

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

ALTERAÇÕES MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS
EM PLANTAS NÃO ALVO DE *Bauhinia variegata* L. COMO
INDICADORAS DA AÇÃO DO HERBICIDA DIUROM

Autora: Dêmily Andrômeda de Lima
Orientadora: DSc. Marisa Domingos

RIO VERDE - GO
agosto – 2016

INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

ALTERAÇÕES MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS
EM PLANTAS NÃO ALVO DE *Bauhinia variegata* L. COMO
INDICADORAS DA AÇÃO DO HERBICIDA DIUROM

Autora: Dêmily Andrômeda de Lima
Orientadora: DSc. Marisa Domingos

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de concentração em Agroquímica Ambiental.

RIO VERDE - GO
Agosto – 2016

Lima, Dêmily Andrômeda de

L732a Alterações morfoanatômicas e fisiológicas em plantas não alvo de *Bauhinia variegata* L. como indicadoras da ação do herbicida diurom/ Dêmily Andrômeda de Lima. -- Rio Verde.-- 2016.

42 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano –
Campus Rio Verde, 2016.

Orientadora: Dr^a. Marisa Domingos.

Bibliografia

1. Cerrado. 2. Biomonitoramento. 3. Fluorescência da clorofila *a*. 4. Fotossíntese. I. Título. II. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

CDD: 581.4

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

ALTERAÇÕES MORFOANATÔMICAS E
FISIOLÓGICAS EM PLANTAS NÃO-ALVO DE
Bauhinia variegata L. COMO INDICADORAS DA AÇÃO
DO HERBICIDA DIUROM

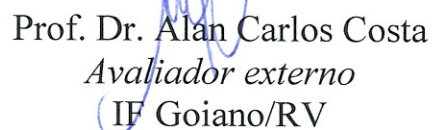
Autora: Dêmily Andrômeda de Lima
Orientadora: Marisa Domingos

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

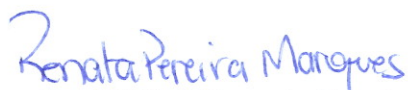
APROVADA em 23 de agosto de 2016.



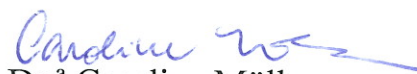
Prof.^a Dr.^a Valdnéa Casagrande
Dalvi
Avaliadora externa
IF Goiano/RV



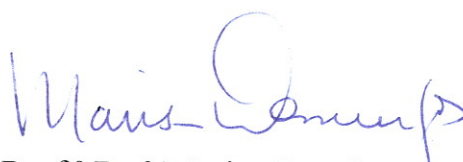
Prof. Dr. Alan Carlos Costa
Avaliador externo
IF Goiano/RV



Prof.^a Dr.^a Renata Pereira
Marques
Avaliadora externa
IF Goiano/RV



Dr.^a Caroline Müller
Avaliadora externa
IF Goiano/RV



Prof.^a Dr.^a Marisa Domingos
Presidente da banca
Instituto de Botânica

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque Ele existe antes de todas as coisas, e todas as coisas subsistem nele (Colossenses 1, 17). Nos dias mais sombrios, Deus nos presenteia com pessoas maravilhosas, por isso, agradeço ainda, por ter colocado “anjos” na minha vida, sem os quais, essa jornada não teria o menor sentido.

Aos meus pais, pela sabedoria nos ensinamentos e pelo investimento em minha educação. Obrigada por permanecerem ao meu lado.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos que souberam compreender a minha ausência, cujo isolamento e dedicação a compromissos me impediram de estar com vocês. A distância só aumentou o amor que tenho por todos.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, por proporcionarem a oportunidade de me especializar. Ao CNPq, CAPES e FAPEG, pelo financiamento da estrutura e equipamentos utilizados na realização deste trabalho.

À minha orientadora, Marisa Domingos, pelo exemplo de profissionalismo, pela atenção, confiança, ajuda e compreensão em todos os momentos.

Ao excelente profissional e na prática meu orientador, Alan Carlos Costa, pelas orientações, pelo incentivo e ensinamentos durante o mestrado que levaram ao meu crescimento profissional e pessoal.

À Caroline Müller, pela coorientação, paciência, confiança, amizade, ensinamentos e, principalmente, exemplo de caráter. Agradeço também por me ajudar a tomar decisões, mostrar que só precisamos de oportunidades. Sou imensamente grata por toda dedicação a mim, não há como retribuir tudo o que fez.

Ao professor Adriano Jakelaitis, pela coorientação e pelos toques para que a execução deste trabalho fosse a mais criteriosa possível.

À professora Valdneá Casagrande Dalvi, pela disponibilidade em me auxiliar nas dúvidas e execução deste trabalho e por me ensinar praticamente tudo que sei sobre anatomia vegetal.

Ao senhor, Ângelo Rizzo, pela ajuda com a identificação da espécie. Durante a nossa conversa me senti como uma neta ouvindo as histórias de vida do avô. Obrigada pela experiência maravilhosa transmitida nessa visita.

As amigas de laboratório de anatomia vegetal, Giselle Faria e Roberta Silva, obrigada pelas horas de trabalho, pelos cortes intermináveis no micrótomo, pelas pescarias, risadas, bolos e fofocas.

Aqueles com quem dividi teto, alegrias e tristezas, e que por um breve ou longo período de tempo acompanharam os bastidores desse trabalho: Ana Paula Marinho (Amora), Anielly Monteiro, Emelly Santos, Estefânia Nobrega, Neilson Reis (nosso cozinheiro número 1), Luana Ferreira (Lupi), Sinara Rigonato, Aline Torino, Estefânia Bottega, Estela Bottega, Célia Aparecida e, ainda, pessoas que não teria a oportunidade de conhecer se não pelo mestrado: Vanessa Joanes Ribeiro, Maquelle Garcia e Larissa Gabriela Marinho. Vocês foram fundamentais para que me firmasse nesta cidade, obrigada pelas palavras de carinho e força nos momentos de maiores tensões.

Às minhas amigas do coração que fiz durante o mestrado, Sara Marques (obrigada por me mostrar que todo bem que fazemos ao próximo, por si só, já é a maior das recompensas), Dani's (Danielle Prado e Daniela Macedo) pelos trabalhos em conjunto e por me mostrar que nem tudo é tão importante quanto fazemos parecer, mesmo que seja.

Aos irmãos de orientação do "LECO" (Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal) que por muitas vezes me ajudaram: Priscila F. Batista, Yasmin A. Barros, Thales Amaral, Verônica B. Junqueira, Marília A. dos Santos, Robson de Oliveira S. Filho, Ailton José C. Filho, Gabriel M. Almeida, Jônatas N. de Castro, Erick Johnny S. Dutra, Camila V. Vasconcelos, Sueisla L. R. Silva, Fábria B. da Silva, Roberto Vital, Guilherme Mendes, Ritiane Souza e José Rubens. Vocês tornaram essa jornada muito mais prazerosa do que eu imaginei. Muito obrigada pelas risadas, pelas ajudas e pela fantástica convivência!

Enfim, agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram com a minha formação profissional e, de forma primordial, humana!

BIOGRAFIA DA AUTORA

DÊMILY ANDRÔMEDA DE LIMA, filha de Adalberto Martins de Lima e Sandra Maria de Almeida Ferreira, nasceu no dia 13 de novembro de 1989, na cidade de Natal-RN.

Em janeiro de 2010, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Goiás – Campus Quirinópolis – Goiás, graduando-se em fevereiro de 2014.

Em agosto de 2014, iniciou no curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, sob a orientação da Professora Marisa Domingos e do Professor Alan Carlos Costa.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACIONES E UNIDADES.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo.....	5
3.2. Análise de sintomas foliares visíveis.....	6
3.3. Análises anatômicas	6
3.3.1. Análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV)	7
3.3.2. Análises em microscopia de luz.....	7
3.4. Avaliações Fisiológicas	7
3.4.1. Trocas Gasosas.....	7
3.4.2. Fluorescência da Clorofila a	8
3.5. Análises Estatísticas	8
4. RESULTADOS	10
4.1. Sintomas visíveis	10
4.2. Análises micromorfológicas	11
4.3. Trocas Gasosas	15
4.4. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	16
5. DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÕES	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sintomas visíveis da toxicidade do diurom em folhas de <i>Bauhinia variegata</i> em resposta as doses crescentes do herbicida e das horas após a aplicação. Barras: 3 cm.....	10
Figura 2. Superfície foliar de <i>Bauhinia variegata</i> em microscopia eletrônica de varredura. Tratamento controle (A-C) e quando expostas a 400 (D), 800 (E), 1.600 (F e G) e 2.400 g i.a ha ⁻¹ (H-J) de diurom. A-B: Faces adaxial (A) e abaxial (B) da região EM. Contorno das paredes anticlinais nítidas. C: Face abaxial (Região EM). Detalhe do estômato e das ceras epicuticulares no formato de placas (→). D-E: Face abaxial (Região EM (D) e M (E) da folha), desestruturação e alterações na distribuição da cera. F-G: Face abaxial e adaxial (Região MF). Alterações no contorno das paredes anticlinais e aglomerados de ceras epicuticulares (*). H-J: Face abaxial (Região M (H) e MF (I-J)). Células totalmente plasmolizadas (*) e tricomas danificados (→). I: Mudanças no relevo da superfície foliar (*). J: Ruptura da epiderme. Abreviações: Ce (Ceras epicuticulares); Es (Estômato); Dc (Desestruturação da cera); Rp (Ruptura); Tt (Tricoma tector); EM (Entre meio da folha); M (Margem da folha); MF (Meio da folha). Barras: 5 µm (C, E, J), 10 µm (A, B, D, F, G), 50 µm (I) e 100 µm (H).....	13
Figura 3. Estrutura foliar de <i>Bauhinia variegata</i> , em secção transversal, no tratamento controle (A) e quando expostas a 400 (B-C), 800 (D), 1.600 (E-G) e 2.400 g i.a ha ⁻¹ (H-I) de diurom. A: Lâmina foliar. B: Região do meio da folha com tecidos íntegros. C: Região da margem da folha com acúmulo de compostos fenólicos (ponta de seta) e plasmólise do parênquima (*); D: Região do meio da folha com compactação do limbo foliar e plasmólise das células da epiderme abaxial (→); E-F e H: Regiões da margem, meio e entre meio da folha com colapso de células e perda da continuidade da epiderme. G e I: Regiões do meio do mesofilo completamente plasmolizado (*). Abreviaturas: Ed (Epiderme da face adaxial); Eb (Epiderme da face abaxial); Es (Estômato); Mc	

