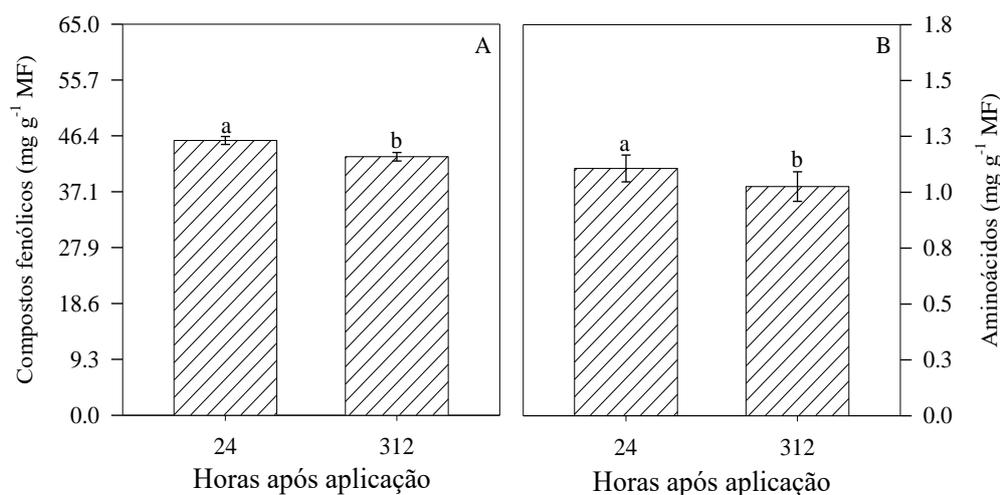


Figura 5. Concentração de compostos fenólicos totais (A) e de aminoácidos solúveis totais (B) em folhas de *Pouteria torta* em função das horas após aplicação do glyphosate. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *F* a 5% de probabilidade. Os dados são médias de $n = 16$.

P. torta submetida a doses crescentes do glyphosate apresentou áreas cloróticas e necróticas, as quais iniciaram a partir do ápice, evoluindo para os bordos foliares. Esses sintomas foram mais pronunciados nas plantas expostas a maior dose do herbicida (Figura 6 A, B, C, e D). Entretanto, *A. edulis* não apresentou sintomas de fitotoxidez, independentemente da dose de glyphosate testada (Figura 6 E, F, G e H).

