

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

ANDRESSA APARECIDA RODRIGUES DE MELO

**ALTERAÇÕES MORFO-ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS DE
GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDOS AO DÉFICIT
HÍDRICO**

Ilha Solteira

2022

ANDRESSA APARECIDA RODRIGUES DE MELO

**ALTERAÇÕES MORFO-ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS
DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDOS AO
DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Ilha Solteira, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Agronomia (Sistema de Produção).
Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues dos Reis

Ilha Solteira

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

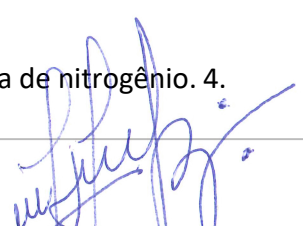
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Melo, Andressa Aparecida Rodrigues de.
M528a Alterações morfo-anatômicas e bioquímicas de genótipos de Feijão-caupi submetidos ao déficit hídrico / Andressa Aparecida Rodrigues de Melo. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2022
118 f. : il.

Dissertação (mestrado) -Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2022

Orientador: André Rodrigues dos Reis
Inclui bibliografia

1. Estresse hídrico. 2. Feijão-caupi. 3. Fixação biológica de nitrogênio. 4. Anatomia de nódulos.



João Josué Barbosa
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Diretor Técnico
CRB 8-5642

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Alterações morfo-anatômicas e bioquímicas de genótipos de feijão- caupi submetidos ao déficit hídrico.

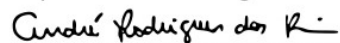
AUTORA: ANDRESSA APARECIDA RODRIGUES DE MELO

ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS

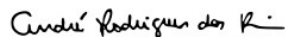
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA, área: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Biosistemas / FEI UNESP Tupa



Prof. Dr. MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP



Prof. Dr. JOÃO PAULO RODRIGUES MARQUES (Participação Virtual)
Departamento de Solos / Escola Superior de Agricultura

Ilha Solteira, 11 de fevereiro de 2022

DEDICO

Aos meus pais, Alfredo e Claudia,
e a toda minha família por todo o amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por TUDO!

Aos meus pais Alfredo e Claudia por todo apoio e amor. Aos meus irmãos Anderson, Aila, Amanda e Junior, por serem meu suporte e por tantos momentos de alegrias juntos.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Rodrigues dos Reis, pela oportunidade e por toda experiência compartilhada, todo suporte e amizade.

Aos meus professores da Pós-graduação pelo suporte e conhecimentos compartilhados, em especial ao professor Enes Furlani e Marcos Eustáquio.

A todos os servidores da UNESP, em especial a Yasmin e Jéssica pela atenção e assistência.

Aos amigos do grupo de estudos em fisiologia agrícola: Maria, Nema, Matheus, Márcio, Lara, Fagner e Maycon por todo auxílio nas atividades.

Aos meus amigos Trio do R: Luan e Lucy, por todos os momentos de risadas e confidencialidade.

Aos meus presentes de Tupã Maycon por toda parceria e amor, Lara por ser minha base e parceira pra tudo, Diva pelo acolhimento e carinho em todos os momentos.

Aos professores Dr. Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho e Dr. João Paulo Rodrigues Marques, pela contribuição e auxílio na construção desse trabalho.

Ao laboratório Professor Elliot Watanabe Kitajima, por toda estrutura e suporte na realização do trabalho.

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

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
	REFERÊNCIAS	14
2	O ESTRESSE HÍDRICO INTERROMPE A NODULAÇÃO E O ACÚMULO DE UREÍDEOS, COMPROMETENDO O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DAS PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI	16
2.1	INTRODUÇÃO	17
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.3	COLETA DE AMOSTRAS	19
2.4	DETERMINAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS	20
2.5	LOCALIZAÇÃO DE AMIDO EM TECIDOS VEGETAIS	20
2.6	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS E AÇÚCARES	21
2.6.1	Açúcares solúveis totais e sacarose	21
2.6.2	Determinação de ureídeos	22
2.6.3	Aminoácidos	22
2.6.4	Nitrato e amônia	23
2.7	BIOMETRIA DAS PLANTAS E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS	23
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
2.9	RESULTADOS	24
2.10	DISCUSSÃO	25
2.11	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	31
3	RESPOSTAS MORFO-ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI SENSÍVEIS E TOLERANTES AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO	45
3.1	INTRODUÇÃO	46
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.3	COLETA DE AMOSTRAS	49
3.4	ANATOMIA DOS NÓDULOS	49
3.5	ESTIMATIVA DE PRODUÇÃO	50
3.6	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS	50
3.6.1	Determinação de ureídeos	50
3.6.2	Aminoácidos	50
3.6.3	Nitrato e amônia	50

3.7	DETERMINAÇÃO DE TROCAS GASOSAS E EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA	50
3.8	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	51
3.9	ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E ATIVIDADE DE ENZIMAS	51
3.10	ANÁLISE DO PERFIL DE AÇÚCARES.....	52
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
3.12	RESULTADOS	53
3.12.1	Efeito do estresse hídrico no crescimento do feijão-caupi	53
3.12.2	Anatomia do nódulo	54
3.12.3	Metabolismo do N.....	54
3.12.4	Taxas fotossintéticas.....	55
3.12.5	Metabolismo oxidativo e antioxidativo.....	55
3.12.5	Teor de açúcares.....	55
3.12.6	Análise de cluster e heatmap	56
3.13	DISCUSSÃO	56
3.14	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS	63
4	MECANISMO DE DEFESA DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDOS A SECA.....	78
4.1	INTRODUÇÃO.....	79
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
4.3	COLETA DE AMOSTRAS.....	82
4.4	COMPOSTOS NITROGENADOS	82
4.5	ANÁLISE DO PERFIL DE AÇÚCARES.....	82
4.6	Peroxidação lipídica e determinação de peróxido de hidrogênio	83
4.7	ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E ATIVIDADE DE ENZIMAS	83
4.8	ANATOMIA DOS NÓDULOS.....	84
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
4.10	RESULTADOS	85
4.11	DISCUSSÕES	87
4.12	CONCLUSÃO.....	90
	REFERÊNCIAS	92
5	MUDANÇAS ANATÔMICAS E ULTRAESTRUTURAL DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI	102

5.1	INTRODUÇÃO.....	103
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	104
5.3	ANATOMIA DE FOLHAS E RAÍZES	104
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	105
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	105
5.6	RESULTADOS	106
5.7	DISCUSSÃO.....	107
5.8	CONCLUSÃO.....	109
	REFERÊNCIAS	110

RESUMO

A seca é um dos maiores estresse abiótico que interfere na produção agrícola do mundo. O feijão-caupi é uma importante fonte de proteína na alimentação humana e animal, sendo cultivados em regiões áridas e semi-áridas no mundo. O objetivo do experimento I: Foi avaliar o efeito de diferentes níveis de capacidade de água no solo (CAD) (20, 40, 60, e 80% da CAD) na fixação biológica do nitrogênio, ajuste osmótico celular e produtividade do feijão-caupi. Os resultados desse estudo sugerem que a redução do número de nódulos e acúmulo de ureídeos foram as principais respostas fisiológicas para a redução do crescimento e produtividade causados pela umidade do solo abaixo de 40%. O objetivo do experimento II: Foi avaliar a resposta morfofisiológica, bioquímica e anatômicas de raízes, folhas e nódulos de genótipos de feijão caupi, sensíveis: BRS Tracuateua (G1) e BRS Tumucumaque (G2), e tolerantes: Pingo de ouro 1-2 (G3) e BRS Marataoã (G4) submetidos ao déficit hídrico (CAD 40%) ou não (CAD 80%). As variáveis que possibilitou o agrupamento entre os genótipos tolerantes foram condutância estomática, fotossíntese e o acúmulo de sacarose, glicose, sorbitol e frutose nas raízes. Anatomicamente, o genótipo G4 apresentou melhor desenvolvimento do nódulo, células do córtex bem desenvolvidas e feixes vasculares mais organizados. Maior quantidade de grãos de amido foram encontrados nas folhas dos genótipos da CAD 40%, sendo maior no genótipo G4 em decorrência do aumento do floema nas raízes. A microscopia eletrônica de transmissão revelou que o genótipo G4 apresentou organização de grana. Nas raízes foi possível observar que os elementos de vasos do genótipo G2 apresentaram maior diâmetro na CAD 40%, comportamento que não ocorreu no genótipo G4.

Palavras-chave: compostos nitrogenados, mecanismo de adaptação, metabolismo antioxidativo, seca, *Vigna unguiculata* L.

ABSTRACT

Drought is one of the biggest abiotic stresses that interfere with agricultural production in the world. Cowpea is an important source of protein in human and animal food, being cultivated in arid and semi-arid regions in the world. The objective of experiment I: It was to evaluate the effect of different levels of soil water retention capacity (SWRC) (20, 40, 60, and 80% of SWRC) on biological nitrogen fixation, cellular osmotic adjustment and productivity of cowpea. The results of this study suggest that the reduction in the number of nodules and accumulation of ureides were the main physiological responses to the reduction in growth and productivity caused by soil moisture below 40%. The objective of experiment II: It was to evaluate the morphophysiological, biochemical and anatomical response of roots, leaves and nodules of cowpea genotypes, sensitive: BRS Tracuateua (G1) and BRS Tumucumaque (G2), and tolerant: Pingo de ouro 1-2 (G3) and BRS Marataoã (G4) submitted to water deficit (SWRC 40%) or not (SWRC 80%). The variables that allowed the grouping between the tolerant genotypes were stomatal conductance, photosynthesis and the accumulation of sucrose, glucose, sorbitol and fructose in the roots. Anatomically, the G4 genotype showed better nodule development, well-developed cortex cells and more organized vascular bundles. Greater amount of starch grains were found in the leaves of the 40% CAD genotypes, being higher in the G4 genotype due to the increase in phloem in the roots. Transmission electron microscopy revealed that the G4 genotype showed granum organization. In the roots, it was possible to observe that the vessel elements of the G2 genotype presented greater diameter in the 40% CAD, a behavior that did not occur in the G4 genotype.

Keywords: nitrogen compounds, adaptation mechanism, antioxidant metabolism, drought.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) é bastante utilizado na alimentação humana e animal, devido ao seu alto teor de proteína. Os grãos apresentam compostos bioativos (AWIKA; DUODU, 2017), e as folhas apresentam alto teor de micronutrientes e antioxidantes (Owade *et al.*, 2020), podendo ser utilizadas na alimentação animal. O cultivo do feijão caupi é realizado principalmente em regiões áridas e semi-áridas do mundo, onde a seca é bastante comum (Namatsheve *et al.*, 2020). Apesar do feijão-caupi apresentar alta plasticidade, diferentes genótipos apresentam comportamento distintos quando submetidos a diferentes estresses abióticos (CARVALHO *et al.*, 2019).

A seca é um dos principais estresses abióticos que afeta a produtividade das culturas, pois interrompe vários mecanismos essenciais fisiológicos, morfológicos e anatômicos das plantas (CHANDRA *et al.*, 2021). A previsão é que a incidência e severidade do déficit hídrico aumentarão nos próximos anos em decorrência das alterações climáticas (NADEEM *et al.*, 2019).