(Monocristais); Pp (Parênquima paliçádico); Pl (Parênquima lacunoso). Barras: 200 μm14

Figura 4. Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A, A), condutância estomática (g_s , B), taxa transpiratória (E , C) e relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a , D) nas plantas de *Bauhinia variegata* em resposta à interação entre as doses crescentes do diurom e das horas após aplicação do herbicida (HAA). Os dados são médias de $n=5$15

Figura 5. Rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) (A, B), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y_{II}) (C, D) e taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) (E, F) nas plantas de *Bauhinia variegata* em resposta à interação entre as doses crescentes do diurom e das horas após aplicação do herbicida (HAA). Os dados são médias de $n=5$. A escala de cor, abaixo das imagens, corresponde aos valores de 0 (preto) a 1(rosa).....17

Figura 6. Rendimento quântico regulado da dissipação de energia não fotoquímica (Y_{NPQ}) (A, B), rendimento quântico não regulado da dissipação de energia não-fotoquímica do fotossistema II (Y_{NO}) (C, D) e fluorescência inicial (F_0) (E, F) nas plantas de *Bauhinia variegata* em resposta à interação entre as doses crescentes do diurom e das horas após aplicação do herbicida (HAA). Os dados são médias de $n=5$. A escala de cor, abaixo das imagens, corresponde aos valores de 0 (preto) a 1(rosa).....18

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES

<i>A</i>	Taxa fotossintética	($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
ATP	Adenosina trifosfato	
C_i/C_a	Relação entre concentração interna e externa de CO_2	
<i>E</i>	Taxa transpiratória	($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
<i>ETR</i>	Taxa relativa de transporte de elétrons	
FSII	Fotossistema II	
F_v/F_m	Rendimento quântico potencial do fotossistema II	
F_0	Fluorescência inicial	
g_s	Condutância estomática	($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
HAA	Horas após a aplicação	
IRGA	Analizador de gases no infravermelho	
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido	
<i>PAR</i>	Radiação fotossinteticamente ativa	($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
Q_b	Plastoquinona b	
Y_{II}	Rendimento quântico efetivo do fotossistema II	
Y_{NPQ}	Rendimento quântico regulado da dissipação de energia não fotoquímica do fotossistema II.	
Y_{NO}	Rendimento quântico não regulado da dissipação de energia não fotoquímica do fotossistema II.	

RESUMO

LIMA, DÊMILY ANDRÔMEDA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2016. Alterações morfoanatômicas e fisiológicas em plantas não alvo de *Bauhinia variegata* L. como indicadoras da ação do herbicida diurom. Orientadora: DSc. Marisa Domingos. Coorientadores: Dsc. Alan Carlos Costa, DSc. Adriano Jakelaitis e DSc. Caroline Müller.

A ampla utilização do herbicida diurom na cultura de cana-de-açúcar tem comprometido áreas não cultivadas, e pode culminar em danos severos ao ambiente, como toxicidade aguda e/ou crônica às plantas não alvo. Espécies vegetais sensíveis a estresses antrópicos têm sido utilizadas para delimitar e prever efeitos de substâncias tóxicas no meio ambiente e em plantas não alvo, método denominado biomonitoramento ambiental. Com isso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar respostas morfoanatômicas e fisiológicas em plantas de *Bauhinia variegata* L. a diferentes doses do diurom, buscando caracterizar seu potencial bioindicador da toxidez deste herbicida. Mudanças de *B. variegata* com 90 dias de idade foram transplantadas para vasos de 10 L. Após um período de aclimação (aproximadamente 30 dias), foram aplicados os tratamentos consistindo das seguintes doses de diurom: 0 (controle), 400, 800, 1.600 e 2.400 g i.a ha⁻¹. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, em esquema fatorial 5 x 5, sendo cinco doses de diurom e cinco tempos de avaliação e cinco repetições por tratamento. Foram avaliadas morfologia e anatomia foliar, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*. O herbicida diurom alterou de forma severa,

desde a menor dose aplicada, as características morfoanatômicas e fisiológicas das plantas. Os efeitos observados, como os sintomas visíveis, alterações na distribuição das ceras no limbo foliar e danos no parênquima clorofiliano podem ser considerados biomarcadores adicionais da ação do diurom. Já as alterações na ETR , Y_{II} e F_v/F_m são bons biomarcadores da ação do herbicida em plantas não alvo, visto que são medidas não destrutivas.

PALAVRAS-CHAVES: Cerrado, biomonitoramento, injúria visível, fluorescência da clorofila *a*, fotossíntese.

ABSTRACT

LIMA, DÊMILY ANDRÔMEDA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, August 2016. Morpho-anatomical and physiological changes in nontarget plants of *Bauhinia variegata* L. as indicators of the herbicide diuron action. Advisor: Dsc. Marisa Domingos. Co-advisors: Dsc. Alan Carlos Costa, DSc. Adriano Jakelaitis and DSc. Caroline Müller.

The wide use of diuron herbicide in sugarcane lands has compromised surrounding uncultivated areas, which may result in acute and/or chronic damage in non-target plants, among other toxic effects in the environment. Sensitive plant species to anthropogenic stressors have been used to delimit and predict effects of toxic substances in the environment and in non-target plants, a method called environmental biomonitoring. Thus, the aim of this research was to evaluate physiological and morphoanatomic responses in *Bauhinia variegata* L. plants to different doses of diuron to characterize its bioindicator potential for indicating its occurrence in phytotoxic levels in the environment. Seedlings of *B. variegata* 90 day-old were transplanted into 10 liter pots. After acclimatization period (about 30 d) treatments consisting of diuron doses were applied: 0 (control), 400, 800, 1600 and 2400 g ai ha⁻¹. The experiment was conducted in a randomized block design, in a 5 x 5 factorial scheme with five doses of diuron and five evaluation times and five replicates per treatment. Gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, anatomy and morphology were evaluated. The herbicide diuron changed starkly the physiological and anatomical characteristic of plants from

the lowest dose applied. The effects observed, such as the visible symptoms and changes in the ETR , Y_{II} and F_v/F_m , were considered adequate biomarkers of diuron action on non-target plants. Therefore, we concluded that *B. variegata* is sensitive to diuron herbicide and has potential as bioindicators.

KEY WORDS: Cerrado, biomonitoring, visible injury, chlorophyll *a* fluorescence, photosynthesis.

ALTERAÇÕES MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS EM PLANTAS NÃO ALVO DE *Bauhinia variegata* L. COMO INDICADORAS DA AÇÃO DO HERBICIDA DIUROM

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

1. INTRODUÇÃO

Extensas áreas do Cerrado têm sido continuamente substituídas por áreas plantadas, e já levou a perda de 53 % das áreas naturais nos últimos 30 anos (Beuchle et al., 2015). Além disso, a expansão agrícola aumenta a demanda do uso de agrotóxicos (Egan et al., 2014), atualmente também referidos como defensivos agrícolas (Lei 3.200/15) (Brasil, 2016). Tem ocorrido tanto a diversificação quanto o aumento da quantidade de herbicidas aplicados (Spadotto et al., 2006; Schmitz et al., 2014), podendo contaminar as áreas de vegetação natural próximas às cultivadas. A preocupação em proteger a vegetação nativa estimulou a criação da lei, em 1981 e atualizada em 2012 pela Lei de Proteção Ambiental 12.651 (Brasil, 2012), que determina a manutenção mínima de 35 % de reserva legal no Cerrado. Estas áreas, no entanto, normalmente margeiam ou são circundadas pelos cultivos, de modo que a lei, mesmo que seja cumprida, não impede a exposição de plantas não alvo à ação dos defensivos agrícolas (Boutin et al., 2012; Žaltauskaitė e Kišonaitė et al., 2014).

Dentre as culturas extensivamente cultivadas na região de Goiás, no Centro Oeste brasileiro, destacam-se a *Glycine max* (soja), *Zea mays* (milho) e a *Saccharum*

officinarum (cana-de-açúcar). A produção de cana-de-açúcar, em particular, tornou o Brasil líder mundial na agroindústria sucroalcooleira (Rosolen et al., 2015). O estado de Goiás apresentou a maior produtividade nacional na safra 2015/16 com incremento em 10% na área cultivada (Conab, 2015). Entre os defensivos agrícolas indicados para esta cultura, o uso de herbicidas à base de ureia e triazinas como o diurom (Diuron®), tem tido grande destaque (Britto et al., 2012). Apesar de já ter sido regulado pela legislação brasileira (Brasil, 2004), o diurom tem sua utilização restrita em alguns estados, como Paraná, por causa da carga tóxica elevada.

O diurom [N-(3,4-dichlorophenyl)-N, N-dimethylurea], pertencente ao grupo químico das ureias (Fufezan et al., 2002; Kumar et al., 2014), é caracterizado como herbicida seletivo e de ação sistêmica. O produto pode ser absorvido via radicular e translocado pelo xilema para toda a planta quando aplicado em pré-emergência ou, ainda absorvido, via foliar quando aplicado em pós-emergência (Oturán et al., 2008; Ali et al., 2014). Como mecanismo de ação, é descrito por inibir o fotossistema II da cadeia transportadora de elétrons cloroplastídica (Sandoval-Carrasco et al., 2013).

Os efeitos de herbicidas inibidores de fotossistemas em plantas não alvo são distintos, incluindo: sintomas visíveis, como os observados em plantas tratadas com diurom, que apresentam cloroses e necroses nas regiões internervais das folhas, bem como murchamento foliar (Bell e Duke, 2005), alterações nas ceras epicuticulares (Sadler et al., 2016), danos morfoanatômicos nas folhas (Moskova et al., 2011) e danos fotoquímicos (Goltsev et al., 2001). Ainda podem causar estímulo ou redução no crescimento das plantas (Magnucka et al., 2014; El-Nahhal e Hamdona, 2015) e efeitos negativos na produção de sementes (Oswalt et al., 2014). Devido a sua eficácia mesmo em baixas concentrações, o diurom tem sido referência para avaliar os impactos de herbicidas em espécies não alvo (Holmes, 2014).

O monitoramento ambiental, com o uso de espécies bioindicadoras, caracterizadas por apresentar sensibilidade ao fator de estresse (Andrea, 2008; Yamashita et al., 2013), tem sido um método chave para entender o efeito de substâncias tóxicas em plantas não alvo (Rocha et al., 2013). A caracterização de plantas bioindicadoras pode ser feita através das respostas bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histológicas à exposição aos poluentes, permitindo identificação de biomarcadores ao estresse (Rai, 2016).