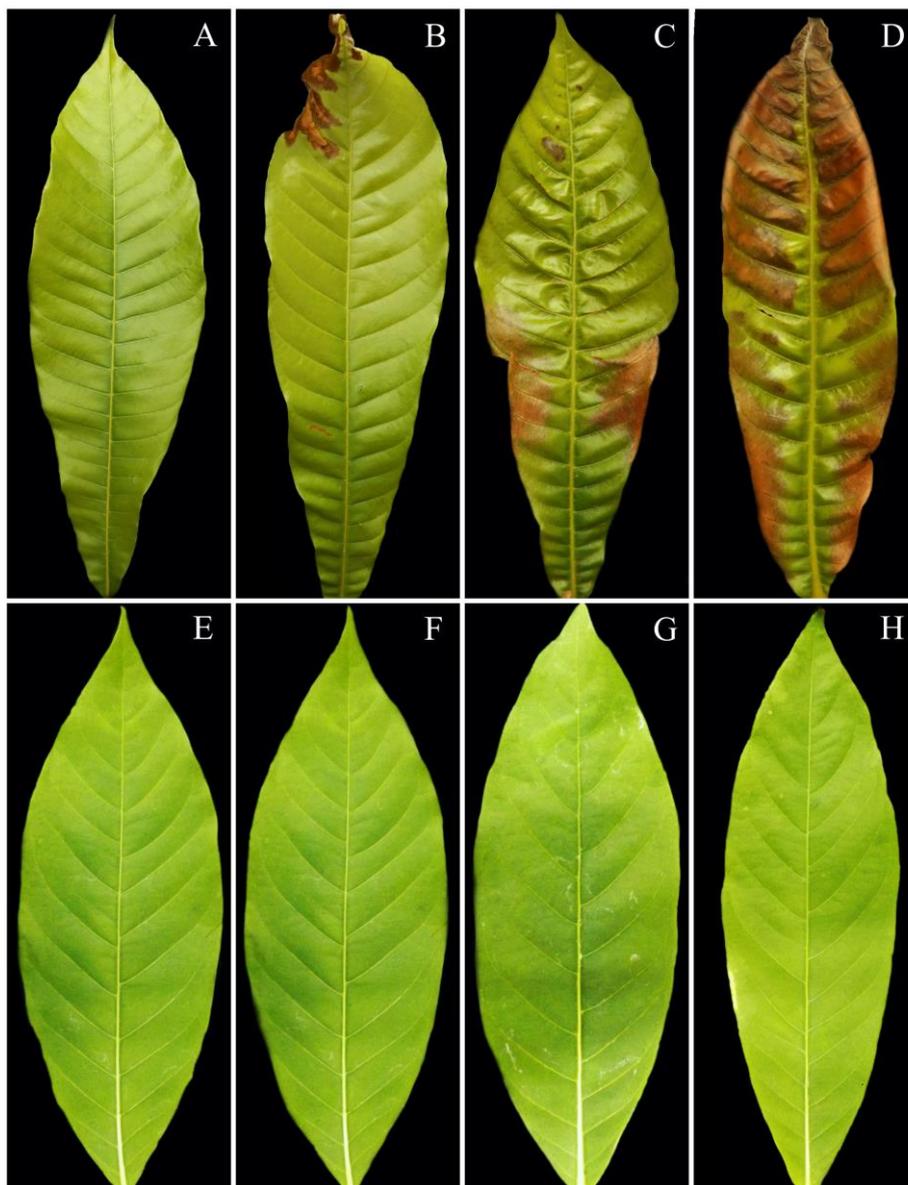


Figura 6. Sintomas visíveis de folhas de *Pouteria torta* às 312 horas após a aplicação em resposta as diferentes doses de glyphosate [A (0 g. e. a ha⁻¹), B (200 g. e. a ha⁻¹), C (400 g. e. a ha⁻¹) e D (800 g. e. a ha⁻¹)] e ausência de sintomas visíveis em folhas de *Alibertia edulis* às 1.728 horas após aplicação em reposta às mesmas doses de glyphosate descritos acima para *P. torta*.

4. DISCUSSÃO

O glyphosate promoveu efeitos visíveis de fitotoxicidade em *P. torta*, comprovada pela ocorrência de cloroses e necroses foliares e pela desestabilização das membranas celulares (indicado pelo incremento de MDA), além do comprometimento na síntese de aminoácidos, proteínas e compostos fenólicos e acúmulo de ácido chiquímico, resultante da inibição da enzima EPSPs. Ao contrário, *A. edulis* apresentou capacidade intrínseca de tolerar os efeitos tóxicos do herbicida, pois mesmo ocorrendo redução significativa na atividade da EPSPs, com resultante acúmulo de ácido chiquímico, isso não foi suficiente para comprometer a síntese dos principais metabólitos da via do chiquimato, bem como a integridade das membranas celulares. Isso foi evidenciado pela inalteração na síntese de aminoácidos e proteínas, na estrutura das membranas e pela ausência de sintomas de fitotoxicidade.

O acúmulo de ácido chiquímico em *P. torta* e *A. edulis* submetidas a doses crescentes do glyphosate corrobora com os resultados obtidos por vários autores (González-Torralva et al, 2012; Yannicaria et al, 2012; Schrübbers et al, 2014). Esse acúmulo se dá pelo bloqueio específico do glyphosate na via do chiquimato (Mobin et al, 2015). Esse herbicida inibe diretamente a enzima EPSPs, a qual catalisa a transferência de parte do grupo enolpiruvil do fosfoenol piruvato (PEP) para o grupo 5-hidroxil do chiquimato 3-fosfato (S3P), produzindo o enolpiruvilchiquimato-3-fosfato e fosfato inorgânico na rota do ácido chiquímico (Herrmann, 1995; Herrmann e Weaver, 1999; Orcaray et al, 2012). O bloqueio na atividade da EPSPs desregula o fluxo de carbono na planta, elevando as concentrações de ácido chiquímico e comprometendo a produção de corismato, que é precursor de vários metabólitos secundários (Tzin e Galili, 2010; Mensah et al, 2015).