O estresse hídrico diminui a fotossíntese, o status hídrico, condutância estomática, e transpiração (TANKARI *et al.*, 2020), podendo impactar na síntese e transporte de açúcares. Para se desenvolver e reproduzir as plantas necessitam de distribuição de fotoassimilados ocorram em órgão de maior demanda (LEMOINE *et al.*, 2013; Nešović *et al.*, 2021). As folhas e raízes jovens são os principais drenos durante os estágios iniciais de desenvolvimento (FELLER; FISCHER, 1994), enquanto sementes e frutos tornam-se os principais drenos durante o estágio reprodutivo (TEGEDER; MASCLAUX-DAUBRESSE, 2018).

Os níveis de açúcar também influenciam no crescimento e desenvolvimento de nódulos (GIBSON, 2005). A alocação do açúcar no nódulo pode funcionar como um sinal metabólico sistêmico que impulsiona a função e o desenvolvimento do nódulo (LAMBERT *et al.*, 2020). A redução da produção da sacarose durante o estresse hídrico pode reduzir o desenvolvimento de nódulos e consequentemente a fixação biológica de nitrogênio (KRYVORUCHKO *et al.*, 2016). Além disso, a sacarose alivia os efeitos negativos do nitrato nas taxas de crescimento dos nódulos de soja (LAMBERT *et al.*, 2020).

Para enfrentar situações de estresse, as plantas desenvolveram uma série de mecanismos que compreendem em alterações morfológicas, bioquímicas e anatômicas. Nas folhas pode ocorrer redução da superfície transpirante, fechamento estomático, aumento de tricomas, senescência de folhas velhas (KOLAHİ *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2009). Já nas raízes pode ocorrer

aumento do volume radicular, maior quantidade de aerênquima no córtex, aumento da espessura de exoderme, metaxilemas numerosos e com menor diâmetro (JALEEL *et al.*, 2009; MAKBUL *et al.*, 2011). As modificações anatômicas dos nódulos durante a seca são pouco conhecida, porém a tolerância foi associada com a capacidade de sustentar suprimento de fotoassimilados (KUNERT *et al.*, 2016). No entanto, em situação de estresse, o aumento do etileno reduz o número de nódulos (LOHAR *et al.*, 2009). Esse mecanismo ocorre para reduzir a utilização de fotoassimilados nos nódulos e priorizar outras estruturas comprometidas das plantas (FERGUSON *et al.*, 2010).

O processo de fixação biológica de nitrogênio se inicia pela infecção da bactéria em pelos radiculares, essa infecção é acompanhada por várias modificações, como o enrolamento do pelo radicular e divisões de células corticais, dando início a organogênese do nódulo (POPP; OTT, 2011). Nas células infectadas, os bacterióides são responsáveis pela realização da fixação biológica de nitrogênio. A enzima nitrogenase reduz o nitrogênio atmosférico a amônio (DEN HERDER; PARNISKE, 2009) que é posteriormente reduzido a glutamina. Em seguida é transformado em ácido úrico (SMITH; ATKINS, 2002) e sintetizado em alantoína e o ácido alantóico (TODD *et al.*, 2006).

A seca pode levar a peroxidação lipídica, sendo o malondialdeído um importante sinalizador de estresse oxidativo (FOYER, 2018; SWANSON; GILROY, 2010). Para eliminação das espécies reativas ao oxigênio (EROS), as plantas desenvolveram um importante mecanismo de resistência, que compreende na ativação de enzimas antioxidativas, como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) (WASZCZAK *et al.*, 2018).

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, M. *et al.* Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 241, p. 153001, 2019.
- CHANDRA, P. *et al.* Strategies to mitigate the adverse effect of drought stress on crop plants— influences of soil bacteria: A review. **Pedosphere**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 496-509, 2021.
- DEN HERDER, G.; PARNISKE, M. The unbearable naivety of legumes in symbiosis. **Current opinion in plant biology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 491-499, 2009.
- FELLER, U.; FISCHER, A. Nitrogen metabolism in senescing leaves. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, n. 3, p. 241-273, 1994.
- FERGUSON, B. J. *et al.* Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. **Journal of integrative plant biology**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 61-76, 2010.
- FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and experimental botany**, [s. l.], v. 154, p. 134-142, 2018.
- GIBSON, S. I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Current opinion in plant biology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 93-102, 2005.
- JALEEL, C. A. *et al.* Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **Int. J. Agric. Biol**, Emirados Árabes Unidos, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2009.
- KOLAH, M. *et al.* Physiological traits and anatomic structures of the seed for two short cotton season genotypes (*Gossypium hirsutum* L.) under water stress. **Journal of Integrative Agriculture**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 89-98, 2020.
- KRYVORUCHKO, I. S. *et al.* MtSWEET11, a nodule-specific sucrose transporter of *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 171, n. 1, p. 554-565, 2016.
- KUNERT, K. J. *et al.* Drought stress responses in soybean roots and nodules. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, p. 1015, 2016.
- LAMBERT, I. *et al.* Responses of mature symbiotic nodules to the whole-plant systemic nitrogen signaling. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 71, n. 16, p. 5039-5052, 2020.
- LEMOINE, R. *et al.* Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. **Frontiers in plant science**, França, v. 4, p. 272, 2013.
- LI, Y. *et al.* Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 341-346, 2009.
- LOHAR, D. *et al.* Ethylene insensitivity conferred by a mutated Arabidopsis ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. **Annals of botany**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 277-285, 2009.

MAKBUL, S. *et al.* Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. **Turkish Journal of Botany**, Turkia, v. 35, n. 4, p. 369-377, 2011.

NADEEM, M. *et al.* Research progress and perspective on drought stress in legumes: a review. **International journal of molecular sciences**, China, v. 20, n. 10, p. 2541, 2019.

NAMATSHEVE, T. *et al.* Productivity and biological N₂-fixation in cereal-cowpea intercropping systems in sub-Saharan Africa. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 1-12, 2020.

NEŠOVIĆ, M. *et al.* Distribution of polyphenolic and sugar compounds in different buckwheat plant parts. **RSC Advances**, Sérvia, v. 11, n. 42, p. 25816-25829, 2021.

OWADE, J. O. *et al.* A review of the contribution of cowpea leaves to food and nutrition security in East Africa. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 36-47, 2020.

POPP, C.; OTT, T. Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. **Current opinion in plant biology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 458-467, 2011.

SMITH, P. M. C.; ATKINS, C. A. Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 128, n. 3, p. 793-802, 2002.

SWANSON, S.; GILROY, S. ROS in plant development. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 138, n. 4, p. 384-392, 2010.

TANKARI, M. *et al.* Drought priming improved water status, photosynthesis and water productivity of cowpea during post-anthesis drought stress. **Agricultural Water Management**, [s. l.], v. 245, p. 106565, 2021.

TEGEDER, M.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. **New phytologist**, [s. l.], v. 217, n. 1, p. 35-53, 2018.

TODD, C. D. *et al.* Update on ureide degradation in legumes. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 5-12, 2006.

WASZCZAK, C. *et al.* Reactive oxygen species in plant signaling. **Annual review of plant biology**, Finlandia, v. 69, p. 209-236, 2018.

2 O ESTRESSE HÍDRICO INTERROMPE A NODULAÇÃO E O ACÚMULO DE UREÍDEOS, COMPROMETENDO O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DAS PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI

RESUMO

A escassez hídrica é um dos estresses abióticos mais limitantes na fixação biológica do nitrogênio e na produtividade das plantas leguminosas. O feijão-caupi é uma importante fonte de proteínas para alimentação humana em países em desenvolvimento e sensível ao estresse a seca. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes níveis de capacidade de água no solo na fixação biológica do nitrogênio, ajuste osmótico celular e produtividade do feijão-caupi. A restrição hídrica começou 20 dias após a semeadura com diferentes níveis de capacidade de água disponível no solo (CAD) (20, 40, 60, e 80% da CAD). As plantas de feijão-caupi não completaram o ciclo de vida na CAD 20%. O déficit hídrico na CAD 40% reduziu drasticamente o número e peso de nódulos. Isso refletiu na queda drástica no acúmulo de alantoína, ácido alantóico, nitrato, amônia e aminoácidos no sistema radicular. Consequentemente, houve menor acúmulo desses metabólitos primários na parte aérea das plantas. A menor concentração de ureídeos na parte aérea resultou na menor concentração de pigmentos fotossintetizantes como clorofila, carotenoides e feofitinas. O estresse por déficit hídrico causou clorose nas plantas reduzindo a síntese de sacarose e açúcares totais nas folhas e o transporte desses metabólitos para as raízes. A disruptura na formação dos nódulos, alteração na produção de compostos nitrogenados causou redução na massa seca de raiz, parte aérea e produtividade do feijão-caupi. Os resultados desse estudo sugerem que a redução do número de nódulos e acúmulo de ureídeos foram as principais respostas fisiológicas para a redução do crescimento e produtividade causados pela umidade do solo abaixo de 40%.

Palavras chave: Déficit hídrico, fixação biológica do nitrogênio, estresse por seca, ureídeos, feijão-caupi

2.1 INTRODUÇÃO

A seca é um dos principais fatores que limitam a produtividade das culturas em todo o mundo. Os danos não se restringem somente à agricultura, mas também à segurança alimentar e aspectos socioeconômicos relacionados com a atividade (GUO *et al.*, 2019). Algumas regiões do mundo vêm enfrentando incremento da frequência e intensidade de déficit hídrico (HE *et al.*, 2019). Além disso, entre os anos de 2015 a 2019, o número global de pessoas em risco de fome aumentou em 80% (VOOSEN, 2020).

O feijão-caupi é uma das principais fontes de proteínas, minerais, vitaminas e fibras alimentares para a maioria das dietas nos países em desenvolvimento (MOMANYI, 2020). Os grãos possuem entre 22 e 30% de proteína, o que a torna uma fonte importante de nutrição de baixo custo. Devido às características nutricionais e sua alta plasticidade e tolerância a estresses abióticos, o feijão-caupi tem elevada importância nutricional e socioeconômica em muitas regiões áridas e semiáridas do mundo (MANDA *et al.*, 2019).

A seca tem efeitos drásticos no desenvolvimento das plantas, pois afeta a germinação das sementes, o crescimento das plantas, a fenologia, a disponibilidade de nutrientes, a fotossíntese e a respiração (FAROOQI *et al.*, 2020). Algumas espécies possuem mecanismos diferentes para responder e se adaptar ao estresse hídrico, induzindo uma variedade de respostas fisiológicas, bioquímicas e morfológicas (KHODABIN *et al.*, 2020). A tolerância do feijão-caupi ao déficit hídrico se deve à algumas respostas respostas, tais como: ajuste osmótico e o fechamento estomático como estratégia para manter a umidade no interior dos tecidos, mantendo as atividades fisiológicas e bioquímicas normais das células (GAO *et al.*, 2020). Os estômatos abrem ou fecham de acordo com a turgidez das células de guarda circundantes (GUPTA, 2020). O fechamento estomático em situação de déficit hídrico reduz os teores de clorofila a , b e carotenoides (CHAVOUSHI *et al.*, 2020; NADERI *et al.*, 2020). Isso ocorre porque em condição de seca, as plantas produzem espécies reativas ao oxigênio que danificam as biomoléculas como DNA, RNA, proteínas, lipídeos, pigmentos fotossintéticos e outros componentes essenciais de uma célula vegetal (IQBAL *et al.*, 2020).