Assim, a seleção de espécies capazes de indicar o efeito dos herbicidas em áreas nativas do Cerrado se torna crucial para definir estratégias eficientes no monitoramento de impacto sobre a vegetação nativa. As espécies do gênero *Bauhinia*, popularmente conhecidas como pata-de-vaca, são geralmente encontradas na forma de arbustos ou árvores, no entorno ou no interior das matas (Caron et al., 2014), bem como em áreas urbanas. Além da ampla distribuição geográfica e da taxa de crescimento moderado (Martinelli-Senem et al., 2006), *Bauhinia variegata* Linn. possui características que favorecem a sua utilização para estudos de impactos ambientais, já que sua anatomia (Lusa e Bona, 2009) e morfologia (Abdel-Hameed et al., 2013) são bem conhecidas, além da caracterização botânica, ecológica (Vaz, 2016) e química (Reddy et al., 2003) já serem descritas.

Diante do exposto, trabalhou-se neste estudo com a hipótese de que plantas de *B. variegata* são afetadas pela ação da aplicação indireta do herbicida diurom.

2. OBJETIVO

Objetivou-se com este estudo avaliar respostas morfoanatômicas e fisiológicas em plantas de *Bauhinia variegata* L. às diferentes doses do diurom, buscando caracterizar o potencial bioindicador da toxidez deste herbicida em espécie não alvo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, Goiás, Brasil. Mudas de *Bauhinia variegata* com 90 dias de idade foram transplantadas para vasos de polietileno contendo 10 kg de substrato preparado a partir da mistura de duas partes de solo do tipo Latossolo Vermelho distroférico típico e uma parte de areia. De acordo com a análise química e física do solo, o substrato utilizado possui as seguintes características: pH H₂O – 5,8; P – 0,9 mg dm⁻³; K – 9 mg dm⁻³; Ca - 0,59 cmol_cdm⁻³; Mg – 0,17 cmol_cdm⁻³; Al – 0,05 cmol_cdm⁻³; H+Al – 1,8 cmol_cdm⁻³; S – 0,8 mg dm⁻³; B – 0,1 mg dm⁻³; Cu – 0,5 mg dm⁻³; Fe – 118 mg dm⁻³; Mn – 16,7 mg dm⁻³; Zn – 0,2 mg dm⁻³; Na – 1,8 mg dm⁻³; SB – 30 %; CTC – 2,6 cmol_cdm⁻³; M.O. – 6,2 %; argila – 38,5%; silte– 7,5 % e areia – 54 %. O substrato, em cada vaso, foi adubado com 3,84 g de mono-amônio fosfato (MAP); 2 g de sulfato de potássio (K₂SO₄); 1,3312 g de ureia; 0,072 g de ácido bórico e 0,12 g de sulfato de zinco.

Após 30 dias de aclimação, as plantas foram pulverizadas com diurom nas doses de 400, 800, 1.600 e 2.400 g i.a ha⁻¹ correspondendo a 12,5, 25, 50 e 75 % da dose recomendada do produto para a cultura de cana-de-açúcar. Um grupo de plantas adicional foi mantido como controle. O herbicida foi aplicado no início da manhã, utilizando um pulverizador costal (Herbicat[®] Catanduva, Brasil) com pressão constante mantida por CO₂ comprimido, com barra contendo quatro pontas de pulverização e bico

da série (XRTeejet® - tipo leque modelo XR11002-VP). A pressão de serviço utilizada foi de 2,5 kgf cm⁻², proporcionando volume de calda de 300 L ha⁻¹.

No momento da aplicação, as condições ambientais indicavam temperatura 24,6 °C, vento 0,00305 m s⁻¹ e umidade relativa de 81,2 %, registradas pela estação meteorológica Kestrel 4000 (Pocket Weather Traker, Birmingham, MI, Estados Unidos).

Após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram mantidas no local por aproximadamente uma hora para secagem do produto e as avaliações iniciadas após três horas decorrentes da aplicação. Avaliações em curto intervalo de tempo foram realizadas uma vez que, em ensaio preliminar, foram observadas alterações na imagem da fluorescência da clorofila *a* e sintomas visíveis a partir das oito horas após aplicação do produto (dados não apresentados).

3.2. Análise de sintomas foliares visíveis

A caracterização dos sintomas visíveis foi realizada através de fotografias obtidas com uma câmera digital (Coolpix P600, Nikon, Japão), após 10, 33, 58 e 177 horas de aplicação (HAA), em folhas completamente expandidas, do primeiro ao quarto nó das folhas e que emergiram após o período de aclimatação. As folhas senescentes e que se desenvolveram em condições ambientais anteriores ao do experimento foram descartadas.

3.3. Análises anatômicas

Amostras foliares da margem, da região entre a margem e a nervura mediana (entre meio) e da região da nervura mediana (meio), de folhas completamente expandidas do terceiro ou quarto nó, foram seccionadas e fixadas em Karnovsky (Karnovsky, 1965). Após 24 h, as amostras foram previamente lavadas com tampão fosfato e desidratadas em série etílica crescente (10, 30, 50, 70 %, por 30 minutos cada) e armazenadas em álcool etílico 70 % para análises posteriores. As folhas utilizadas para as análises anatômicas foram coletadas após 177 HAA.

3.3.1. Análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliação da superfície foliar, amostras armazenadas em álcool etílico 70 % foram desidratadas em série etílica crescente (80, 90 e duas etapas a 100 %, por 10 minutos cada) e secas por ponto crítico de CO₂ (Autosamdri®, 815, Series A, Tousimis, Rockville, Estados Unidos) (Robards, 1978). Posteriormente, as amostras foram fixadas em fita adesiva sobre *stubs* e recobertas com ouro em metalizador (Desk V, Denton Vacuum, Moorestown, Estados Unidos), no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) da Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia. A observação e a captura de imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JSMIT300, Jeol, Akishima, Tokyo, Japão) no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI), Goiânia.

3.3.2. Análises em microscopia de luz

Para observação dos danos estruturais, amostras estocadas em álcool etílico 70 % (Johansen, 1940) foram desidratadas em série etílica e incluídas em 2-hidroxietilmetacrilato (Historesin, Leica, Heidelberg, Alemanha). As amostras foram seccionadas transversalmente (5 µm de espessura), em micrótomo rotativo (Modelo 1508R), coradas com azul de toluidina 0,05 % em tampão fosfato (0,1 M, pH 6,8) (O'brien et al., 1964) e montadas com verniz vitral Acrilex (Paiva et al., 2006). As imagens foram obtidas em microscópio motorizado (modelo BX61, Olympus, Tokyo, Japão) com câmera digital CCD acoplada (DP-72, Olympus) do Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde.

3.4. Avaliações Fisiológicas

3.4.1. Trocas Gasosas

As trocas gasosas das plantas de *B. variegata* foram mensuradas em folhas completamente expandidas após 3, 24, 48, 96 e 144 HAA. A taxa fotossintética (A , µmol CO₂ m⁻² s⁻¹), condutância estomática (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹), taxa transpiratória (E ,

mmol H₂O m⁻² s⁻¹) e relação entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a) foram mensuradas utilizando o analisador de gases ao infravermelho (IRGA, modelo LI-6400xtr, LI-COR, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos). As medições foram realizadas entre 9 h e 11 h da manhã utilizando radiação fotossinteticamente ativa (*PAR*) constante (1000 μmol fótons m⁻² s⁻¹), e concentração atmosférica de CO₂ (C_a) (~ 415 μmol mol⁻¹), temperatura (~ 25,5 °C) e umidade relativa (~ 74 %) ambientes.

3.4.2. Fluorescência da Clorofila *a*

As avaliações da imagem da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas 10, 33, 58 e 177 HAA, utilizando o fluorômetro modulado Imaging-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Os sinais de fluorescência em todos os pontos da área foliar analisada foram capturados por uma câmera CCD (*Charge Coupled Device*) acoplada ao aparelho que forneceu as imagens para o computador. Inicialmente foram realizadas avaliações nas folhas adaptadas ao escuro, com plantas aclimatadas por pelo menos 40 minutos a esta condição. Foram obtidas as variáveis de indução da fluorescência: fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m) e calculado o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII), $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Genty et al., 1989). Posteriormente, com as folhas expostas à iluminação actínica, acrescido de um pulso de luz actínica saturante foi possível obter as variáveis da fase lenta de indução da fluorescência como o rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no FSII (Y_{II}), o coeficiente de extinção não fotoquímica (Y_{NPQ}) e o rendimento quântico de energia dissipada não regulada no FSII (Y_{NO}). O Y_{II} foi utilizado, ainda, para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons, $ETR = Y_{II} \cdot PAR \cdot Abs_{leaf} \cdot 0,5$ (Bilger et al., 1995), onde *PAR* é o fluxo de fótons (1000 μmol m⁻² s⁻¹) incidente sobre a folha; Abs_{leaf} o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas; e, 0,5 o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996).

3.5. Análises Estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, com 5 repetições. As trocas gasosas foram avaliadas em esquema fatorial de 5 (doses) x 5

(tempos de avaliação), totalizando 125 unidades experimentais. A variável fluorescência da clorofila *a* também foi avaliada em esquema fatorial de 5 (doses) x 4 (tempos de avaliação), totalizando 100 unidades experimentais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ajustados aos modelos de regressão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Sistema de Análise de Variância (SISVAR, versão 5.6) e, para a confecção dos gráficos, foi utilizado o software Sigma Plot 11.0.

4. RESULTADOS

4.1. Sintomas visíveis

Nas folhas das plantas de *Bauhinia variegata*, foram detectadas despigmentações (cloroses) na superfície adaxial, após 10 horas da aplicação do herbicida em plantas tratadas a partir de 800 g i.a ha⁻¹ (Figura 1). A clorose ocorreu, inicialmente, nas regiões da lâmina foliar que tiveram contato direto com o herbicida (efeito pontual), progredindo para as regiões internervais, exibindo aspecto zebrado na folha como observado na dose 2.400 g i.a ha⁻¹ (Figura 1). Folhas novas emitidas posteriormente à aplicação do herbicida exibiam despigmentação.