Corroborando com os dados de ácido chiquímico, neste estudo a sensibilidade diferencial ao glyphosate observada entre as duas espécies não está relacionada com a ação diferencial desse herbicida na atividade da EPSPs, pois ambas as espécies apresentaram redução na atividade dessa enzima. Portanto, tomados em conjunto, esses resultados apontam para o potencial uso do ácido chiquímico e da EPSPs como biomarcadores sensíveis e específicos da ação do glyphosate em plantas nativas do cerrado. Resultados semelhantes foram reportados em *Brassica napus* (Petersen et al, 2006), *Panicum miliaceum*, *Helianthus annuus* e *Triticum aestivum* (Henry et al, 2007), em cultivares sensíveis de *Glycine max* (Bonini et al, 2009), *Canavalia ensiformis* (Cruz-Hipolito et, 2009) e *Coffea arabica* (Schrübbbers et al, 2014).

Considerando que, de modo geral, o glyphosate se mova de órgãos fonte para tecidos meristemáticos (drenos), local em que é preferencialmente acumulado (Lukatkin et al, 2013), a sua translocação deficiente nos tecidos das plantas é considerada um dos mecanismos de tolerância inata de plantas (Rojano-Delgado, 2012). Dessa forma, a alta sensibilidade de *P. torta* ao glyphosate pode estar relacionada, ao menos em parte, a ausência de mecanismos robustos que reduzam a livre translocação desse herbicida nos tecidos do vegetal. Isso porque essa espécie apresentou maior acúmulo de ácido chiquímico nas folhas em desenvolvimento em relação às completamente expandidas, conforme reportado para espécie *Coffea arabica*, que também foi sensível à ação tóxica do glyphosate (Schrübbbers et al, 2014). Corroborando com esses resultados, as plantas, de modo geral, apresentam maior expressão de genes que codificam para a EPSPs nos tecidos meristemáticos, o que desencadeia maior efeito tóxico do glyphosate nas folhas jovens (Shaner, 2009). Interessantemente, neste estudo, não houve alteração no acúmulo de ácido chiquímico entre as folhas de idades diferentes em *A. edulis*, sugerindo que a translocação preferencial do glyphosate para tecidos meristemáticos foi, pelo menos em parte, comprometida, contribuindo possivelmente com sua tolerância.

O aumento na atividade da POX em *P. torta* evidencia que o glyphosate induziu, pelo menos indiretamente, o incremento na concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em contraste, *A. edulis*, não apresentou alteração na atividade da POX, mesmo nas maiores doses do herbicida, indicando a atuação de mecanismo de defesa antioxidante inato mais robusto. As POXs estão presentes em todos os compartimentos celulares, catalisando a transferência de elétrons de diferentes substratos reduzidos, como compostos fenólicos, para o H_2O_2 . Vários autores relatam alterações na atividade da POX na defesa de plantas, quando submetidas a condições de estresse abióticos, tais

como hídrico (Dias et al, 2014), térmico (Sekmen et, 2014) e por irradiância (Takshak e Agrawal, 2015), o que não houve neste estudo, uma vez que o mesmo foi realizado em condições controladas de casa de vegetação climatizada. Interessantemente, neste estudo, a ativação do sistema de defesa antioxidante em *P. torta* não foi suficiente para conter os efeitos tóxicos desencadeados pelo glyphosate, mesmo nas menores doses. Adicionalmente, o comprometimento nas membranas celulares apenas em *P. torta*, evidenciado pelo aumento de MDA, que é um indicador da peroxidação de lípideos (Aguiar-Silva, 2016), corrobora com a ideia de que o glyphosate, independentemente da dose aplicada, induz estresse oxidativo nessa espécie, via incremento de espécies reativas de oxigênio (EROs), mas não em *A. edulis*. Por ser altamente responsiva e sensível à ação do glyphosate, além de ser ativada mesmo nas menores doses, a POX apresenta grande potencial para o monitoramento do impacto ambiental utilizando *P. torta* como bioindicadora.