Solutos compatíveis como açúcares e aminoácidos são produzidos e acumulados nas plantas durante o estresse hídrico como estratégia de ajustar o potencial osmótico da célula (IQBAL *et al.*, 2020). No nódulo, a enzima sacarose sintase é responsável pela clivagem da sacarose pela

subsequente síntese de ácidos orgânicos, principalmente malato, que fornecem esqueletos de carbono para a atividade de fixação. No entanto, em situações de estresse a sacarose é utilizada como composto de ajuste osmótico, e o nódulo fica com pouca fonte de carbono para a demanda energética necessária para manter as reações enzimáticas da FBN (FURLAN *et al.*, 2017).

Os ureídeos são a principal forma de transporte de nitrogênio no feijão-caupi, sendo a seca um limitador no transporte de ureídeos e amidas (DARYANTO *et al.*, 2016). Ureídeos em baixa concentração compromete a produção de aminoácidos que são importantes para a produção de proteínas, isso leva a menor desenvolvimento de biomassa de raiz e parte aérea, comprometendo drasticamente a produtividade da cultura (MEDEIROS *et al.*, 2020). Munjonji *et al.* (2018), observaram na cultura de feijão-caupi que o estresse hídrico resultou em uma redução de 80% na biomassa de nódulos e essa redução influenciou na fixação de nitrogênio, sendo que os genótipos submetidos ao estresse hídrico severo fixaram 57% menos nitrogênio comparado com o cultivo sem estresse.

Existe uma necessidade urgente de melhorar o desempenho da agricultura de sequeiro na produção de alimentos (AHMED, 2020). A restrição hídrica afeta a produção de sacarose e consequentemente limita a formação de nódulo. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do estresse por déficit hídrico sobre o metabolismo primário em plantas de feijão-caupi e sua relação com a produção de ureídeos e a produtividade.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na casa de vegetação da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Ilha Solteira, localizada na cidade de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil (20° 25' 4.65" S, 51° 20' 27.89" O, 377 m). Antes da instalação do experimento foram coletadas amostras de solo, na camada 0,0 a 0,2 m da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNESP para determinação das características químicas, de acordo com Raij *et al.* (2001). As amostras foram encaminhadas ao laboratório de fertilidade do solo para análises químicas, não sendo necessária a calagem. As propriedades químicas observadas foram: pH: 5,3; P: 3 mg/dm³, K: 0,4 mmol/dm³, Ca: 10 mmol/dm³, Mg: 8 mmol/dm³, B: 0,02 mg/dm³, Cu: 0,6 mg/dm³, Fe: 19 mg/dm³,

Mn: 8,8 , Zn:0,5 mg/dm³, H+Al: 15 mmol/dm³, CTC: 33,4 mmol/dm³, MO: 17 g/dm³, O solo foi classificado como Rhodic Haplustox de acordo com (Soil Survey Staff, 2014).

A adubação de semeadura foi realizada de acordo com a análise do solo com: 90 mg kg⁻¹ P₂O₅ aplicado na forma de superfosfato simples, 60 mg kg⁻¹ K₂O na forma de cloreto de potássio, 2,5 mg kg⁻¹ de Zn na forma de sulfato de zinco, 0,5 mg kg⁻¹ de B na forma de ácido bórico, 0,5 mg kg⁻¹ de Co na forma de cloreto de cobalto, 0,5 mg kg⁻¹ de Mo na forma de molibdato de amônio. Após 15 dias de plantio, foi realizada adubação de cobertura, sendo 25 mg kg⁻¹ N na forma de uréia. As sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivar 'BRS Guariba' foram semeadas no dia 20/11/2019 em vasos de polietileno contendo exatamente 3 kg de solo (mantendo duas plantas por vaso) e cultivados até o final do ciclo para a obtenção dos grãos. As sementes foram tratadas com piraclostrobina (25 g L⁻¹ produto comercial), tiofanato-metil (225 g L⁻¹ produto comercial) e fipronil (250 g L⁻¹ produto comercial) em 2 mL de produto por kg de semente. Após a secagem, as sementes foram inoculadas com um inóculo de turfa premium para o feijão-caupi (cepa SEMIA 6463; número de registro do produto SP 00581-10030-1; BIOMAX; cidade de São Joaquim da Barra, Brasil) com 8 g kg⁻¹ de semente, objetivando atingir $2,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias g⁻¹. Devido a fenologia do feijão-caupi foi necessário realizar o tutoramento das plantas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo 4 níveis de capacidades de água disponível no solo (20, 40, 60 e 80% da CAD), contendo 4 repetições por tratamento. O solo foi mantido a 80% da CAD até 20 dias após a semeadura, na sequência foi iniciado o regime de restrição hídrica. A reposição hídrica foi feita utilizando o método de pesagem de vasos a cada 24 horas, conforme cálculos descritos por Fischer-Filho e Zocoler (2016).

2.3 COLETA DE AMOSTRAS

As coletas de plantas para análises fisiológicas foram realizadas no estágio fenológico R₁ (BASTOS *et al.*, 2011). O estágio fenológico R₁ foi escolhido para a coleta de amostras porque este estágio representa o máximo status fisiológico das plantas (e.g., máximo acúmulo de fotoassimilados, nutrientes e compostos nitrogenados). Aos 18 dias de restrição hídrica, as plantas foram separadas em raiz, nódulo e parte aérea. As raízes e nódulos foram lavadas em água corrente e depois em água deionizada. Foi realizada a quantificação de nódulos e calculado a área foliar do

trifólio mediano da folha recém expandida. As amostras vegetais foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C até atingir peso constante. Os materiais vegetais foram pesados e os valores expressos em g planta⁻¹.

2.4 DETERMINAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

As determinações dos pigmentos fotossintéticos (clorofila, carotenóides e feofitina) foram baseadas na descrição de Lichtenthaler (1987), utilizando 80% de acetona como solvente. A extração foi realizada com 0,5 g de matéria fresca em 5 mL de acetona a 80%. As amostras foram centrifugadas e, em seguida, as leituras de absorbância foram feitas em diferentes comprimentos de onda. As concentrações de clorofila a, clorofila b, clorofila total, feofitina a, feofitina b, feofitina total e carotenóides foram expressas em µg mL⁻¹.

2.5 LOCALIZAÇÃO DE AMIDO EM TECIDOS VEGETAIS

Para analisar a localização do amido em tecidos foliares, a folha do terço médio superior totalmente expandido foi coletada durante o estágio de desenvolvimento R1 (floração). As amostras foram imediatamente transferidas para tubos contendo F.A.A. Solução a 70% (formaldeído 37%, ácido acético e etanol 70% em uma proporção de 1,0: 1,0: 18,0-V / V) por 7 dias e, subsequentemente, totalmente desidratado para etanol 100%. As amostras foram transferidas para placas de Petri contendo solução de hipoclorito de sódio a 2% e mantidas por 20 minutos para remoção da clorofila. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com água deionizada por 10 minutos. Foram realizados cortes a mão livre e colocados em lâminas de vidro de microscópio. Para localizar a abundância de amido, as seções foram coradas com solução de lugol a 10% e depois enxaguadas duas vezes em água deionizada (Berlyn and Miksche, 1976). As seções foram examinadas usando um microscópio Leica DMR e imagens representativas foram registradas. As seções foram pontuadas quanto à presença ou ausência de grãos de amido nas células do parênquima. Seis a sete seções de cada uma das quatro repetições de amostras foram examinadas para estimar a abundância de grãos de amido em plantas submetidas ao estresse hídrico.

2.6 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS E AÇÚCARES

Para análise de perfil de compostos nitrogenados e açúcares o material vegetal foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Bielecki e Turner (1966). O material vegetal foi macerado em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido, sendo pesado 0,3 g de material vegetal seco e macerado em 10 mL de solução MCW (60% metanol, 25% clorofórmio e 15% água), a solução contendo o extrato vegetal foi armazenada em tubos *falcon* de 15 mL, homogeneizada em vórtex e centrifugada à $10.000 \times g$ durante 10 minutos à 4 °C, e armazenada em refrigerador durante 48 horas. Após este período, extraíram-se 4 mL do sobrenadante transferindo-o para outro tubo *falcon* de 15 mL, adicionando 1,5 mL de água deionizada e 1 mL de clorofórmio, e armazenado em refrigerador durante 24 horas para a separação das fases lipossolúvel e hidrossolúvel, da qual foram feitas as análises de ureídeos (alantoína e ácido alantóico), açúcares solúveis totais, sacarose, nitrato, amônia e aminoácidos.

2.6.1 Açúcares solúveis totais e sacarose

A concentração de açúcares totais foi determinada de acordo com a metodologia de Dubois *et al.* (1956), sendo adicionado 25 µL de extrato hidrossolúvel, 500 µL de fenol 5% e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, lentamente, em tubos de vidro. Esta mistura foi homogeneizada em vórtex e, após resfriar em temperatura ambiente, seguiu-se a leitura no espectrofotômetro em absorbância no comprimento de onda $\lambda = 490$ nm.

A determinação de sacarose foi realizada seguindo o método de Van Handel (1968), adicionando 50 µL de extrato hidrossolúvel, 500 µL de KOH 30% e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, lentamente, em tubos de vidro. A mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida em estufa à 100 °C durante 10 minutos, e resfriados a temperatura ambiente, posteriormente procedeu-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda $\lambda = 490$ nm em absorbância. Ambas concentrações foram determinadas de acordo com curva padrão de sacarose e os resultados expressos em mg g⁻¹ de matéria fresca (MF).

2.6.2 Determinação de ureídeos

Para a determinação de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) nas folhas do amendoim foi utilizado o método de Vogels e Van Der Drift (1970). O ensaio consiste em duas fases: Fase 1: Em tubos de ensaio, foi adicionado 250 μ L da amostra, 250 μ L de NaOH 0,5 M, 1 gota de fenilhidrazina. O ensaio foi aquecido em estufa a 100 °C durante 8 minutos e, em seguida, resfriado à temperatura ambiente. Nesta fase (hidrólise alcalina), a alantoína é hidrolisada a ácido alantóico. Fase 2: Foi adicionado 250 μ L de HCl 0,65 N e novamente aquecido a 100 °C durante 4 minutos (hidrólise ácida), quando ocorre a hidrólise do ácido alantóico para glioxilato. O ensaio foi resfriado à temperatura ambiente e, então, foi adicionado 250 μ L de tampão fosfato pH 7,0 0,4 M e 250 μ L de solução de fenilhidrazina 0,33%. Após 5 minutos à temperatura ambiente, o ensaio foi incubado em banho de gelo por 5 minutos. Logo após, foi adicionado 1,25 mL de HCl concentrado previamente gelado e 250 μ L de solução de ferrocianeto de potássio 1,65%. Os tubos foram retirados do banho de gelo e homogeneizado em vortex. Após 15 minutos em temperatura ambiente, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro em $\lambda = 535$ nm. A concentração de ureídeos foi calculada com base em curva padrão de solução alantoína. Os resultados foram expressos em μ mol g⁻¹ MF peso fresco).