Ao longo do tempo, em plantas tratadas com 1.600 e 2.400 g i.a ha⁻¹, observou-se o avanço de cloroses para necroses (Figura 1). As necroses de coloração amarronzada avançaram, a partir da base da lâmina, pelas nervuras medianas e laterais, tanto em áreas marginais quanto internervais (Figura 1). As regiões necróticas foram visualizadas concomitantemente com murchamento da lâmina foliar.

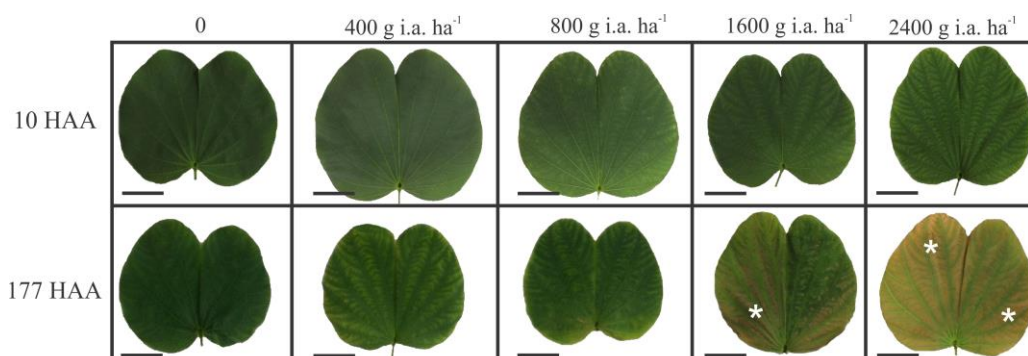


Figura 1. Sintomas visíveis da toxicidade do diurom em folhas de *Bauhinia variegata* em resposta às doses crescentes do herbicida e das horas após a aplicação. (*) Necroses. Barras: 3 cm.

4.2. Análises micromorfológicas

As superfícies foliares de *Bauhinia variegata* são recobertas com ceras epicuticulares (Figura 2A-B) no formato de placas verticais (Figura 2C). A superfície adaxial é glabra (Figura 2A) e a superfície abaxial é recoberta por tricomas tectores (Figura 2B) e em menor quantidade por tricomas glandulares. As folhas possuem epiderme unisseriada com células levemente arredondadas em ambas as faces (Figura 3A). As células epidérmicas da face adaxial são mucilaginosas e maiores em relação às da face abaxial (Figura 3A). As folhas são anfihipoestomáticas com estômatos localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 2B-C e 3A). O mesofilo dorsiventral é formado por duas ou três camadas de parênquima paliçádico e por três a quatro camadas de parênquima lacunoso (Figura 3A).

O diurom desencadeou alterações nas superfícies foliares e na estrutura foliar de plantas de *B. variegata* com danos progressivos de acordo com as doses aplicadas (Figuras 2D-J e 3B-I).

Houve desestruturação das ceras desde a menor dose, provocando alterações na distribuição das mesmas, em ambas as faces (Figura 2D e 2E), que foi intensificada com o incremento das doses do herbicida (Figura 2G-H). Regiões nas quais os danos foram mais conspícuos houve ruptura da epiderme na lâmina foliar (Figura 2J), promovendo a exposição do tecido interno.

As células da epiderme da face abaxial das plantas tratadas exibiram perda de turgor e achatamento da parede periclinal externa (Figura 3C-D), com danos progressivos em função do aumento das doses. A partir de 1600 g i.a ha⁻¹, houve alterações do relevo das células com a formação de concavidades (Figura 2F-G), além de maior área com regiões enrugadas pela perda da turgescência (Figura 2I) progredindo para áreas totalmente plasmolisadas (Figura 2H). Na epiderme da face adaxial da folha, ocorreram os mesmos padrões de danos nas células epidérmicas da superfície abaxial, com danos severos nas maiores doses, ocasionando perda da continuidade da epiderme (Figura 3F e 3H). Não foram observados danos diretos decorrentes da aplicação do diurom nos estômatos, em ambas as faces (Figura 2E-F, 2I, 3C, 3E-F e 3I). Porém, foi notável que os tricomas foram afetados nas maiores doses, com colapso das células, perda da turgescência, conferindo-lhes aspecto retorcido (Figura 2F, 2H e 2J).

Nas plantas submetidas a 800 g i.a ha⁻¹ do herbicida, observou-se, também, colapso de células do parênquima paliçádico e redução na espessura do limbo foliar (Figura 3D). A partir de 1.600 g i.a ha⁻¹, o dano foi acentuado, alastrando-se por todo o mesofilo, chegando a atingir as duas faces da folha (Figura 3G e 3I). Vale ressaltar que, independente da dose aplicada, não houve distinção dos danos com relação à região da lâmina foliar (meio, entre meio e margem). Destaca-se, ainda, que o efeito progressivo está principalmente relacionado à porcentagem da área do mesofilo afetada (Figura 3B-C).

Foi evidente o acúmulo de compostos fenólicos nas células (Figura 3C e 3D), desde a menor dose, seguido de deformação na parede celular e necroses pontuais nas nervuras.

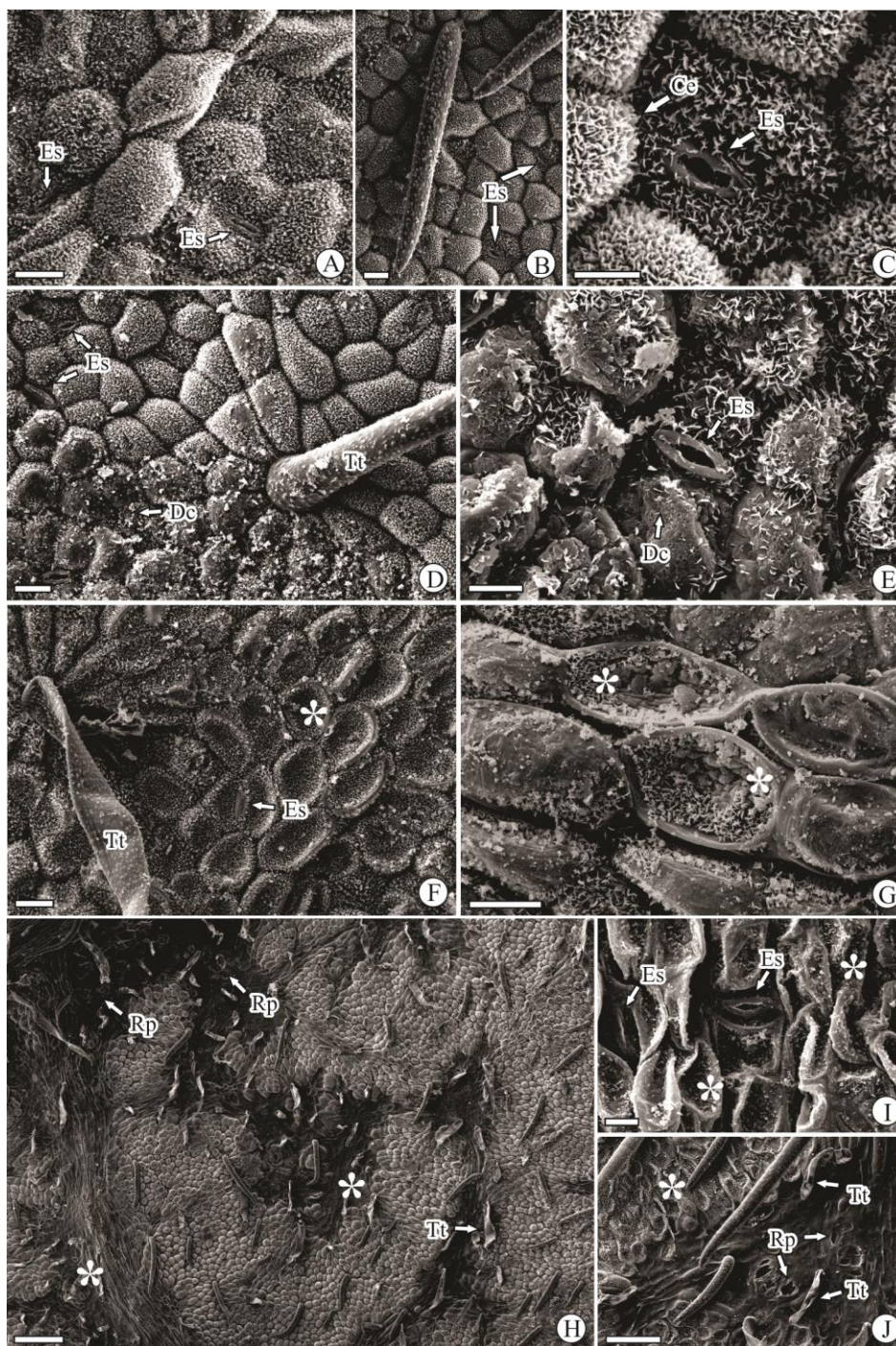


Figura 2. Superfície foliar de *Bauhinia variegata* em microscopia eletrônica de varredura. Tratamento controle (A-C) e quando expostas a 400 (D), 800 (E), 1.600 (F e G) e 2.400 g i.a ha⁻¹ (H-J) de diurom. A-B: Faces adaxial (A) e abaxial (B) da região EM. Contorno das paredes anticlinais nítido. C: Face abaxial (Região EM). Detalhe do estômato e das ceras epicuticulares no formato de placas (→). D-E: Face abaxial (Região EM (D) e M (E) da folha), desestruturação e alterações na distribuição da cera. F-G: Face abaxial e adaxial (Região MF). Alterações no contorno das paredes anticlinais (*) e aglomerados de ceras epicuticulares. H-J: Face abaxial (Região M (H) e MF (I-J)). Células totalmente plasmolizadas (*) e tricomas danificados (→). I: Mudanças no relevo da superfície foliar (*). J: Ruptura da epiderme. Abreviações: Ce (Ceras epicuticulares); Es (Estômato); Dc (Desestruturação da cera); Rp (Ruptura); Tt (Tricoma tector); EM (Entre meio da folha); M (Margem da folha); MF (Meio da folha). Barras: 5 µm (C, E, J), 10 µm (A, B, D, F, G), 50 µm (I) e 100 µm (H).