Embora o envolvimento da PPO na resposta de plantas a estresses abióticos ainda não esteja claro (Boeckx et al, 2015), neste estudo essa enzima foi bastante responsiva a ação do glyphosate tanto em *P. torta* quanto *A. edulis*. Corroborando com esse resultado, recentemente foi relatado o envolvimento da PPO na defesa de *Cajanus cajan* contra o estresse por alagamento (Bansal e Srivastava, 2015). O aumento na atividade da PPO reduz o nível de oxigênio livre, desencadeando decréscimo de sua quantidade para a produção de EROs. Isso porque essa enzima catalisa a oxidação de monofenóis e o-difenóis em o-quinonas, com concomitante consumo de oxigênio (Boeckx et al, 2015). Além disso, existem evidências de que o aumento da PPO em plantas submetidas a estresses abióticos esteja mais relacionado ao seu papel indireto no metabolismo secundário, por participar no balanço de compostos da rota dos fenilpropanoides, via dissipação do excesso de energia, reduzindo o estresse oxidativo (Boeckx et al, 2015).

Independente da espécie estudada, concomitante ao incremento da PPO houve aumento pronunciado na atividade da FAL, que caracterizam essas enzimas como potenciais biomarcadoras da ação do glyphosate. A FAL, semelhante a PPO, atua na rota dos fenilpropanoides, sendo a primeira enzima dessa via. O aumento na atividade da FAL em *P. torta* e *A. edulis* está em conformidade com as respostas encontradas em outras espécies de plantas tratadas com glyphosate (Maroli et al, 2015; Mobin et al, 2015). Recentemente Maroli et al. (2015) relataram que o aumento na atividade da FAL em resposta ao glyphosate, pode atenuar, mesmo que parcialmente, os efeitos tóxicos do

glyphosate, mediante diminuição dos danos oxidativos gerados por esse herbicida. A FAL atua na conversão da L-fenilalanina a ácido trans-cinâmico e amônia (Mobin et al, 2015), redirecionando grande quantidade de carbono fixado a partir do metabolismo primário para a formação de vários metabolitos secundários, dentre eles, diversas classes de compostos fenólicos (Tzin e Galili, 2010).

O glyphosate é capaz de modular a concentração de compostos fenólicos via redução da concentração da fenilalanina (Sousa et al, 2007), além de, possivelmente desregular, via estresse oxidativo, o metabolismo primário, resultando em menor alocação para a síntese de metabolitos secundários. Neste estudo, o glyphosate desencadeou diminuição na síntese de aminoácidos, proteínas e compostos fenólicos apenas em *P. torta*. Dessa forma, esses metabolitos podem ser utilizados com biomarcadores da ação do glyphosate, porém apenas em espécies sensíveis a essa molécula de herbicida. A manutenção das concentrações desses compostos em *A. edulis*, submetidas a pulverização com glyphosate, pode estar associada com a sua maior capacidade inata em driblar os efeitos da redução na atividade da EPSPs causada por esse herbicida. O aumento da concentração de compostos fenólicos às 1.728 HAA, intrínseco a sua ontogenia, corrobora com a ideia de que *A. edulis* apresenta mecanismos inato robusto em tolerar a ação tóxica do glyphosate. Isso porque os compostos fenólicos desempenham diversas funções em plantas, com destaque para sua capacidade antioxidativa, por atuar no sequestro de radicais livres e na quelatação de metais de transição, contribuindo para retardar ou inibir a peroxidação lipídica (Sousa et al, 2007; Takahashi e Badger, 2011).