2.6.3 Aminoácidos

Para quantificar a concentração de aminoácidos solúveis totais, foi utilizado o método de Yemm; Cocking; Ricketts (1955), utilizando-se alíquota de 100 μ L de extrato hidrossolúvel, 500 μ L citrato de sódio 0,2M, 200 μ L solução ninhidrina 5% em éter monometílico de etilenoglicol e 1 mL de KCN 0,0002M. Esta mistura foi mantida a 100 °C durante 15 minutos em estufa, em seguida foi resfriada em água corrente por 10 minutos, acrescentando-se 1 mL de álcool etílico 60% e homogeneizado em vortex. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda $\lambda = 570$ nm. A concentração de aminoácidos solúveis totais foi determinada utilizando curva padrão de solução metionina.

2.6.4 Nitrato e amônia

Para a determinação de nitrato foi utilizado o método de Cataldo *et al.*, (1975). Do extrato da fase hidrossolúvel, foi retirado uma alíquota de 10 μL e adicionado 40 μL ácido salicílico 5% em H_2SO_4 (p/v). Após 20 minutos em temperatura ambiente, foi acrescentado 1 mL de NaOH 2N, lentamente. Após resfriar a temperatura ambiente, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro em $\lambda = 410 \text{ nm}$. A concentração de nitrato foi determinada utilizando-se curva padrão de solução nitrato de cálcio. Os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$.

A concentração de amônia foi quantificada de acordo com a metodologia descrita por Mccullough (1967). Adicionou-se 200 μL de extrato hidrossolúvel, 500 μL de solução fenol (2,5 g de fenol e 12,5 mg de nitroprussiato de sódio em volume final de 250 mL) e 500 μL de solução fosfato (1,25 g NaOH, 13,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,5 mL NaOCl 5%, para 250 mL). As amostras foram incubadas a 37 °C durante 1 h. A leitura foi realizada por espectrometria no comprimento de onda $\lambda = 630 \text{ nm}$ em absorbância. A concentração de amônia foi determinada através de curva padrão de solução sulfato de amônio e os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$.

2.7 BIOMETRIA DAS PLANTAS E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS

No final do experimento, as vagens foram coletadas, armazenadas em saco de papel e secadas. Em seguida, os materiais foram colocados em estufa com ventilação forçada por 72 h a 65 °C até obter massa constante. Após pesagem determinou-se o número de vagens por planta; número de sementes por planta; massa de 100 sementes a 13% de umidade - base úmida (g) e produtividade de grãos a 13% de umidade - base úmida (g planta^{-1}).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por meio do Software R (R Development Core Team 2015, v. 3.6), os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade de Levene, ambos a 5% de significância ($p > 0,05$). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$), e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%

de significância ($p < 0,05$). A análise de correlação de Pearson ($p < 0,05$) também foi realizada para identificar variáveis dependentes que são diretamente correlacionadas com os tratamentos. O pacote “corrplot” foi utilizado para criar o Heatmap, com funções “cor” e “cor.mtest” para criar os coeficientes e matrizes de p-valores.

2.9 RESULTADOS

A seca afetou drasticamente o crescimento das plantas de feijão-caupi. Aos 18 dias de restrição hídrica, as plantas do tratamento CAD 20 % apresentaram clorose e alta queda de folhas (Figura 1A). Plantas do tratamento CAD 40% (Figura 1B) apresentaram folhas amareladas e plantas dos tratamentos CAD 60 (Figura 1C) e 80% (Figura 1D) estavam saudáveis e bem verdes. Plantas do tratamento CAD 20% (Figura 1A) morreram 29 dias após a restrição hídrica, não produzindo flores, vagens e grãos.

O déficit hídrico das CAD 20 e 40% reduziram a área foliar das plantas de feijão-caupi (material suplementar 1). A CAD 20% causou decréscimo na altura das plantas em 55% em comparação a CAD 80% (Figura 1 e Figura 2B). Houve redução drástica na massa seca da parte aérea e raiz em resposta ao déficit hídrico. A massa seca da parte aérea reduziu em 93% e raiz em 95% na CAD 20% em comparação a CAD 80% (material suplementar 1).

A concentração de pigmentos fotossintetizantes clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenóides, feofitina a e feofitina total reduziram drasticamente nos tratamentos CAD 20 e 40% (Figura 2). A porcentagem de redução da concentração de clorofila a, b, carotenóides e feofitina a nas plantas do tratamento CAD 20% em comparação a CAD 80% foi de 67, 65, 25 e 68 %, respectivamente.

A clorose induziu menor acúmulo de açúcares totais e sacarose na parte aérea e raiz na CAD 20% (Figura 3). A redução no acúmulo de açúcares totais na parte aérea foi 98% (Figura 4A), nas raízes 99% (Figura 4B), a redução no acúmulo de sacarose na parte aérea e raízes foi 97% (Figura 4C, D) nas plantas do tratamento CAD 20% em comparação com plantas no tratamento 80%.

O déficit hídrico causou ruptura no metabolismo de compostos nitrogenados na raiz e parte aérea das plantas de feijão-caupi (Figura 5). Houve redução no acúmulo de alantoína em 93% na parte aérea (Figura 5A), 93% nas raízes (Figura 5B), ácido alantóico em 85% na parte aérea (Figura 5C), ácido alantóico 97% nas raízes (Figura 5D), aminoácidos totais em 92% na parte aérea

(Figura 5E) e aminoácidos totais em 94% nas raízes (Figura 5F) em plantas do tratamento CAD 20% em comparação a CAD 80%.

A seca reduziu drasticamente o número de nódulos, peso de nódulos e produtividade das plantas de feijão-caupi (Figura 6). Houve redução em 91% no número de nódulos (Figura 6A) e 94% no peso de nódulos (Figura 6B) nas plantas do tratamento CAD 20% em comparação a CAD 80%. Não houve diferença entre o número de sementes por plantas na CAD 40% (Figura 6C), mas houve redução de 51% na produtividade (Figura 6D) em comparação a CAD 80% devido ao menor peso dos grãos.

2.10 DISCUSSÃO

A queda precoce das folhas nos tratamentos com menor disponibilidade de água no solo (Figura 1) ocorreu porque as plantas em ambientes desfavoráveis são forçadas a regular a alocação de aminoácidos, ureídeos e açúcares (ZHOU *et al.*, 2020). Em condições de déficit hídrico há tendência das plantas translocarem os fotoassimilados das folhas mais velhas para as folhas jovens, ocasionando a senescência ou clorose das folhas mais velhas. Os danos nas células e tecidos ou senescência causados levarão a estresse oxidativo que causa inibição ao crescimento das plantas e desenvolvimento ou até a morte de plantas (MANGENA, 2019).

A redução do número de folhas e área foliar (Material Suplementar 1) é uma estratégia para diminuir a superfície de transpiração e o gasto metabólico para a manutenção dos tecidos (INMAN-BAMBER *et al.*, 2008). Resultados similares foram observados por (MATHOBO *et al.*, 2017) e (RASTI *et al.*, 2018) sobre o efeito do déficit hídrico no crescimento e produtividade do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

O enrolamento das folhas na CAD 20 % (Figura 1) ocorre devido as células do mesofilo não têm grande pressão do turgor para manter os estômatos abertos e para manter um alto nível de taxa de transpiração e intensidade da fotossíntese durante a seca (HUANG *et al.*, 2019). A variação do ângulo de exposição das folhas aos raios solares também é um importante mecanismo de defesa das plantas, que opera exatamente em períodos de estresse hídrico, diminuindo a temperatura foliar e, consequentemente, a transpiração estomatal (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A alteração no sistema radicular em plantas submetidas ao estresse pode ser atribuída a eventos coordenados de divisão celular, alongamento e diferenciação no ápice raiz. Na busca pela

umidade, os sistemas radiculares crescem diferentemente e adaptam sua arquitetura para ser profunda ou superficial (GUPTA *et al.*, 2020). A massa da raiz das plantas de feijão-caupi reduziu em resposta a menor disponibilidade de água no solo (Material suplementar 1). Para manter a homeostase osmótica as plantas investiram na reprogramação metabólica resultando na limitação do desenvolvimento radicular.

A clorofila é a molécula ativa do cloroplasto, desempenha um papel crítico na fotossíntese das plantas (HOURI *et al.*, 2020). A redução da concentração de clorofila a e b na CAD 20% e 40% (Figura 3) é resultante do fechamento estomático para reduzir a taxa de transpiração que também reduz a captação de CO₂ e taxa de fotossíntese (LI *et al.*, 2020). Nessa condição as plantas produzem as espécies reativas de oxigênio, que em alta concentração causa a ruptura de macromoléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, com importantes funções na célula (AKCIN *et al.*, 2020), bem como degradação de pigmentos acessórios envolvidos no processo de fotossíntese (WAKEEL *et al.*, 2020). A redução da concentração de pigmentos causa inibição das atividades das enzimas fotossintéticas, ocasionando redução do acúmulo e fluxo de carboidratos para os órgãos em desenvolvimento. Resultados semelhantes foram observados em feijão faba (ABID *et al.*, 2017), grão de bico (MAFAKHERI *et al.*, 2010) e em feijão-caupi (AYALA-CARDONA *et al.*, 2020), onde clorofilas, fotossíntese, condutância estomática e transpiração foram reduzidas em condições de menor disponibilidade de água no solo. Os carotenóides sob estresse hídrico possuem papel na proteção do complexo antena da fotossíntese e atua como agente antioxidante (SHEN, 2017). Nesse estudo, a concentração de carotenoides reduziu drasticamente com a menor disponibilidade de água no solo, resultado semelhante foi observado em soja por Basal *et al.* (2020).

O estresse hídrico diminui a capacidade fotossintética das plantas (SALGADO *et al.*, 2020). Neste estudo, as plantas de feijão-caupi expostas ao estresse de déficit hídrico diminuíram a condutância estomática e as taxas de transpiração (Figura 2H-I). Sabe-se que a condutância estomática e a transpiração das plantas são responsáveis pela assimilação do carbono da atmosfera aumentando o metabolismo do açúcar nas plantas superiores (NUNES-NESI *et al.*, 2016). Portanto, a menor capacidade fotossintética das plantas de feijão-caupi sob estresse hídrico comprometeu o acúmulo de carboidratos nas células do parênquima (Figura 3), interrompendo o metabolismo primário.

A baixa disponibilidade de água no solo promoveu disruptura na produção de açúcares solúveis totais, sacarose, alantoína, ácido alantóico, aminoácidos, nitrato e amônia na parte aérea e raízes das plantas de feijão-caupi (Figuras 4, 5 e Material suplementar 1). Houve redução drástica da concentração desses metabólitos nos tratamentos com menor disponibilidade hídrica. Esses metabólitos apresentaram correlação positiva com a produtividade do feijão-caupi (Figura 7).