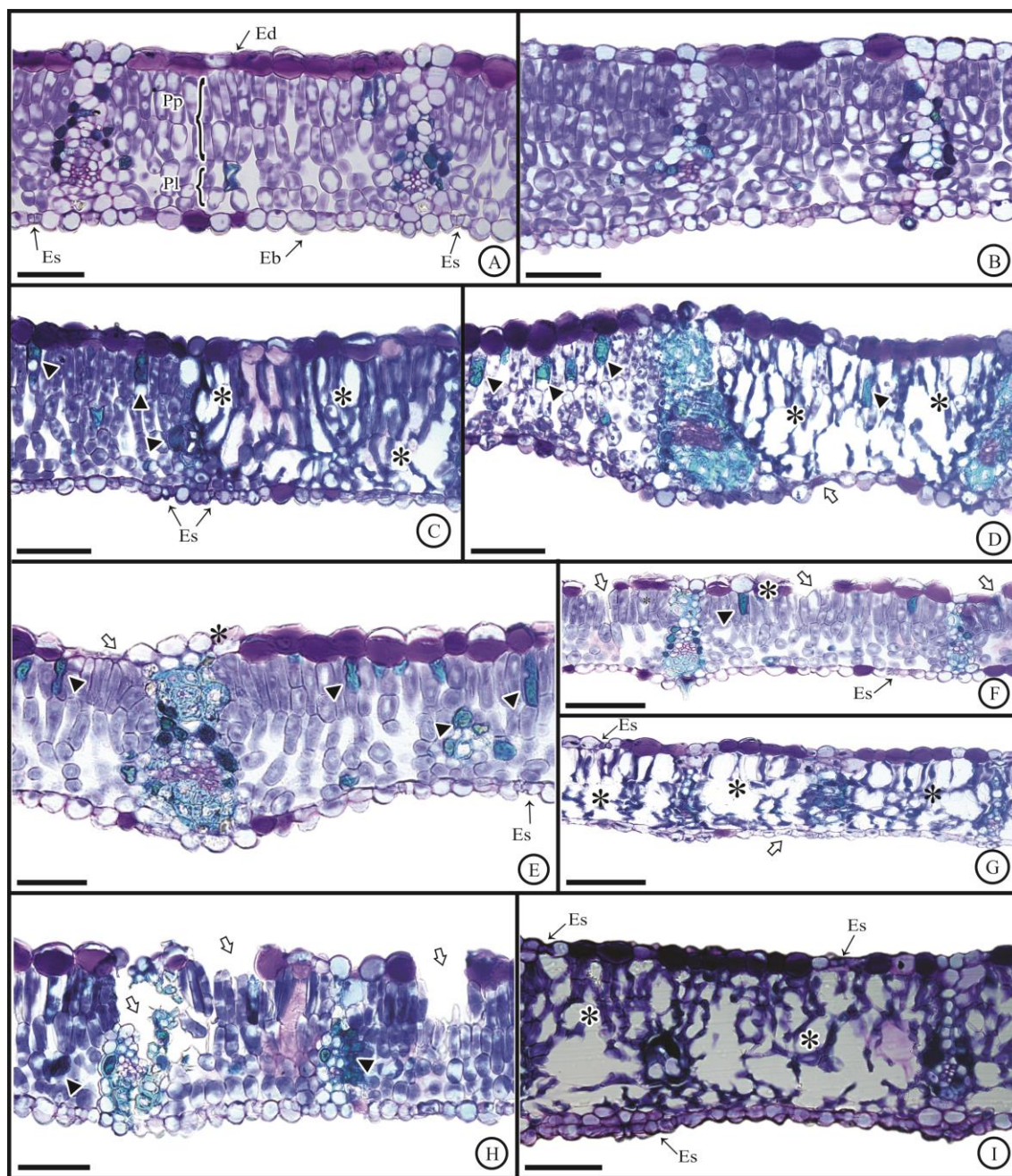


Figura 3. Estrutura foliar de *Bauhinia variegata*, em secção transversal, no tratamento controle (A) e quando expostas a 400 (B-C), 800 (D), 1.600 (E-G) e 2.400 g i.a ha⁻¹ (H-I) de diurom. A: Lâmina foliar. B: Região do meio da folha com tecidos íntegros. C: Região da margem da folha com acúmulo de compostos fenólicos (ponta de seta) e plasmólise do parênquima (*); D: Região do meio da folha com compactação do limbo foliar e plasmólise das células da epiderme abaxial (→); E-F e H: Regiões da margem, meio e entre meio da folha com colapso de células e perda da continuidade da epiderme. G e I: Regiões do meio do mesófilo completamente plasmolizado (*). Abreviaturas: Ed (Epiderme da face adaxial); Eb (Epiderme da face abaxial); Es (Estômato); Pp (Parênquima paliçádico); Pl (Parênquima lacunoso). Barras: 200 µm.

4.3. Trocas Gasosas

O herbicida diurom causou reduções gradativas na taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s) e taxa transpiratória (E) das plantas de *B. variegata* em função das doses e das horas após aplicação (HAA). A A diminuiu acentuadamente em função do aumento das doses do diurom, sobretudo às 144 HAA (Figura 4A) com reduções superiores a 98% nas plantas tratadas com a maior dose. Comportamento semelhante foi observado para g_s e E nas plantas tratadas com as maiores doses, em que o diurom promoveu reduções acentuadas ao longo do tempo de avaliação (Figura 4B e 4C). Por outro lado, verificou-se aumento gradativo da C_i/C_a em função do aumento das doses e do tempo após aplicação do herbicida (Figura 4D).

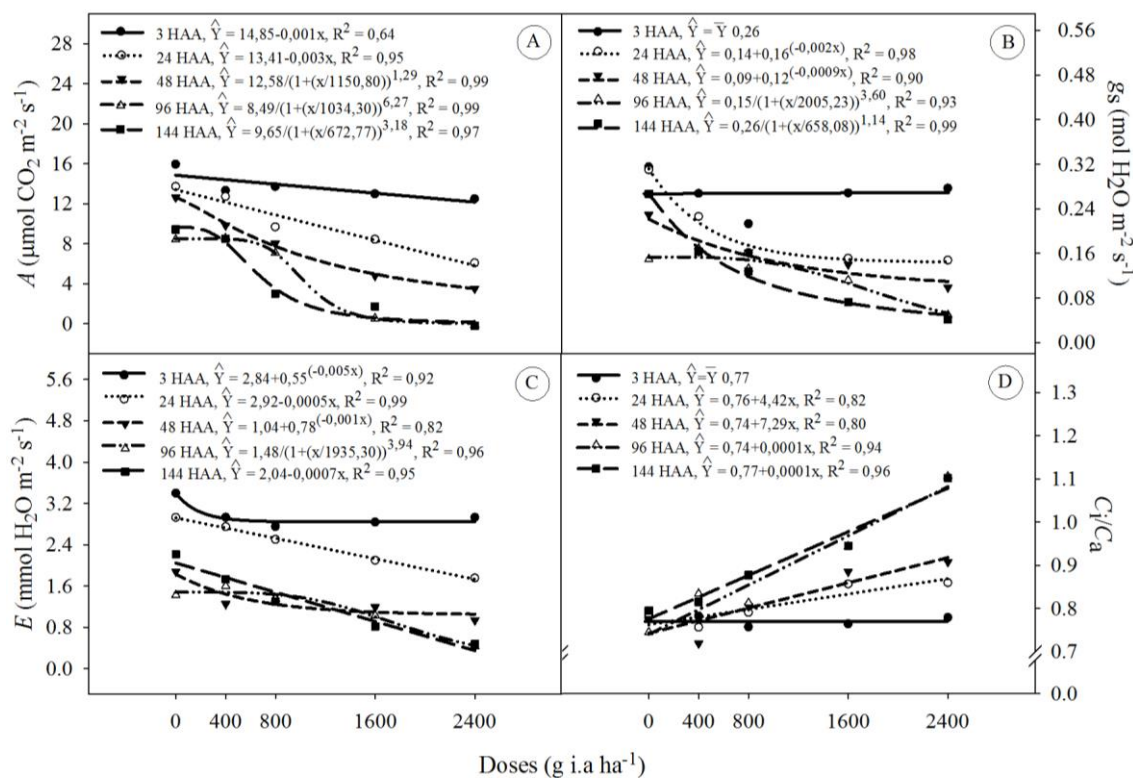


Figura 4. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A , A), condutância estomática (g_s , B), taxa transpiratória (E , C) e relação entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a , D) nas plantas de *Bauhinia variegata* em resposta à interação entre as doses crescentes do diurom e das horas após aplicação do herbicida (HAA). Os dados são médias de $n = 5$.

4.4. Fluorescência da clorofila *a*

O diurom afetou as características da fluorescência da clorofila *a*. Este efeito foi intensificado ao longo do tempo. Plantas tratadas com as maiores doses do herbicida exibiram menores valores no rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) (Figura 5A e 5B), as diferenças mais acentuadas no parâmetro foram às 58 HAA em todos os tratamentos.

O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y_{II}) reduziu drasticamente em função do aumento das doses de diurom e do tempo após a aplicação, culminando com a completa inibição na maior dose e tempo avaliados (Figura 5C e 5D). Da mesma forma o transporte de elétrons através do fotossistema II (ETR), também foi completamente paralisado nestas mesmas condições (Figura 5E e 5F).