Tomados em conjuntos, os resultados deste estudo demonstraram que a inibição da rota do ácido chiquímico pelo glyphosate, além de promover efeitos adversos no metabolismo, desencadeou a formação de espécies reativas de oxigênio (Ahsan et al, 2008), resultando em peroxidação lipídica e, conseqüentemente, em efeitos visíveis de fitotoxicidade foliar, via clorose e necrose, apenas em *P. torta*. Portanto, *P. torta* e *A. edulis* apresentaram sensibilidade diferencial, sendo *P. torta* mais responsiva aos efeitos tóxicos do glyphosate. Essa espécie apresentou um conjunto de biomarcadores bioquímicos sensíveis, além dos sintomas visíveis de fitotoxicidade, caracterizando *P. torta* como potencial bioindicadora da ação do glyphosate em vegetação nativa do Cerrado. Embora *A. edulis* tenha apresentado pouca sensibilidade ao glyphosate, foram identificados biomarcadores responsivos a esse herbicida, permitindo classificar a mesma como potencial biosensora da ação do glyphosate. Ressalta-se que a alta

tolerância de *A. edulis* aos efeitos do glyphosate pode esta relacionada a atuação de mecanismo de defesa bioquímico robusto, o que pôde ser evidenciado pela atividade mais expressiva da maioria das enzimas analisadas em relação a *P. torta*. Além disso, outros mecanismos podem ter contribuído para a tolerância inata de *A. edulis* ao glyphosate, tais como menor absorção e mecanismo mais eficiente nos processos de compartimentalização e metabolização da molécula desse herbicida (Sherman et al, 1996; Beltrano et al, 2013). Assim, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na tolerância inata de *A. edulis* ao glyphosate.

5. CONCLUSÕES

1. O glyphosate induz alterações metabólicas em *P. torta* e *A. edulis*, porém, de maneira mais pronunciada em *P. torta*;
2. O aumento na concentração de MDA e na atividade das enzimas PAL, POX e PPO, bem como, a diminuição na atividade da EPSPs, na concentração de aminoácidos, proteínas e compostos fenólicos e a ocorrência de danos visíveis demonstram claramente a alta sensibilidade de *P. torta* ao glyphosate.
3. O acúmulo de ácido chiquímico e as alterações na atividade das enzimas EPSPs, PAL e PPO podem ser utilizados como biomarcadores responsivos a ação do glyphosate em ambas as espécies;
4. A manutenção nas concentrações de compostos fenólicos totais, mesmo nas maiores doses do glyphosate, associada a maior atividade da maioria das enzimas analisadas, pode ter contribuído para a maior tolerância inata de *A. edulis* em relação a *P. torta* à ação do glyphosate;
5. A ausência de sintomas visíveis de fitotoxicidade associada aos biomarcadores observados indica que *A. edulis* é uma potencial biosensora da ação do glyphosate.
6. Os biomarcadores, em conjunto, observados em *P. torta* potencializam a sua indicação como bioindicadora da ação do glyphosate em remanescentes de vegetação nativa do cerrado.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dr^a. Marisa Domingos (Instituto de Botânica de São Paulo), pela contribuição para o desenvolvimento deste projeto. À Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Projeto Sisbiota Brasil, ao Fundo de Financiamento de Estudos de Projetos e Programas, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e ao Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- Aguiar-Silva, C., Brandão, S. E., Domingos, M., Bulbovas, P., 2016. Antioxidant responses of Atlantic Forest native tree species as indicators of increasing tolerance to oxidative stress when they are exposed to air pollutants and seasonal tropical climate. *Ecol. Indic.* 63, 154-164.
- Ahsan, N., Lee, D. G., Lee, K. W., Alam, I.; Lee, S. H., Bahk, J. D., Lee, B. H., 2008. Glyphosate induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiol. Biochem.* 46 (12), 1062-1070.
- Almeida, S. P., Proença, C. E. B., Sano, S. M., Ribeiro, J. F., 1998. Cerrado: Espécies vegetais úteis. Embrapa, Brasília.
- Alves, L.W.R., Silva, J.B., Souza, I.F., 2000. Efeito da aplicação de subdoses dos herbicidas glyphosate e oxyfluorfen, simulando deriva sobre a cultura de milho (*Zea mays* L.). *Ciên. Agrotec.* 24, (4), 889-897.
- Bansal, R., Srivastava, J.P., 2015. Antioxidative responses to short term waterlogging stress in pigeon pea. *Indian J. Plant Physi.* 20 (2):182-185.
- Bartell, S. M., 2006. Biomarkers, bioindicators, and ecological risk, assessment brief, review and evaluations. *Environ. Bioindicators.* 1, 39-52.
- Beltrano, J., Ruscitti, M., Arango, C., Ronco, M., 2013. Changes in the accumulation of shikimic acid in mycorrhized *Capsicum annum* L. grown with application of glyphosate and phosphorus. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 25, n. 2, p. 125-136.
- Boeckx, T., Webster, R., Winters, A.L., Webb, K.J., Gay, A., Kingston-Smith, A.H., 2015. Polyphenol oxidase-mediated protection against oxidative stress is not associated with enhanced photosynthetic efficiency. *Ann. Bot.* 116 (4), 529-540.
- Boutin, C., Strandberg, B D., S.K.D., Mathiassen, P.J. T., 2014. Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications?, *Environ. Pollut.* 185, 295-306.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Burger, J., 2006. Bioindicators: Types, development and use in ecological assessment and research. *Environ. Bioindicators.* 1, 22-39.
- Cakmak, I., Horst, J.H., 1991. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83, 463- 468.
- Chance, B., Maehley, A. C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764-775.