As raízes e nódulos radiculares são sensores indispensáveis para tolerância à seca, e o feedback desses órgãos são cruciais para produção de ureídeos em plantas leguminosas (NADEEM *et al.*, 2019). Nesse estudo, o número e peso de nódulos reduziu drasticamente em resposta a menor disponibilidade de água no solo. A diminuição da fixação biológica no nitrogênio em plantas leguminosas está associada ao aumento da resistência ao oxigênio causada por espécies reativas de oxigênio sob estresse hídrico (ARANJUELO *et al.*, 2011). Resultado similar foi observado em plantas de soja, onde a seca afetou o número e peso de nódulos radiculares e fixação biológica de nitrogênio (KUNERT *et al.*, 2016). Maior atividade de fixação biológica de nitrogênio foi observado no nódulo de plantas de amendoim de genótipo tolerante à seca, melhorando assim o metabolismo do carbono (sacarose) e do nitrogênio (FURLAN *et al.*, 2017). A formação de nódulos e a fixação de nitrogênio no feijão-caupi são altamente sensíveis ao estresse hídrico em comparação ao acúmulo de biomassa (MUNJONJI *et al.*, 2018). A seca pode afetar a quantidade e a qualidade dos exsudatos radiculares (VRIES *et al.*, 2020), aumentar a heterogeneidade do solo, limitando a mobilidade e o acesso aos nutrientes e aumentando o oxigênio do solo, geralmente induzindo uma forte diminuição da biomassa microbiana (JANSSON; HOFMOCKEL, 2020).

Os ureídeos contribuem com a alocação de nitrogênio no interior das plantas (THU, 2019). A alantoína é um biomarcador de processos fisiológicos relacionados ao estresse por seca ou alagamento (REDILLAS *et al.*, 2019; Takagi *et al.*, 2016). O acúmulo de alantoína nas plantas do tratamento CAD 80% resultou em uma captação elevada de amônia e aminoácidos, que por sua vez conferiu vantagem no crescimento e produtividade das plantas. Nos tratamentos CAD 20% e 40%, o acúmulo de alantoína e ácido alantóico foi reduzido, interferindo negativamente na disponibilidade de N para a parte aérea e o reflexo foi a inibição de atividades fotossintéticas que consequentemente limitou o crescimento e a produtividade do feijão-caupi. O acúmulo de ácido alantóico na parte aérea foi maior na CAD 40% (Figura 5), elevadas concentrações de ureídeos na parte aérea foi relatada por Baral e Izaguirre-mayoral (2017) como inversamente relacionada a fixação biológica de nitrogênio.

A redução do número de botões florais em resposta a menor disponibilidade de água no solo pode ser atribuído ao fato no menor número de nódulos, menor disponibilidade de compostos nitrogenados como ureídeos e inibição da fotossíntese e a translocação dos fotoassimilados, o que consequentemente limitou a energia disponível para a reprodução (MEDEIROS *et al.*, 2020). O déficit hídrico e altas temperaturas tem efeito negativo na germinação e fertilidade do grão de pólen ocasionando o abortamento das flores devido a não fecundação do ovário resultando no menor número de vagens, sementes e produtividade das plantas (KHAN; KOMATSU, 2016; PANG *et al.*, 2017).

O déficit hídrico afetou drasticamente a produtividade do feijão-caupi (Figura 6D). Plantas sob o tratamento CAD 20% morreram antes da antese, não produzindo flores, vagens e sementes. Houve uma redução de 51% da produtividade de plantas sob CAD 40% em comparação a CAD 80%. Resultados similares em feijão-caupi sob déficit hídrico foram observados por Darkwa *et al.* (2016). Essa redução ocorre porque a seca reduz assimilação de carbono em açúcares e partição de carboidratos no grão em desenvolvimento (ASFAW *et al.*, 2012). Além disso, o estresse hídrico regula a produção de assimilação fotossintética, metabolismo do açúcar e transporte nas folhas e sementes (DU *et al.*, 2020). O enchimento das sementes nas plantas depende da sacarose transportada diretamente produzida pela fotossíntese nas folhas, e a capacidade e a eficiência do transporte estão associadas ao peso final das sementes e tamanho das semente (DU *et al.*, 2020). A redução da massa da parte aérea e raiz em resposta a seca, resultou na redução de número e tamanho de nódulos, metabolismo de ureídeos, aminoácidos e açúcares que interferiu significativamente na produtividade do feijão-caupi.

O mesófilo das folhas do feijão-caupi era dorsiventral (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006) com parênquima paliçádico próximo à epiderme adaxial e parênquima esponjoso próximo à epiderme abaxial (Figura 3). O amido é um carboidrato polimérico constituído por açúcares sintetizados pela fotossíntese e acumulados nos cloroplastos (RUCKLE *et al.*, 2017). Neste estudo, grãos de amido foram encontrados no parênquima paliçádico e parênquima lacunoso em plantas bem irrigadas (Figura 3). A maior abundância de amido foi detectada em plantas da CAD 80%, 60%, 40% e 20%, respectivamente. Esses resultados mostram que o acúmulo de amido e açúcares (Figuras 3 e 4) foram os principais parâmetros fisiológicos que regulam o crescimento e a produtividade do feijão-caupi. Plantas sob estresse hídrico apresentaram menor formação de nódulos, acúmulo de ureídeo, nitrato, amônia e aminoácidos, o que

comprometeu a fotossíntese e o acúmulo de açúcares e amido. Esses resultados sugerem que as plantas de feijão-caupi requerem pelo menos 40% de CAD para a regulação do processo fotossintético, produzindo açúcares para o crescimento e desenvolvimento. Melhor resposta fotossintética, acúmulo de açúcar e amido, crescimento e rendimento do feijão-caupi foram observados em plantas da CAD 80%.

A análise de componentes principais (PCA) revelou que as características observadas neste estudo foram linearmente correlacionadas com a disponibilidade de água no solo (Figura 7A). Foi observada uma relação positiva entre ureídeos (alantoína e ácido alantóico) e aminoácidos, produção de sementes, fotossíntese e pigmentos fotossintéticos em resposta a 80% de CAD (Figura 7B). O heatmap também revela alta correlação do coeficiente de Pearson com as taxas fotossintéticas líquidas (A), condutância estomática (gs) e pigmentos fotossintéticos (clorofilas) e concentração de açúcares nas folhas. Esses parâmetros foram as principais características fisiológicas que regulam o crescimento e a produtividade das plantas de feijão-caupi sob diferentes disponibilidades hídricas no solo.

2.11 CONCLUSÃO

A baixa disponibilidade de água no solo reduziu o número e peso de nódulos das plantas de feijão-caupi. A diminuição do número de nódulos resultou na disruptura da fixação biológica do nitrogênio devido o menor acúmulo de alantoína, ácido alantóico, aminoácidos, nitrato e amônia na parte aérea e raiz das plantas. Os ureídeos (alantoína e ácido alantóico) são as principais formas orgânicas de nitrogênio nas raízes e parte aérea do feijão-caupi e foram drasticamente reduzidos em resposta a baixa disponibilidade de água no solo.

O estresse por déficit hídrico reduziu a concentração de pigmentos fotossintéticos, o que resultou no menor acúmulo de sacarose e açúcares na parte aérea e raiz, resultando na menor área foliar, biomassa seca de plantas e produtividade.

As plantas de feijão-caupi não produziram flores, vagens e sementes em resposta ao déficit hídrico de CAD 20%. Esse estudo sugere que a disponibilidade mínima de água no solo seja CAD 40% para produção de sementes de feijão-caupi. Esse estudo fornece importantes informações

sobre respostas fisiológicas do metabolismo de ureídeos e amidas como biomarcadores para resposta a seca.

REFERÊNCIAS

- ABID, G. *et al.* Agro-physiological and biochemical responses of faba bean (*Vicia faba* L. var.'minor') genotypes to water deficit stress. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2017.
- ACKIN, A. *et al.* Application of fulvic acid modulates photosynthetic pigments and malondialdehyde content in bread wheat (*Triticum aestivum* cv. Ekiz) to increase resistance to chromium stress. **Int. J. Agric. Biol.**, [s. l.], v. 23, p. 142-148, 2020.
- AHMED, S. M. Impacts of drought, food security policy and climate change on performance of irrigation schemes in Sub-saharan Africa: The case of Sudan. **Agricultural Water Management**, [s. l.], v. 232, p. 106064, 2020.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B., CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**, 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. 438 p.
- ARANJUELO, I. *et al.* Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 111-123, 2011.
- ASFAW, A. *et al.* Multienvironment quantitative trait loci analysis for photosynthate acquisition, accumulation, and remobilization traits in common bean under drought stress. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 579-595, 2012.
- BARAL, B.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L. Purine-derived ureides under drought and salinity. **Advances in Agronomy**, [s. l.], v. 146, p. 167-204, 2017.
- BASAL, O. *et al.* Physiology of soybean as affected by PEG-induced drought stress. **Current Plant Biology**, [s. l.], v. 22, p. 100135, 2020.
- BASTOS, E. A. *et al.* Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, CE, v. 42, n. 1, p. 100-107, 2011.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE J. P. Botanical microtechnique and cytochemistry. **Systematic Botany**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 200, 1976.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966
- CARDONA-AYALA, C. *et al.* Growth, biomass distribution, gas exchange and chlorophyll fluorescence in cowpea (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.) under drought conditions. **Australian Journal of Crop Science**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 371-381, 2020.
- CATTALDO, D. A. *et al.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Commun. Soil Sci. and Plant Ann.**, [s. l.], v. 6, p. 71-80, 1975.
- CHAVOUSHI, M. *et al.* Effect of salicylic acid and sodium nitroprusside on growth parameters,

photosynthetic pigments and secondary metabolites of safflower under drought stress. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 259, p. 108823, 2020.

DARKWA, Kwabena et al. Evaluation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for drought stress adaptation in Ethiopia. **The crop journal**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 367-376, 2016.

DARYANTO, S. et al. Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. **PloS one**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. e0156362, 2016.

DU, Y. et al. Effect of drought stress during soybean R2–R6 growth stages on sucrose metabolism in leaf and seed. **International journal of molecular sciences**, China, v. 21, n. 2, p. 618, 2020.

DUBOIS, M. et al. Phenol sulphuric acid method for total carbohydrate. **Anal. Chem.**, [s. l.], v. 26, p. 350, 1956.

FAROOQI, Z. U. R. et al. Regulation of drought stress in plants. In: **Plant life under changing environment**. Academic Press, [S. l.: s. n.], 2020. p. 77-104.

FISCHER FILHO, J. A.; ZOCOLER, J. L. ESTIMATIVA DO COEFICIENTE DE CULTURA (Kc) DO FEIJOEIRO EM ILHA SOLTEIRA, SP. **Revista Engenharia na Agricultura-REVENG**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 229-235, 2016.

FURLAN, A. L. et al. Metabolic features involved in drought stress tolerance mechanisms in peanut nodules and their contribution to biological nitrogen fixation. **Plant Science**, [s. l.], v. 263, p. 12-22, 2017.

GAO, S. et al. Effects of drought stress on growth, physiology and secondary metabolites of Two Adonis species in Northeast China. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 259, p. 108795, 2020.

GUO, Yi et al. Assessing socioeconomic drought based on an improved Multivariate Standardized Reliability and Resilience Index. **Journal of Hydrology**, [s. l.], v. 568, p. 904-918, 2019.

GUPTA, A. et al. The physiology of plant responses to drought. **Science**, [s. l.], v. 368, n. 6488, p. 266-269, 2020.

HE, X. et al. Integrated approaches to understanding and reducing drought impact on food security across scales. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, [s. l.], v. 40, p. 43-54, 2019.