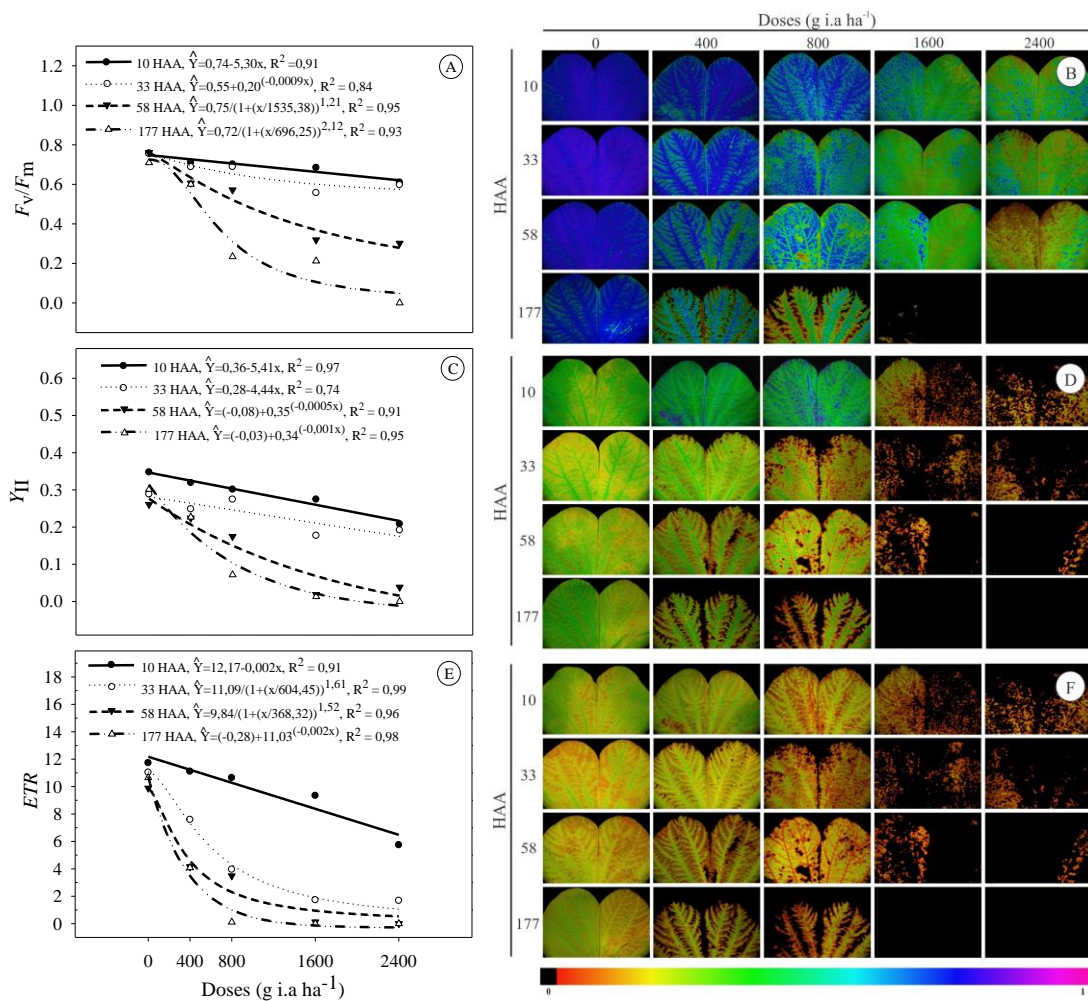


Figura 5. Rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) (A, B), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y_{II}) (C, D) e taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) (E, F) nas plantas de *Bauhinia variegata* em resposta à interação entre as doses crescentes do diurom e das horas após aplicação do herbicida (HAA). Os dados são médias de $n=5$. A escala de cor, abaixo das imagens, corresponde aos valores de 0 (preto) a 1 (rosa).

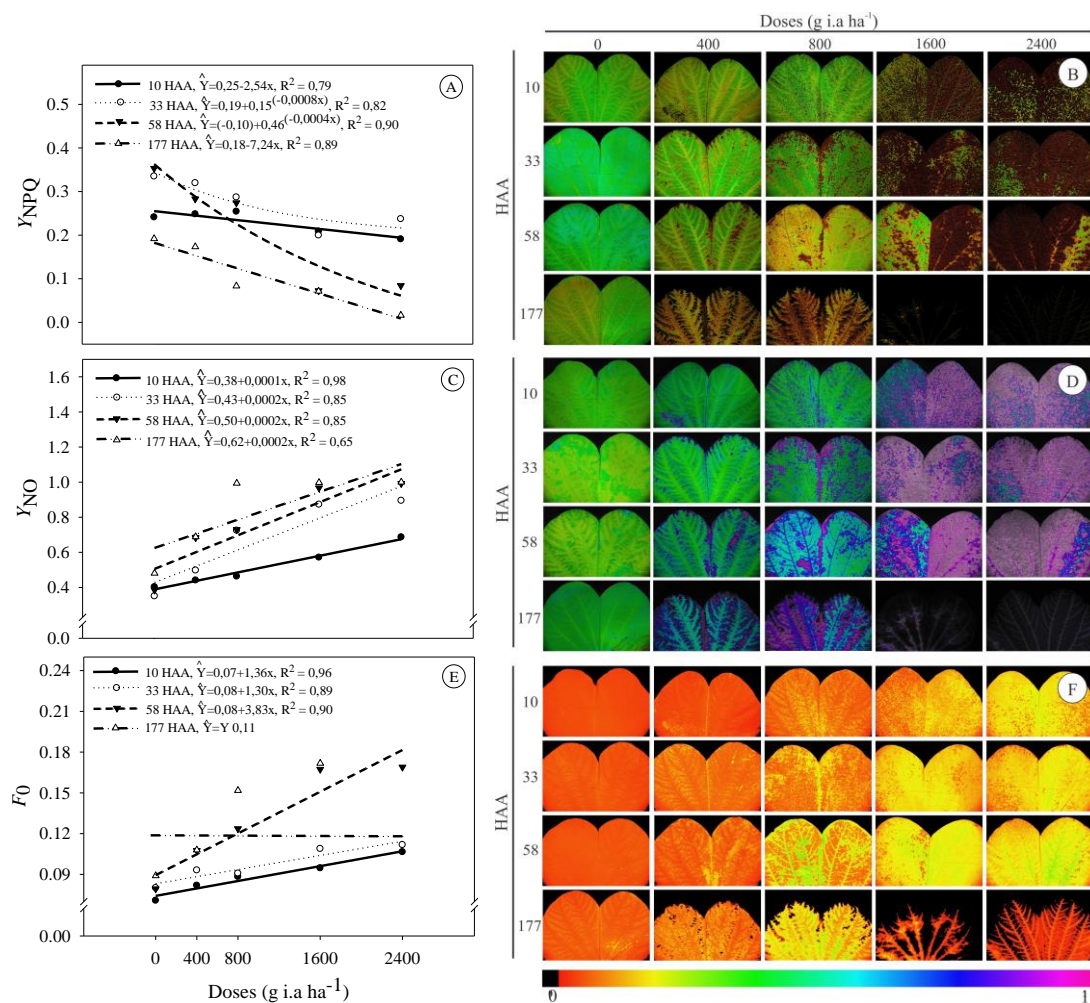


Figura 6. Rendimento quântico regulado da dissipação de energia não-fotoquímica (Y_{NPQ}) (A, B), rendimento quântico não regulado da dissipação de energia não-fotoquímica do fotossistema II (Y_{NO}) (C, D) e fluorescência inicial (F_0) (E, F), nas plantas de *Bauhinia variegata* em resposta à interação entre as doses crescentes do diuron e das horas após aplicação do herbicida (HAA). Os dados são médias de $n=5$. A escala de cor, abaixo das imagens, corresponde aos valores de 0 (preto) a 1 (rosa).

5. DISCUSSÃO

O herbicida diurom promoveu alterações na estrutura foliar e na fisiologia das plantas de *Bauhinia variegata*. As injúrias visíveis observadas nas plantas nesse estudo, assim como em *Nicotiana tabacum* L. (Buschmann e Litchenthaler, 1998) e *Digitalis purpúrea* L. (Lichtenthaler e Miehe, 1997), quando expostas ao diurom, são decorrentes de danos celulares, como a peroxidação lipídica (Fayez et al., 2014). As cloroses e necroses foliares observadas podem ser pela maior produção de espécies reativas de oxigênio, associadas aos danos no parênquima clorofiliano e a possível degradação de clorofilas. Normalmente, o excesso de energia não dissipado fotossinteticamente, na forma de calor ou de fluorescência, pode acumular nas plantas e promover o estresse oxidativo (Islam et al., 2016). Em condições fisiológicas normais, existe equilíbrio entre a produção e remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Christou et al., 2014), que é alterado em situação de estresse ocasionando o aumento da produção de EROs.

Mesmo após a aplicação do herbicida, foi possível detectar sintomas em folhas que não tiveram contato com o mesmo, em função de sua característica sistêmica, como observado nas folhas jovens emitidas após a aplicação. Para estudos de biomonitoramento, essa sintomatologia é essencial visto a oportunidade de rastrear a ação do herbicida em período posterior à aplicação. Assim, as plantas de *B. variegata*, avaliadas nesse estudo, podem ter destaque em estudos de monitoramento, pela rapidez com que responde ao herbicida e à posteridade dos sintomas.

A face adaxial da folha, com maior contato com o herbicida, apresentou injúrias mais severas, como a perda da continuidade da epiderme. Tal dano é comumente associado à herbicidas de contato, como observado em plantas de *Psoralea corylifolia*

L. tratadas com o gramoxone (Mahakhode e Somkuwar, 2012). Plantas de *B. variegata* possuem, ainda, número reduzido de estômatos na face adaxial, além de não apresentarem danos nas células-guarda, e sugere que a via estomática seja uma rota improvável da absorção do diurom. O acúmulo de gotas na superfície foliar favorece a remoção da camada de ceras epicuticulares e a desestruturação da cutícula (Gouret et al., 1993; Yilmaz e Dane, 2012), podendo ter facilitado a entrada do herbicida no interior dos tecidos foliares de *B. variegata*.

A absorção das moléculas do diurom, ainda, pode estar associada com as interações químicas que estas causam na estrutura da cutícula. Herbicidas com moléculas grandes e que possuem grande quantidade de elétrons livres provocam ruptura da cutícula. Esta instabilidade das moléculas que compõem os poros cuticulares pode promover outras reações químicas resultando na ampliação dos poros e no aumento da difusão do produto no interior da folha. Ao penetrar nas células epidérmicas, o herbicida promove a plasmólise destas (Hess e Falk, 1990; Hart et al., 1995; Monquero et al., 2004; Malpasse, 2006; Alves et al., 2014; Hajri et al., 2016).

Alterações nos espaços intercelulares podem facilitar a difusão do herbicida no limbo foliar (Galvani et al., 2012; Barroso et al., 2015). O aumento desses espaços intercelulares, como consequência da aplicação do diurom, foi ocasionado pelo colabamento celular, promovendo danos no parênquima clorofiliano e na fotossíntese. O acúmulo de compostos fenólicos, observado na estrutura foliar das plantas deste estudo, após a aplicação do diurom pode ser apontado como mecanismo de proteção contra o agente estressor (Vaughn e Duke, 1984). No entanto, esse mecanismo não foi suficiente para impedir que os danos fossem exacerbados nas maiores doses do diurom.