- Cruz-Hipolito, H., Osuna, M.D., Heredia, A. Ruiz-Santaella, J. P., De Prado, R., 2009. Nontarget mechanism involved in glyphosate tolerance found in *Canavalia ensiformis* plants. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4844-4848.
- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loqués, F., Roméo, M., Salbert, V., 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, 66(3), 574-583.
- Domingos, M., Bulbovas, P., Camargo, Z. S. C., Aguiar-Silva, C., a, Brandão, S.E., Dafré-Martinelli, M., Dias, A. P. L., Engela, R.G.S M., Gaglian, J., Moura, B.B., Alves, E. S, Rinaldi, M. C.S., Gomes, E. P.C., Furlan, C. M., Figueiredo. A. M. G., 2015. Searching for native tree species and respective potential biomarkers for future assessment of pollution effects on the highly diverse Atlantic Forest in SE-Brazil. *Environ. Pollut.* 202, 85-95.
- Egan, J. F., Bohnenblust, E., Goslee, s. Mortenssen, D., Tooker, J., 2014. Herbicide drift can affect plant and communities. *Agricu. Ecosyst. Environ.* 185, 77-87.
- Forlani, G., Parisi, B., Nielsen, E. 5-enol-Pyruvyl- Shikimate-3-Phosphate Synthase from *Zea mays* Cultured Cells., 1994. *Plant Physiol.* 105, 1107-1114.
- Franco, A. C., Rossatto, D. R., Silva, L. C. R., Ferreira, C. S., 2014. Cerrado vegetation and global change: The role of functional types, resource availability and disturbance in regulating plant community responses to rising CO₂ levels and climate warming. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 26, 19-38.
- Gaitonde, M. Y., Gordon, M., 1957. A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid. *The J. Biol. Chem.* 230, 1043-1050.
- Gomes, M. P., S. G. L., Moingt, M., E., S., M., Marc Lucotte, M., Philippe Juneau, P., 2016. Impact of phosphate on glyphosate uptake and toxicity in willow. *J. Hazard. Mater.* 304, (5), 269–279.
- Gomes, M. P., Smedbol, E., Chalifour, A, Hénault-Ethier, L., Labrecque, M. Lepage, L., Marc Lucotte, M., Juneau, P., 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *J. Exp. Bot.* 65, (17), 4691–4703.
- González-Torralva, F., Antonia M. Rojano-Delgado., Castro, M. D. L., Müllereder, N., De Prado, R., 2012. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes, *J. Plant Physiol.* 169, (17) 1673-1679.
- Griboff, J., Morales, D., Bertrand, L., Bonansea, R.I., Monferrán. V., Asis, R., Wunderlin, D.A., Amé, M, V., 2014. Oxidative stress response induce by atrazine in *Palaemonetes argentines*: The protective effect of vitamin E. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 1-8.
- Güngördüa, A., Uçkunb. M., Yologlu, E., 2016. Integrated assessment of biochemical markers in premetamorphic tadpoles of three amphibian species exposed to glyphosate- and methidathion-based pesticides in single and combination forms. *Chemosphere*, 124, 2024- 2035.
- Guo, Y., Liu, L., Bi, Y., 2007. Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in Chine cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *Int. J. Food Sci. Technol.* 42, 1012-1018.
- Hattab, S., Hattab S., Flores-Casseres, M.L., Boussetta, H., Doumas, P., Hernandez, L.E., Banni, M., 2016. Characterisation of lead-induced stress molecular biomarkers in *Medicago sativa* plants. *Environ. Exp. Bot.* 123:1-12.
- Heath R. L., Packer L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125,189–198.