HOURI, T. et al. Heavy metals accumulation effects on the photosynthetic performance of geophytes in Mediterranean reserve. **Journal of King Saud University-Science**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 874-880, 2020.

HUANG, M. et al. Field identification of morphological and physiological traits in two special mutants with strong tolerance and high sensitivity to drought stress in upland rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Integrative Agriculture**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 970-981, 2019.

INMAN-BAMBER, N. G. et al. Increasing sucrose accumulation in sugarcane by manipulating leaf extension and photosynthesis with irrigation. **Australian Journal of Agricultural Research**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 13-26, 2008.

IQBAL, A. et al. High nitrogen enhance drought tolerance in cotton through antioxidant enzymatic activities, nitrogen metabolism and osmotic adjustment. **Plants**, China, v. 9, n. 2, p. 178, 2020.

- JANSSON, J. *et al.* Soil microbiomes and climate change. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 35-46, 2020.
- KHAN, M. *et al.* Proteomic analysis of soybean root including hypocotyl during recovery from drought stress. **Journal of proteomics**, [s. l.], v. 144, p. 39-50, 2016.
- KHODABIN, G. *et al.* Effect of drought stress on certain morphological and physiological characteristics of a resistant and a sensitive canola cultivar. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. e1900399, 2020.
- KUNERT, K. J. *et al.* Drought stress responses in soybean roots and nodules. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, n. 1015, 2016.
- LI, X.; HE, X. *et al.* Temperature alters the response of hydraulic architecture to CO₂ in cotton plants (*Gossypium hirsutum*). **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 172, p. 104004, 2020.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, [s. l.], 1987. p. 350-382.
- MAFAKHERI, A. *et al.* Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. **Australian journal of crop science**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 580-585, 2010.
- MANDA, J. *et al.* The poverty impacts of improved cowpea varieties in Nigeria: A counterfactual analysis. **World Development**, [s. l.], v. 122, p. 261-271, 2019.
- MANGENA, P. Phytocystatins and their potential application in the development of drought tolerance plants in soybeans (*Glycine max* L.). **Protein and Peptide Letters**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 135-144, 2020.
- MATHOBO, R. *et al.* The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agricultural Water Management**, [s. l.], v. 180, p. 118-125, 2017.
- MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clínica chimica acta**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 297-304, 1967.
- MEDEIROS, F. S. *et al.* Biomass production and chemical bromatological composition of jureminha submitted to increasing saline levels. **Archivos de zootecnia**, [s. l.], v. 69, n. 265, p. 54-64, 2020.
- MOMANYI, D. *et al.* Formulation, nutritional and sensory evaluation of baobab based ready-to-eat sorghum and cowpea blend snack bars. **Scientific African**, [s. l.], v. 7, p. e00215, 2020.
- MUNJONJI, L. *et al.* Screening cowpea genotypes for high biological nitrogen fixation and grain yield under drought conditions. **Agronomy Journal**, [s. l.], v. 110, n. 5, p. 1925-1935, 2018.
- MUNJONJI, L. *et al.* Stomatal behavior of cowpea genotypes grown under varying moisture levels. **Sustainability**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 12, 2017.

- NADEEM, M. *et al.* Research progress and perspective on drought stress in legumes: a review. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 2541, 2019.
- NADERI, S. *et al.* Tolerance responses in wheat landrace Bolani are related to enhanced metabolic adjustments under drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 150, p. 244-253, 2020.
- NUNES-NESI, A. *et al.* Natural genetic variation for morphological and molecular determinants of plant growth and yield. **Journal of experimental botany**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 2989-3001, 2016.
- OLIVEIRA, A. D. *et al.* Stomatal conductance as an indicator of water stress in bean. **Engenharia Agrícola**, [s. l.], v. 25, p. 86-95, 2005.
- PANG, J. *et al.* Pattern of water use and seed yield under terminal drought in chickpea genotypes. **Frontiers in plant science**, [s. l.], v. 8, p. 1375, 2017.
- RAIJ, B. V. *et al.* Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. **Campinas: Instituto Agronômico**, Campinas, n. 19, p. 285, 2001.
- RASTI, S. M. *et al.* Morphological and physiological responses of two common bean cultivars to drought stress. **Journal of Plant Process and Function**, [s. l.], v. 6, n. 22, p. 37-46, 2018.
- REDILLAS, M. C. F. R. *et al.* Allantoin accumulation through overexpression of ureide permease1 improves rice growth under limited nitrogen conditions. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 1289-1301, 2019.
- RUCKLE, M. E. *et al.* Diurnal leaf starch content: an orphan trait in forage legumes. **Agronomy**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 16, 2017.
- SALGADO, O. G. G. *et al.* Cerium alleviates drought-induced stress in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Rare Earths**, v. 38, n. 3, p. 324-331, 2020.
- SHEN, H. Healthcare and Big Data Management. **Healthcare and Big Data Management**, [s. l.], v. 1028, n. 1, p. 79–87, 2017.
- TAKAGI, H. *et al.* Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 67, n. 8, p. 2519-2532, 2016.
- THU, S. W. *et al.* Role of ureides in source-to-sink transport of photoassimilates in non-fixing soybean. **Journal of experimental botany**, [s. l.], v. 71, n. 15, p. 4495-4511, 2020.
- VAN, H. E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 280-283, 1968.
- VOGELS, G. D.; VAN D. D., C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 143-157, 1970.

VOOSEN, P. The hunger: Forecast. **Science**, [s. l.], v. 368, n. 6488, p. 226–229, 2020.

VRIES, F. T. *et al.* Harnessing rhizosphere microbiomes for drought-resilient crop production. **Science**, [s. l.], v. 368, n. 6488, p. 270-274, 2020.

WAKEEL, A. *et al.* Chromium-induced reactive oxygen species accumulation by altering the enzymatic antioxidant system and associated cytotoxic, genotoxic, ultrastructural, and photosynthetic changes in plants. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 728, 2020.

YEMM, E. W. *et al.* The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, [s. l.], v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

ZHOU, H. *et al.* Environmental explanation of maize specific leaf area under varying water stress regimes. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 171, p. 103932, 2020.

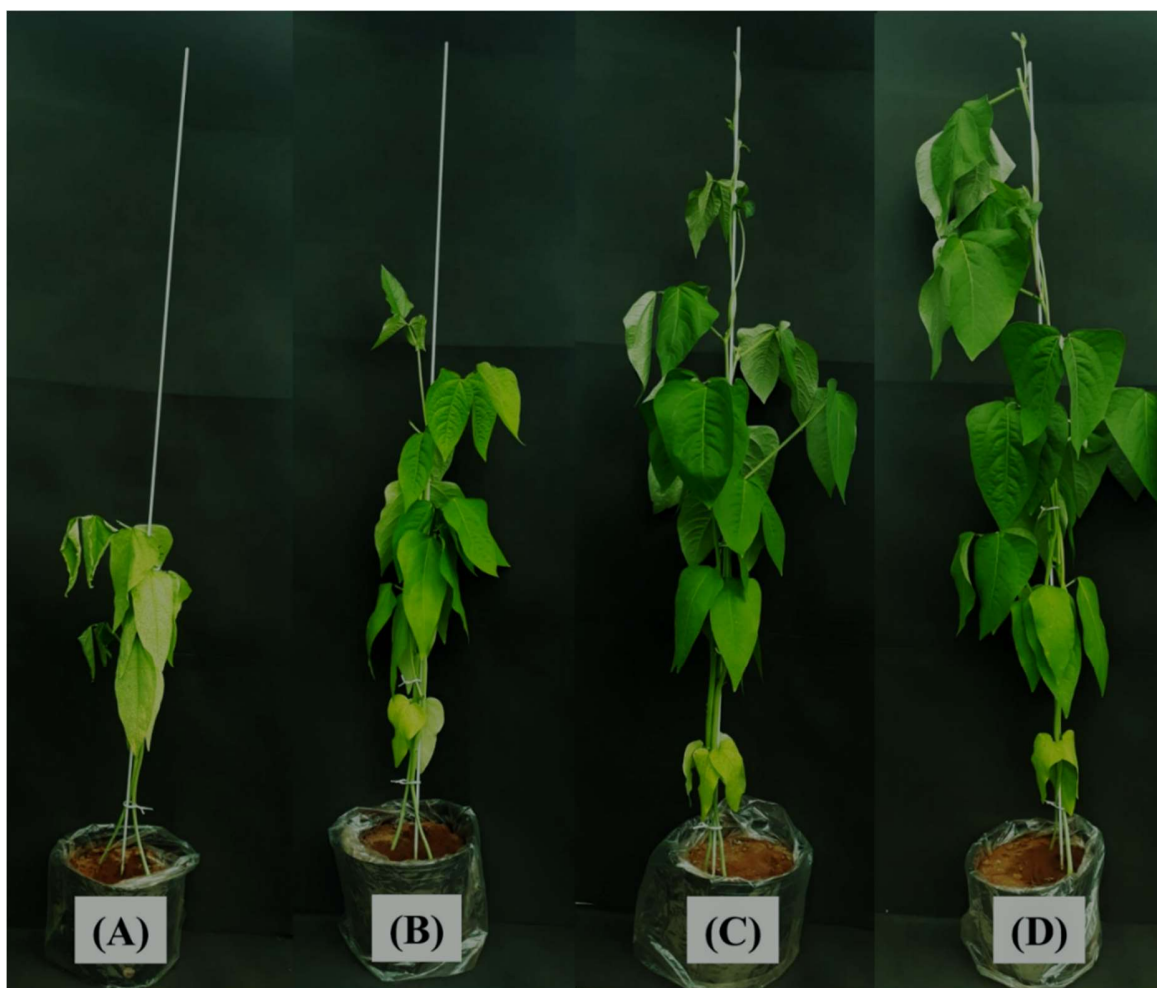


Figure 1. Effect of soil retention of water capacity (SRWC) on growth of cowpea plants, where: 20 % (A), 40 % (B), 60 % (C), and 80 % (D) of SRWC. Drought stress was applied at 20 days after seed sowing. The pictures were taken at 18 days after water deficit stress treatment.