Devido ao mecanismo de ação do diurom, eram esperadas alterações na fotossíntese das plantas. Porém, não em tão curto intervalo de tempo e de forma tão drástica, sobretudo em subdosagens do produto. A ausência de danos nos estômatos e as reduções na taxa fotossintética com simultâneo decréscimo na condutância estomática e aumento na relação entre a concentração interna e externa de CO₂, conforme observado neste estudo, indicam que o diurom promoveu limitações não estomáticas da fotossíntese das plantas de *B. variegata*. O comprometimento do fotossistema, pela inativação do centro de reação decorrente da ação do diurom, impede a manutenção da cadeia transportadora de elétrons (Kumar et al., 2014; Dayan e Zaccaro, 2012), limitando a produção de ATP e NADPH (Ashraf e Harris, 2013). Esses produtos são

requeridos no ciclo de Calvin, fase redutiva do carbono no processo fotossintético. Assim, a limitação na produção de ATP e poder redutor compromete a carboxilação do CO_2 (Dupraz et al., 2016) e, conseqüentemente, o processo fotossintético. Associadas às diminuições nos rendimentos quânticos do FSII e na taxa relativa de transporte de elétrons, essas alterações confirmam a ocorrência de fotoinibição (Correa e Alves, 2010) promovida pelo herbicida nas plantas de *B. variegata*. A fotoinibição, ainda, pode estar associada ao fotodano da proteína D1 (Zer e Ohad, 1995), devido à correlação direta entre os graus de inativação do FSII e de ligação de inibidores específicos para o sítio da Q_b , como o diurom. A atuação do diurom como acceptor alternativo da Q_b , na proteína D1, bloqueia o transporte de elétrons e causa a redução na *ETR*, como já observado em plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. (Belapart et al., 2013), e *Cucumis sativus* L. (Dayan e Zaccaro, 2012). Diferentes estresses abióticos também culminam em redução no transporte de elétrons e no Y_{II} (Anjos et al., 2012), considerados excelentes indicadores de estresse (Ventrella et al., 2010; Guidi e Degl'Innocenti, 2011; Girotto et al., 2012).

Em situações adversas, as plantas ativam mecanismos de supressão do estresse como a dissipação do excesso de energia via fluorescência no complexo antena (Demmig et al., 1987; Baker e Rosenqvist, 2004), ou, ainda, via dissipação térmica (Y_{NPQ}) (Guirao et al., 2013), relacionada ao ciclo das xantofilas (Niyogi et al., 1997; Baroli e Niyogi, 2000). Nas plantas deste estudo, no entanto, o aumento da dissipação de energia não foi suficiente para amenizar os efeitos negativos do diurom. Foram observados, ainda, indicativos de danos aos centros de reação do FSII ou limitação na transferência da energia de excitação da antena para os centros de reação, pelo aumento de F_0 (Yuan et al., 2013). O aumento na dissipação na forma de fluorescência demonstra, ainda, que a energia absorvida não pode ser utilizada para os processos fotoquímicos (Vercamp et al., 2016).

Em virtude da sensibilidade exibida pelas plantas de *B. variegata* aos tratamentos com diurom, expressa por meio dos danos aos processos fotossintéticos (como os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*), alterações anatômicas e morfológicas, é possível afirmar que a espécie pode ser utilizada como bioindicadora da ação do herbicida em áreas não alvo. Dentre as características avaliadas, as não invasivas como *ETR*, Y_{II} e F_v/F_m , associadas aos sintomas visíveis podem ser utilizadas como biomarcadoras, bem como as alterações na distribuição das ceras no limbo foliar,

danos no parênquima clorofiliano e ausência de modificações específicas na morfologia dos estômatos. O conjunto desses fatores é importante indicativo de estresse por diurom que pode ser utilizado em estudos de monitoramento ambiental.

No entanto, por se tratar plantas arbóreas, quando bem estabelecidas, estas podem desenvolver mecanismos de defesa e se recuperarem da ação de herbicidas. O estágio de desenvolvimento pode tornar essas plantas mais ou menos vulneráveis ao efeito desses produtos (Karthikeyan et al., 2015). Assim sendo, as alterações morfoanatômicas e fisiológicas avaliadas, que contribuíram para elucidar os danos causados pelo herbicida diurom nas plantas jovens de *B. variegata*, podem se tornar menos evidentes na medida em que as plantas se desenvolvem. Portanto, recomenda-se a realização de experimentos mais longos, com os objetivos de observar se ocorrerá a recuperação das plantas em longo prazo e de determinar o período de tempo ideal após a exposição das plantas ao diurom, nas condições naturais, para ampliar a eficiência bioindicadora da espécie.

6. CONCLUSÕES

A partir dos parâmetros mensurados neste estudo, pode-se afirmar que o herbicida diurom comprometeu as características morfológicas, anatômicas e fotossintéticas de plantas jovens de *Bauhinia variegata* L, indicando que essa espécie arbórea é sensível às doses do herbicida diurom testadas e que, portanto, tem potencial para a bioindicação. Os efeitos observados, como os sintomas visíveis, as alterações na *ETR*, no Y_{II} e F_v/F_m são bons biomarcadores da ação do herbicida diurom em plantas não alvo, visto que são medidas não destrutivas e expeditas. As alterações na distribuição das ceras no limbo foliar e os danos no parênquima clorofiliano também podem ser considerados biomarcadores adicionais da ação do herbicida sobre as folhas da espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hameed, U.K., El-Magly, U.I., Ishak, I.F., Tantawy, M.E., 2013. A contribution to the specification of Caesalpinioideae (L) based on morphological and molecular criteria. Beni-Suef Univ. J. Basic and Appl. Sci. 2, 120-127.
- Ali, H.R., Arifin, M.M., Sheikn, M.A., Shazili, N.A.M., Bakari, S.S., Bachok, Z., 2014. Contamination of diuron in coastal waters around Malaysian Peninsular. Mar. Pollut. Bull. 85, 287-291.
- Alves, R.M., Inacio, E.M., Monquero, P.A., Meneghin, S.P., Hidrata, A.C.S., 2014. Leaf-surface characterization and the effects of the herbicide saflufenacil on the leaves of weeds. Rev. Bras. Ciênc. Agr. 9, 550-555.
- Andréa, M.M., 2008. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. Comunicado técnico: Instituto Biológico 83, 1-8.
- Anjos, L., Oliva, M.A., Kuki, K.N., 2012. Fluorescence imaging of light acclimation of Brazilian atlantic forest tree species. Photosynthetica 50, 95-108.
- Ashraf, M., Harris, P.J.C., 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. Photosynthetica 51, 163-190.
- Baker, N.R., Rosenqvist, E., 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. J. Exp. Bot. 55, 1607-1621.
- Baroli, I., Niyogi, K.K., 2000. Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. 355, 1385-1394.
- Barroso, A.A.M., Galeano, E., Albrecht, A.J.P., Reis, F.C., Victoria Filho, R., 2015. Does Sourgrass leaf anatomy influence glyphosate resistance? Comun. Sci. 6, 445-453.
- Belapart, D., Castro, E.B., Giroto, M., Nascimento, R.F., Junior, G.J.P., Simões, P.S., 2013. Avaliação da taxa de transporte de elétrons de misturas de herbicidas no controle de *B. decumbens* em pós-emergência. Rev. Cient. Elet. Agron. 24, 79-90.

- Bell, A.M., Duke, N.C., 2005. Effects of photosystem II inhibiting herbicides on mangroves – preliminary toxicology trials. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 297-307.
- Beuchle, R., Grecchi, R.C., Shimabukuro, Y.E., Seliger, R., Eva, H.D., Sano, E., Achard, F., 2015. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. *Appl. Geogr.* 58, 116-127.
- Bilger, W., Schreiber, U., Bock, M., 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102, 425-432.
- Boutin, C., Aya, K.L., Carpenter, D., Thomas, P.J., Rowland, O., 2012. Phytotoxicity testing for herbicide regulation: Shortcomings in relation to biodiversity and ecosystem services in agrarian systems. *Sci. Total Environ.* 415, 79-92.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 518 de 25 de março de 2004. Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf>. Acesso em 05 de out. 2015.
- Brasil. Lei n. 12.651 de 25 de maio de 2012. Proteção de vegetação nativa. Novo Código Florestal 2004. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/L12651compilado.htm> Acesso em 14 de março 2016.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Lei 3.200/15 de 24 de abril de 2016. Defensivos agrícolas. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/noticias/meio-ambiente/507918-projeto-regulamenta-uso-de-defensivos-agricolas-e-substitui-atual-lei-de-agrotoxicos.html>>. Acesso em 05 de set. 2016.
- Britto, F.B., Vasco, A.N., Pereira, A.P.S., Mélo Júnior, A.V., Nogueira, L.C., 2012. Herbicidas no alto rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos. *Rev. Ciênc. Agron.* 43, 390-398.
- Buschmann, C., Litchenthaler, H.K., 1998. Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *J. Plant Physiol.* 152, 297-314.
- Caron, B.O., Perrando, E.R., Schmidt, D., Manfron, P.A., Behling, A., Elli, E.F., Eloy, E., 2014. Relações fisiológicas em mudas de pata-de-vaca (*Bauhinia forticata* Link). *Rev. Bras. Plant. Med.* 16, 196-201.
- Christou, A., Manganaris, G.A., Fotopoulos, V., 2014. Systemic mitigation of salt stress by hydrogen peroxide and sodium nitroprusside in strawberry plants via transcriptional regulation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *Environ. Exp. Bot.* 107, 46-54.
- Conab – Companhia Nacional de Abastecimento, 2015. Acompanhamento da safra brasileira, safra 2015/16 – Terceiro Levantamento, 2, 1-65.
- Corrêa, M.J.P., Alves, P.L.C.A., 2010. Efeitos da aplicação de herbicidas sobre a eficiência fotoquímica em plantas de soja convencional e geneticamente modificada. *Ciênc. Agrotec.* 34, 1136-1145.