- Henry, B. W., Shaner, D. L., West, M. S., 2007. Shikimate accumulation in sunflower, wheat and proso millet after glyphosate application. *Weed Sci.* 55, (4) 1-5.
- Herrmann, K. M., 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell.* 7, 907-919.
- Herrmann, K. M., Weaver, L. M., 1999. "The shikimate pathway." *Annual Review of Plant Biology* 50.1 (1999): 473-503.
- Hugget, R.J., Unger, M.A., Seligman, P.F., Valkirs, A.O., 1992. The marine biocide tributyltin. *Environ. Sci. Technol.* 26:233-410.
- Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57, 315-319.
- Lagadic, L., Caquet Th, Ramade, F., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment. *Invertebrate populations and communities. Ecotoxicology.* 3, 193-208.
- Lorenzi, H., *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.* 2002. 1 Nova Odessa, 4 ed. São Paulo: Ed. Plantarum, 368p.
- Lukatkin, A. S., Gar'kova A. N., Bochkarjova, A. S., Olga V., Nushtaeva, O. V, da Silva, J. A., 2013. Treatment with the herbicide TOPIK induces oxidative stress in cereal leaves. *Pestic. Biochem. Phys.* 105, 44-49.
- Maroli, A. S., Nandula, V., Dayan, F. E., Duke. S., Gerard, P., Tharayi, N., 2015. Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an *Amaranthus palmeri* biotype. *J. Agri. Food Chem.* 63, 9199-9209.
- Mensah, P. K., Palmer, C. G., Oghenekaro, O. N., 2015. "Ecotoxicology of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides-Toxicity to Wildlife and Humans." *Toxicity Hazard of Agrochemicals:* 93p.
- Mobin, M., Wu, C.H, Tewari, R. K., Paek, K.Y., 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 (PCTOC)*, 120, (1), 291-301.
- Myers, N. R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca G. A. B., Kent J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- Nascimento, K. J. T., Debona, D., França, S. K.S., Gonçalves, M. G. M., DaMatta, F. M., Rodrigues, F. A., 2014. Soybean Resistance to *Cercospora sojina* Infection Is Reduced by Silicon. *Biochem. Cell Biol.* 104, (11) 1183- 1191.
- Orcaraya, L., Zulet., Zabalza, A.Z., Royuela, M., 2012. Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *J. Plant Physiol.* 169, 27-33.
- Perez-Jones, A., Park, A., Colquhoun, J., Mallory-Smith, C. y Shaner, D., 2005. Identification of glyphosate resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. *Weed Sci.* 53, 775-779.
- Petersen, I. L., Andersen, K. E., Sørensen, J. C., Sørensen, H., 2006. Determination of shikimate in crude plant extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogra.* 1130, (2), 253-258.
- Piola, L., J. Fuchs, M. L., Oneto, S. Basack, E., Kesten N. Casabé., 2013. Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. *Chemosphere*, 91: 545-551.
- Rodrigues, F. A., Jurick, W. M., II, Datnoff, L. E., Jones, J. B., Rollins, J. A., 2005. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice–Magnapor the grisea interactions. *Physiol. Mol. Plant P.* 66,144-159.
- Rojano-Delgado, A. M., Cruz-Hipolito, H., De Prado, R., De Castro, M. D. L., Franco, A. R., 2012. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation

- contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. utilis plants. *Phytochemistry*, 73 (1), 34- 41.
- Rojano-Delgado, A.M., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D., De Prado, R., 2010. Screening and confirmatory analysis of glyoxylate: A biomarker of plants resistance against herbicides, *Talanta*, 82, (5), 1757-1762.
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S., Wolfgang Kabsch, W., 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *PNAS*, 96, 4, 1376–1380.
- Schrübbers, L. C., Valverde, B. E., Sørensen, J.C., Cedergreen, N., 2014. Glyphosate spray drift in *Coffea arabica* – Sensitivity of coffee plants and possible use of shikimic acid as a biomarker for glyphosate exposure. *Pestic. Biochem. Physiol.* 115, 15-22.
- Shaner, D. L., 2009. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Sci.* 57, 118-123.
- Sherman, T.D., Vaughn, K.C., Duke, S.O. 1996. Mechanism of action and resistance to herbicides. In: Duke, S.O. (Ed.). *Herbicides Resistant Crops*. Boca Raton: CRC Press, 14-28.
- Singh, B. K. y., Shaner D. L. 1998. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of Glyphosate-Resistant Plants. *Weed Technol.* 12, 527-530.
- Solórzano, A., Pinto, J. R. R. P., Felfili, J. M., Hay, J. D. V. 2012. Perfil florístico e estrutural do componente lenhoso em seis áreas de cerrado ao longo do bioma Cerrado. *Acta Bot. Bras.* 26, (2).
- Sousa, C. M., Silva, H., Vieira-Jr, G., Ayres, M., Costa, L., Araújo, D., Cavalcante, L., Barros, E., Araújo, P., Brandão, M., Chaves, M., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. nova.* 30, (2), 351-355.
- Stein, W., Moore, S. A., 1948. A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* Bethesda, 176, (2), 367-372.
- Takahashi, S., Badger, M. R., 2011. Photoprotection in plants: A new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.* 16, 1.
- Tzin, V., Galili, G., 2010. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The arabidopsis book / A. Soc. Plant Biol.* 17, 1784-1790.
- Xing, H., Wanga, X., Sun, G., Gao, X., Xu, S., Wang, X., 2012. Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Phar.* 33, 233–244.
- Yannicaria, M., Istilart, C., Giménez, D. O., Castro, A. M., 2012. Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. *Crop Protection.* 32, 12-16.
- Zieslin, N., Ben-Zaken, R., 1993. Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant Physiol. Biochem.* 31:333-339.
- Zucker, M., 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 40,779-784.

CONCLUSÃO GERAL

O glyphosate induz alterações no metabolismo fotossintético e bioquímico em *P. torta* e *A. edulis*, porém, de maneira mais pronunciada em *P. torta*. A diminuição do processo fotossintético, o dano fotoinibitório ao FSII, o aumento na concentração de MDA, bem como, a diminuição na atividade da EPSPs, na concentração de aminoácidos, proteínas e compostos fenólicos e a ocorrência de danos visíveis de fitotoxicidade demonstram claramente a alta sensibilidade de *P. torta* ao glyphosate, o que potencializa a sua indicação como bioindicadora da ação do glyphosate em remanescentes de vegetação nativa do cerrado.

A manutenção da concentração dos pigmentos cloroplastídicos, compostos fenólicos totais, bem como a maior atividade da maioria das enzimas analisadas, e a ausência de sintomas de fitotoxicidade visíveis associada aos biomarcadores observados indica que *A. edulis* é uma potencial biosensora da ação do glyphosate.