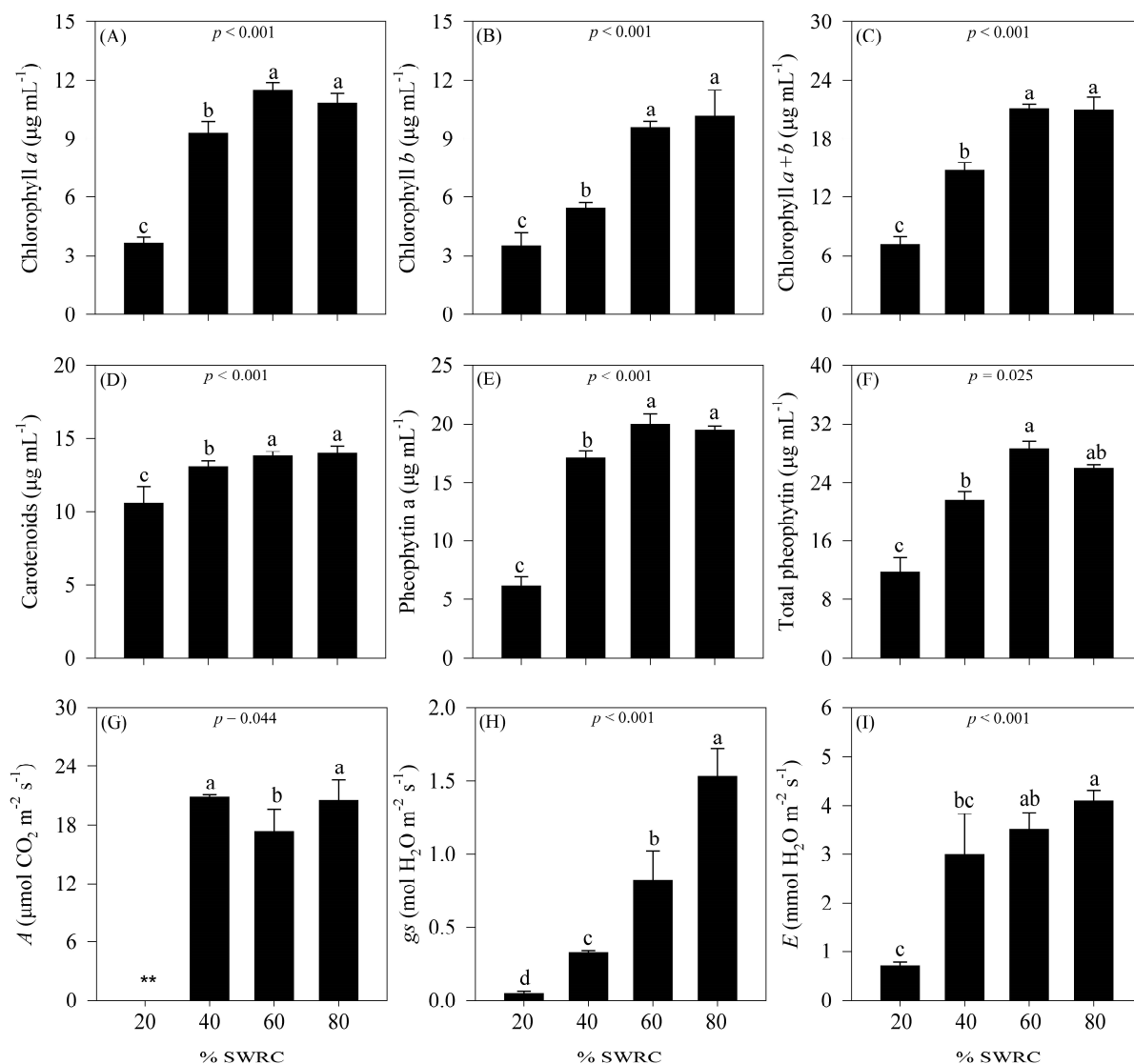


Figure 2. Effect of soil retention of water capacity (SRWC) on chlorophyll *a* (A), chlorophyll *b* (B), total chlorophyll (C), carotenoids (D), pheophytin *a* (E) and total pheophytin (F), photosynthesis (G), stomatal conductance (H), transpiration (I) of cowpea leaves after 18 days of water deficit treatments. Letters classify the means according to Tukey test at a 5% error probability. The bars represent the standard deviation of the mean ($n = 4$).

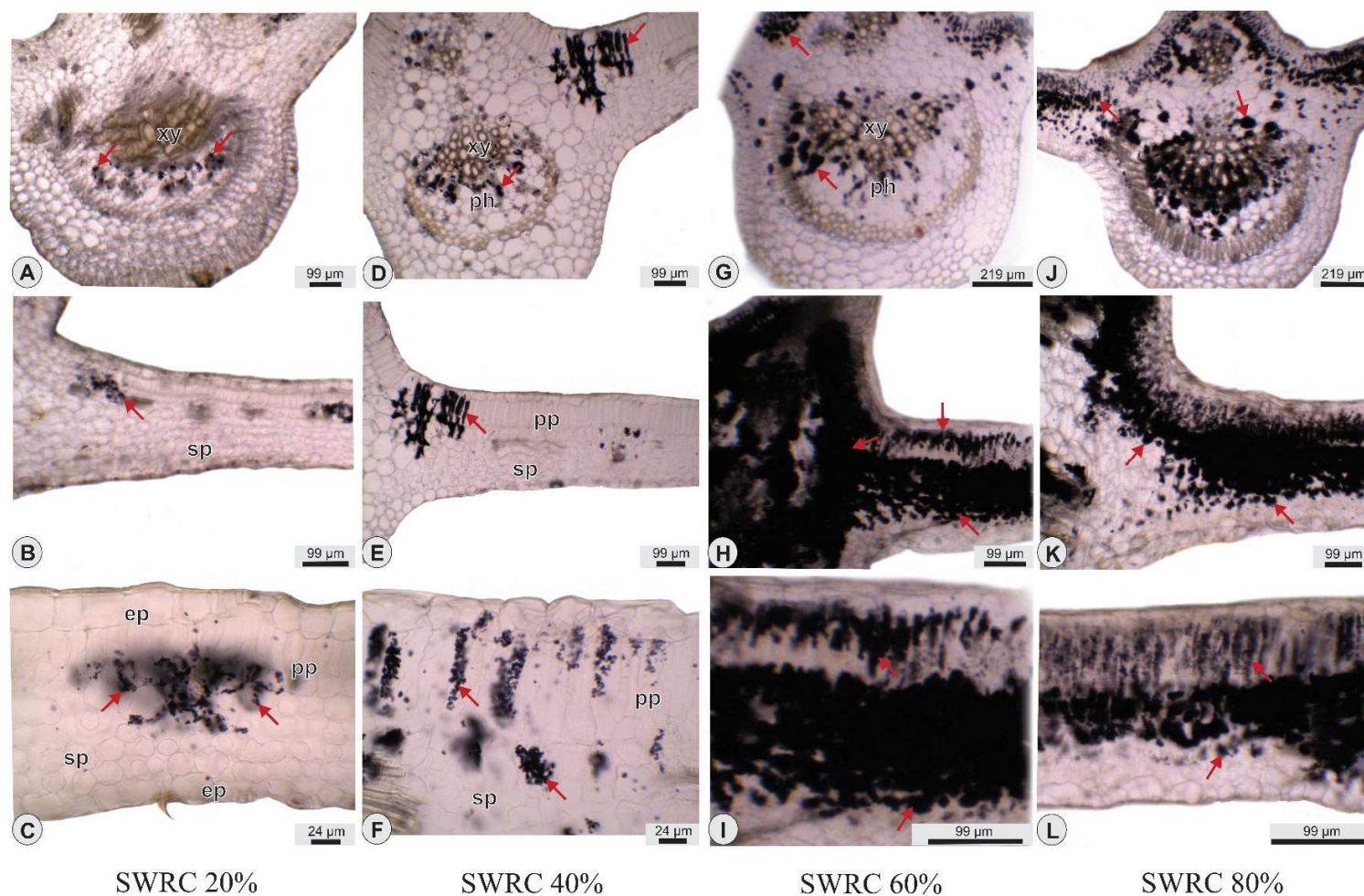


Figure 3. Starch abundance in cowpea leaves exposed to different soil water retention capacity (SWRC), where; (A, B, C exposed to 20% SWRC), (D, E, F exposed to 40% SWRC), (G, H, I, exposed to 60% SWRC), and (J, K, L exposed to 80% SWRC). Lugol staining reveal the starch accumulation in leaf tissue organs: xy (xylem), ph (phloem), ep (epidermis), pp (palisade parenchyma), sp (spongy parenchyma).

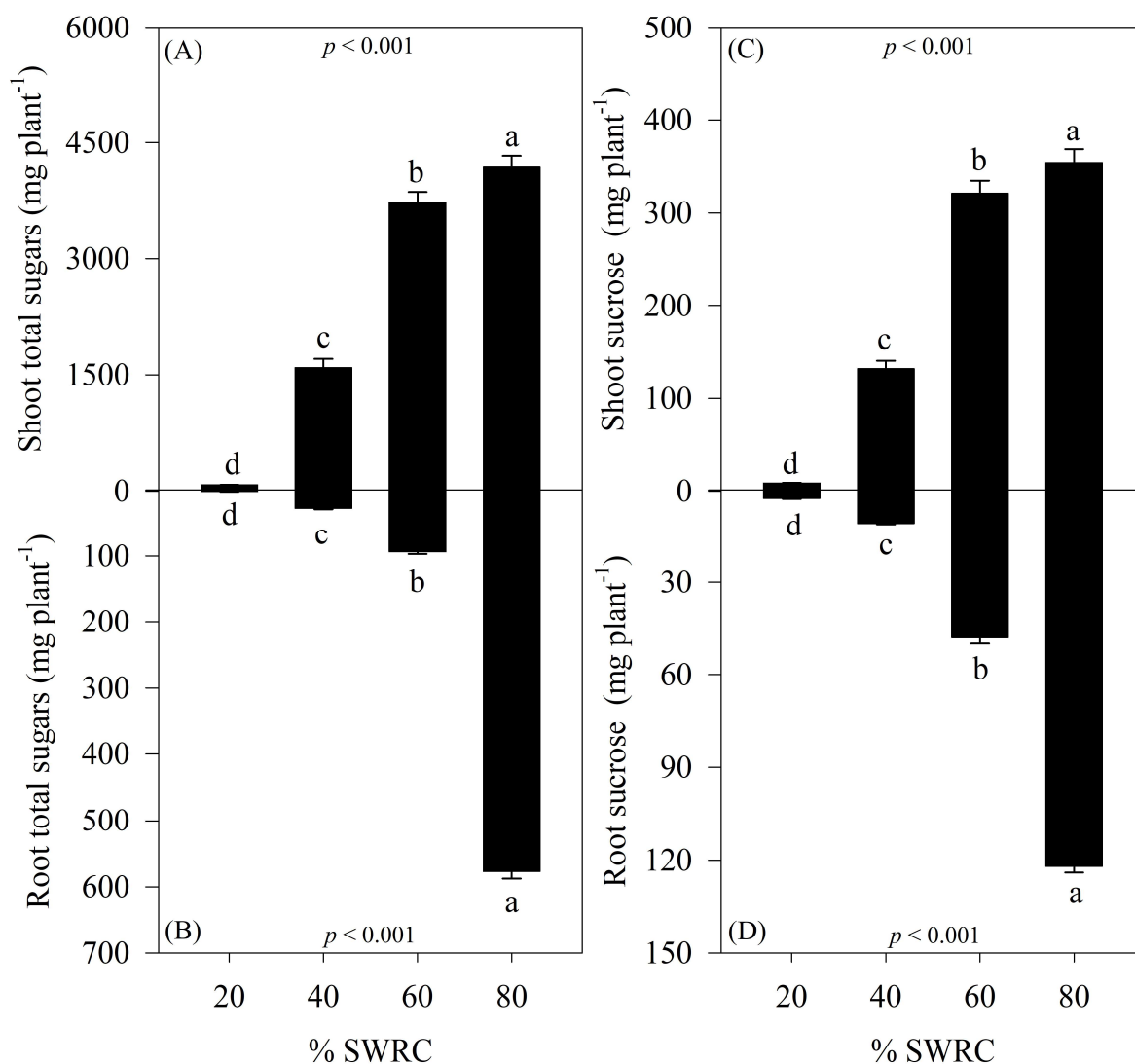


Figure 4. Effect of soil retention of water capacity (SRWC) on shoot total sugars (A), shoot sucrose (B), root total sugars (D), and root sucrose (E) accumulation of cowpea plants after 18 days of water deficit treatments. Letters classify the means according to Tukey test at a 5% error probability. The bars represent the standard deviation of the mean ($n = 4$).