- Dayan, F.E., Zaccaro, M.L.M., 2012. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. *Pestic. Biochem. Physiol.* 102, 189-197.
- Demmig, B., Winter, K., Krüger, A., Czygan, F.C., 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves: A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy – Commentary. *Plant Physiology* 84, 218-224.
- Anjos, L., Oliva, M.A., Kuki, K.N., 2012. Fluorescence imaging of light acclimation of Brazilian atlantic forest tree species. *Photosynthetica* 50, 95-108.
- Dupraz, V., Coquillé, N., Ménard, D., Sussarellu, R., Haugarreau, L., Stachowski-Haberkorn, S., 2016. Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures. *Chemosphere* 151, 241-252.
- Egan, J. F., Bohnenblust, E., Goslee, S., Mortensen, D., Tooker, J., 2014. Herbicide drift can affect plant and arthropod communities. *Agric. Ecosyst. Environ.* 185, 77-87.
- El-Nahhal, Y., Hamdona, N., 2015. Phytotoxicity of alachlor, bromacil and diuron as single or mixed herbicides applied to wheat, melon, and molokhia. *Springer Plus* 4, 1-19.
- Fayez, K.A., Radwan, D.E.M., Mohamed, A.K., Abdelrahman, A.M., 2014. Fusilade herbicide causes alterations in chloroplast ultrastructure, pigment content and physiological activities of peanut leaves. *Photosynthetica* 52, 548-554.
- Fufezan, C., Rutherford, A.W., Krieger-Liszkay, A., 2002. Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 532, 407-410.
- Galvani, J., Rizzardi, M.A., Carneiro, C.M., Bianchi, M.A., 2012. Anatomia foliar de *Lolium multiflorum* sensível e resistente ao glyphosate. *Planta Daninha* 30, 407-413.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87-92.
- Giroto, M., Araldi, R., Velini, E.D., Trindade, M.L.B., Carbonari, C.A., 2012. Efeito do hexazinone isolado e em mistura na eficiência fotossintética de *Panicum maximum*. *Planta Daninha* 30, 341-347.
- Goltsev, V., Genkov, T., Lexa, M., Ivanova, I., 2001. Effects of benzyladenine, 4-PU-30 and thidiazuron on millisecond delayed and prompt chlorophyll fluorescence of *Dianthus caryophyllus* L. axillary buds cultured in vitro. *Sci. Hortic.* 89, 41-54.
- Gouret, E., Rohr, R., Chamel, A., 1993. Ultrastructure and chemical composition of some isolates plant cuticles in relation to their permeability to the herbicide, diuron. *New Phytol.* 124, 423-431.
- Guidi, L., Degl'Innocenti, E., 2011. Imaging of chlorophyll a fluorescence: A tool to study abiotic stress in plants. In: Sahnker, A., Abiotic stress in plants - mechanisms and adaptations. Ed. Tech Janeza Trdine: Rijeka, Croatia, pp. 3-20.

- Guirao, L.M., Ruiz, J.M., Gil, J.M.S., Esteller, J.B., Stinco, C.M., Martínez, M.A., 2013. Xanthophyll cycle-related photoprotective mechanism in the Mediterranean seagrasses *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* under normal and stressful hypersaline conditions. *Aquat. Bot.* 109, 14-24.
- Hajri, H., Mhadhebi, R., Ghorbel, A., Armstrong, J., Salem-Fnayou, A.B., 2016. Physiological and leaf ultrastructural characteristics of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) biotypes from Tunisia under sulfonyleurea herbicide application. *Sci. Hortic.* 207, 28-32.
- Hart, H., Hart, D.J., Craine, L.E., 1995. *Química Orgânica*, Mc Graw-Hill.
- Hess, F.D., Falk, R.H., 1990. Herbicide deposition on leaf surfaces. *Weed Sci.* 38, 280-288.
- Holmes, G., 2014. Australia's pesticide environmental risk assessment failure: The case of diuron and sugarcane. *Mar. Pollut. Bull.* 88, 7-13.
- Islam, F., Ali, B., Wang, J., Farooq, M.A., Gill, R.A., Ali, S., Wang, D., Zhou, W., 2016. Combined herbicide and saline stress differentially modulates hormonal regulation and antioxidante defense system in *Oryza sativa* cultivars. *Plant Physiol. Biochem.* 107, 82-95.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. McGraw Hill Book Company.
- Karnovsky, M.J.A., 1965. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137-138.
- Karthikeyan, R., Davis, L.C., Erickson, L.E., Al-Khatib, K., Kulakow, P.A., Barnes, P.L., Hutchinson, S.L., Nurzhanova, A.A. Studies on responses of non-target plants to pesticides: A review. Disponível em <<https://www.engg.ksu.edu/HSRC/karthipesticide.pdf>>. Acesso em 13 de jan. 2015.
- 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 51-71.
- Laisk, A., Loreto, F., 1996. Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* 110, 903-911.
- Lichtenthaler, H.K., Miehe, J.A., 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2, 316-320.
- Lusa, M.G., Bona, C., 2009. Análise morfoanômica comparativa da folha de *Bauhinia forticata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Acta Bot. Bras.* 23, 196-211.
- Magnucka, E.G., Pietr, S., Kozubek, A., Zarnowski, R., 2014. Various effects of the photosystem II – inhibiting herbicides on 5-*n*-alkylresorcinol accumulation in rye seedlings. *Pestic. Biochem. Physiol.* 116, 56-62.
- Mahakhode, R.H., Somkuwar, S.R., 2012. Effect of spray application of herbicide gramoxone on morphoanatomical characters of weed *Psoralea corylifolia* L. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 4, 64-66.

- Malpassi, R.N., 2006. Herbicide effects on cuticle ultrastructure in *Eleusine indica* and *Portulaca oleracea*. *Biocell* 30, 51-56.
- Martinelli-Senem, A., Possamai, E., Schuta, L.R., Vanzolini, S., 2006. Germinação e sanidade de sementes de *Bauhinia variegata*. *Rev. Árvore* 30, 719-724.
- Monquero, P.A., Christoffoleti, P.J., Matas, J.A., Heredia, A., 2004. Leaf surface characterization and epicuticular wax composition in *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* and *Amaranthus hybridus*. *Planta Daninha* 22, 203-210.
- Moskova, I., Todorova, D., Alexieva, V., Sergiev, I., 2011. Leaf morphology and histology changes of pea plants treated with hydrogen peroxide and paraquat. *C. R. Acad. Bulg. Sci.* 64, 1695-1700.
- Niyogi, K.K., Björkman, O., Grossman, A.R., 1997. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 14162-14167.
- O'brien, T.P., Feder, N., Mccully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59, 368-373.
- Oswalt, J.S., Rieff, J.M., Severino, L.S., Auld, D.L., Bednarz, C.W., Ritchie, G.L., 2014. Plant height and seed yield of castor (*Ricinus communis* L.) sprayed with growth retardants and harvest aid chemicals. *Ind. Crops Prod.* 61, 272-277.
- Oturan, N., Trajkovska, S., Oturan, M.A., Couderchet, M., Aaron, J.J., 2008. Study of the toxicity of diuron and its metabolites formed in aqueous medium during application of the electrochemical advanced oxidation process "electro-Fenton". *Chemosphere* 73, 1550-1556.
- Paiva, J.G.A., Fank-de-Carvalho, S.M., Magalhaes, M.P., Graciano-Ribeiro, D., 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem. *Acta Bot. Bras.* 20, 257-264.
- Rai, P.K., 2016. Impacts of particulate matter pollution on plants: Implications for environmental biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 129, 120-136.
- Reddy, M.V.B., Reddy, M.K., Gunasekar, D., Caux, C., Bodo, B., 2003. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. *Phytochemistry* 64, 879-882.
- Robards, A.W., 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. *Electron Microsc. Cytochem. Plant Cells* 343-403.
- Rocha, P.R.R., Faria, A.T., Silva, G.S., Queiroz, M.E.L.R., Guimarães, F.C.N., Tironi, S.P., Galon, L., Silva, A.A., 2013. Meia-vida do diuron em solos com diferentes atributos físicos e químicos. *Ciênc. Rural* 43, 1961-1966.
- Rosolen, V., De-Campos, A.B., Govone, J.S., Rocha, C., 2015. Contamination of wetland soils and floodplain sediments from agricultural activities in the Cerrado Biome (State of Minas Gerais, Brazil). *Catena* 128, 203-210.
- Sadler, C., Schroll, B., Zeisler, V., Waßmann, F., Franke, R., Schreiber, L., 2016. Wax and cutin mutants of *Arabidopsis*: Quantitative characterization of the cuticular transport barrier in relation to chemical composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 1336-44.

Sandoval-Carrasco, C.A., Ahuatz-Chacón, D., Galíndez-Mayer, J., Ruiz-Ordaz, N., Juárez-Ramírez, C., Martínez-Jerónimo, F., 2013. Biodegradation of a mixture of the herbicides ametryn and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in a compartmentalized biofilm reactor. *Bioresour. Technol.* 145, 33-36.

Schmitz, J., Hahn, M., Brühl, C.A., 2014. Agrochemicals in field margins – An experimental field study to assess the impacts of pesticides and fertilizers on a natural plant community. *Agric. Ecosyst. Environ.* 193, 60-69.

Spadotto, C.A., 2006. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. *Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar*. [online] Disponível em: <http://www.fmr.edu.br/npi_2.php>. Acesso em 05 de abril de 2016.

Vaughn, K., Duke, S.O., 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60, 106-112.

Vaz, A.M.S.F., 2016. *Bauhinia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB82666>>. Acesso em 18 de jan. 2016.

Ventrella, A., Catucci, L., Agostiano, A., 2010. Herbicides affect fluorescence and electron transfer activity of spinach chloroplasts, thylakoid membranes and isolated Photosystem II. *Bioelectrochemistry* 79, 43-49.

Vercampt, H., Koleva, L., Vassilev, A., Horemans, N., Biermans, G., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2016. The functional role of the photosynthetic apparatus in the recovery of *Brassica napus* plants from pre-emergent metazachlor exposure. *J. Plant Physiol.* 196, 99-105.

Yamashita, O.M., Orsi, J.V.N., Resende, D.D., Mendonça, F.S., Campos, O.R., Massaroto, J.A., Carvalho, M.A.C., Koga, P.S., Peres, W.M., Alberguini, A.L., 2013. Deriva simulada de herbicidas em mudas de *Coffea canephora*. *Sci. Agrar. Parana.* 12, 148-156.

Yilmaz, G., Dane, F., 2012. Phytotoxicity induced by herbicide and surfactante on stomata and epicuticular wax of wheat. *Rom. Biotechnol. Lett.* 17, 7757-7765.

Yuan, X., Guo, P., Qi, X., Ning, N., Wang, H., Wang, H., Wang, X., Yang, Y., 2013. Safety of herbicide Sigma Broad on Radix Isatidis (*Isatis indigotica* Fort.) seedlings and their photosynthetic physiological responses. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 45-50.

Žaltauskaitė, J., Kišonaitė, G., 2014. The effects of phenoxy herbicide MCPA on non-target vegetation in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) culture. *Biologija* 60, 148-154.

Zer, H., Ohad, I., 1995. Photoinactivation of photosystem II induces changes in the photochemical reaction center II abolishing the regulatory role of the QB site in the D1 protein degradation. *Eur. J. Biochem.* 231, 448-53.