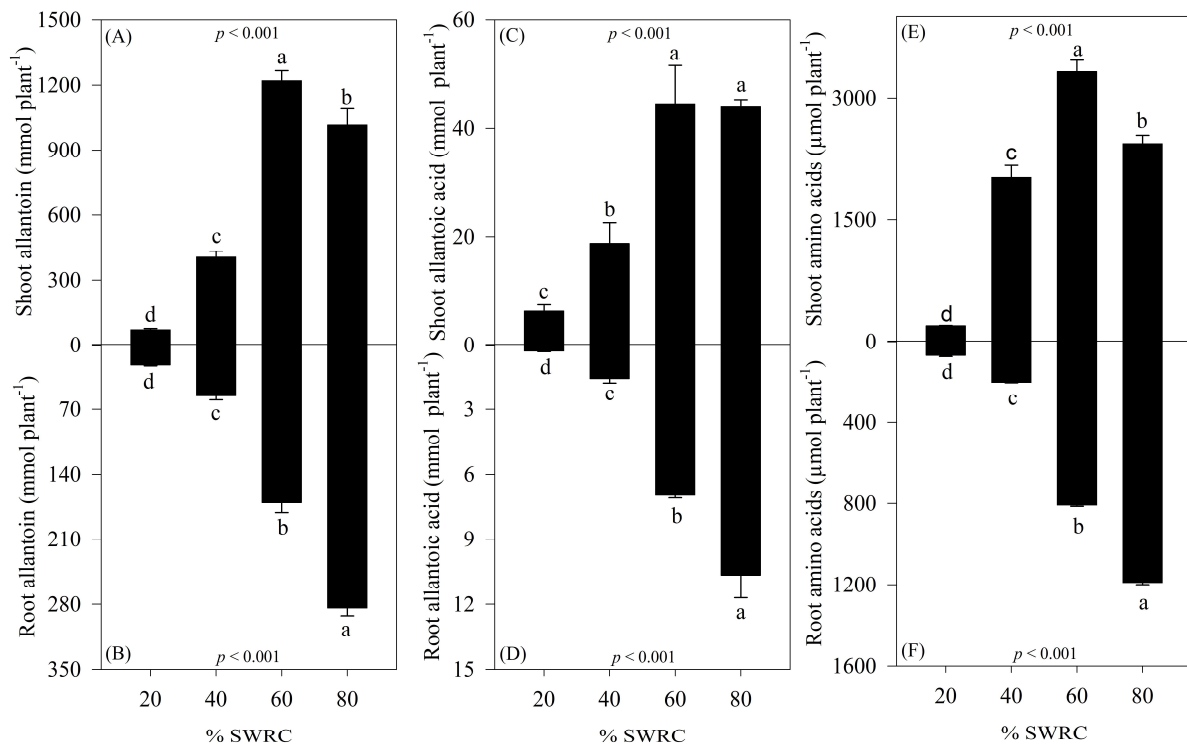


Figure 5. Effect of soil retention of water capacity (SRWC) on shoot allantoin (A), root allantoin (B), shoot allantoic acid (C), root allantoic acid (D), shoot amino acids (E), and root amino acids (F) accumulation of cowpea plants after 18 days of water deficit treatments. Letters classify the means according to Tukey test at a 5% error probability. The bars represent the standard deviation of the mean ($n = 4$).

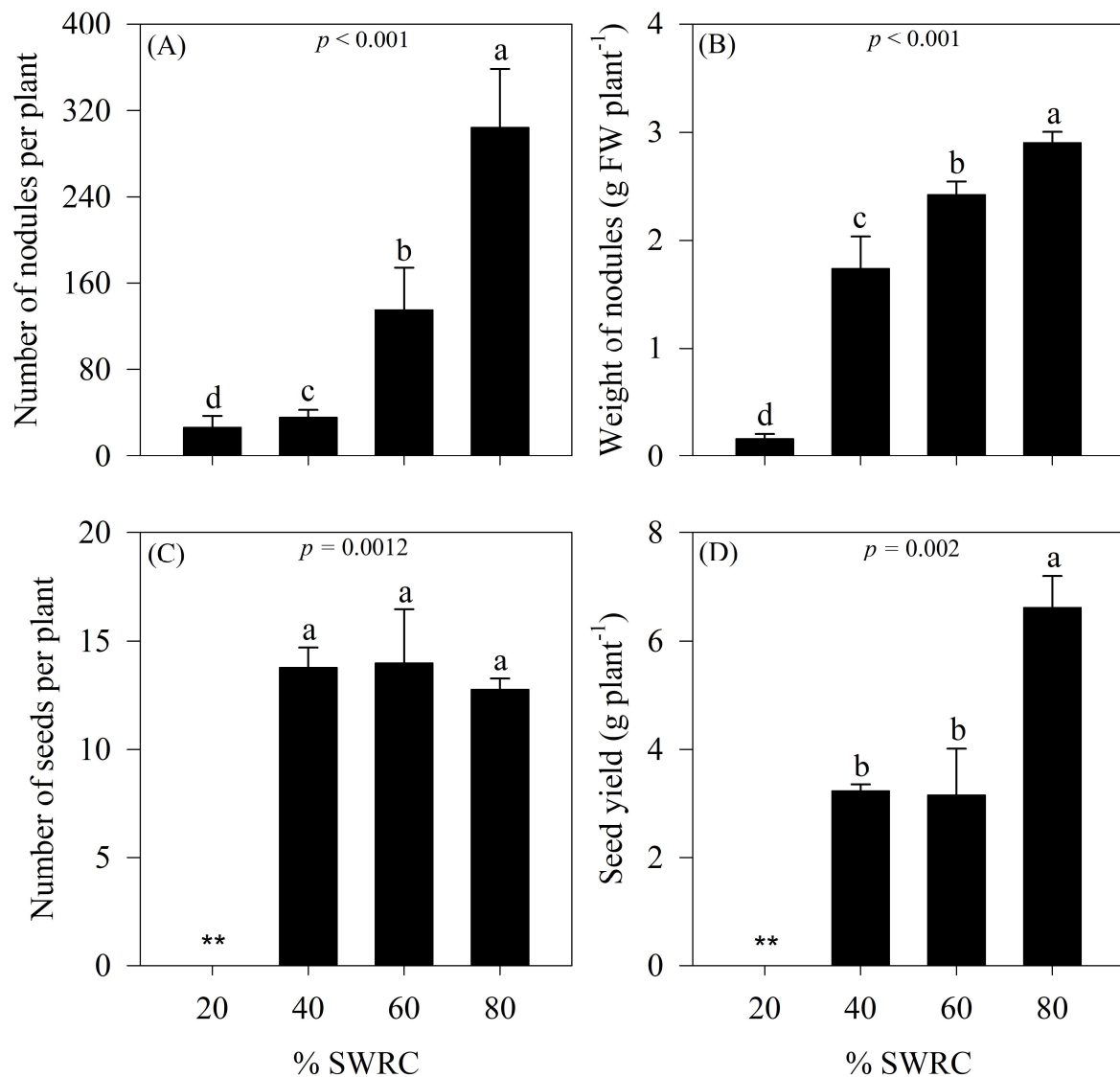


Figure 6. Effect of soil retention of water capacity (SRWC) on nodules per plant (A), weight of nodules per plant (B), number of seeds per plant (D), and seed yield (E) of cowpea plants after 18 days of water deficit treatments. Letters classify the means according to Tukey test at a 5% error probability. The bars represent the standard deviation of the mean ($n = 4$).

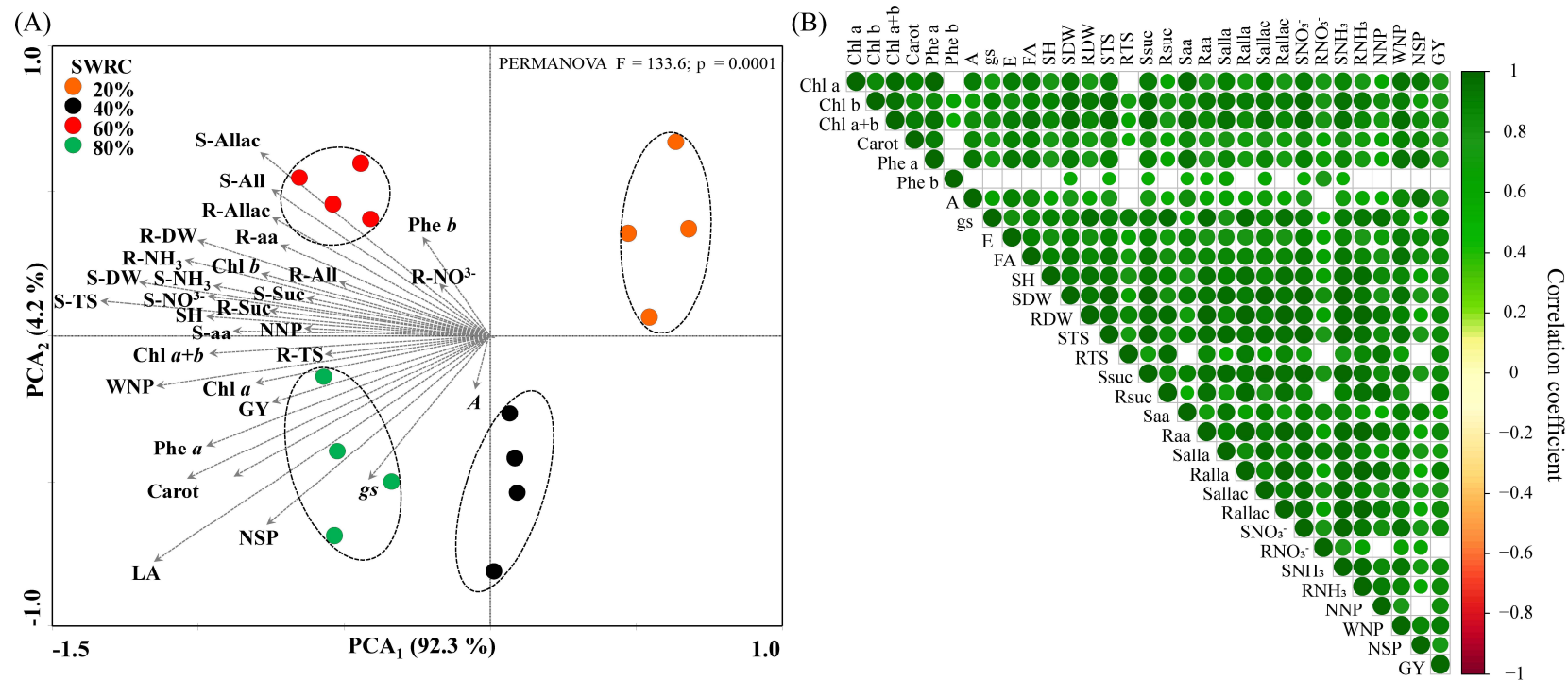
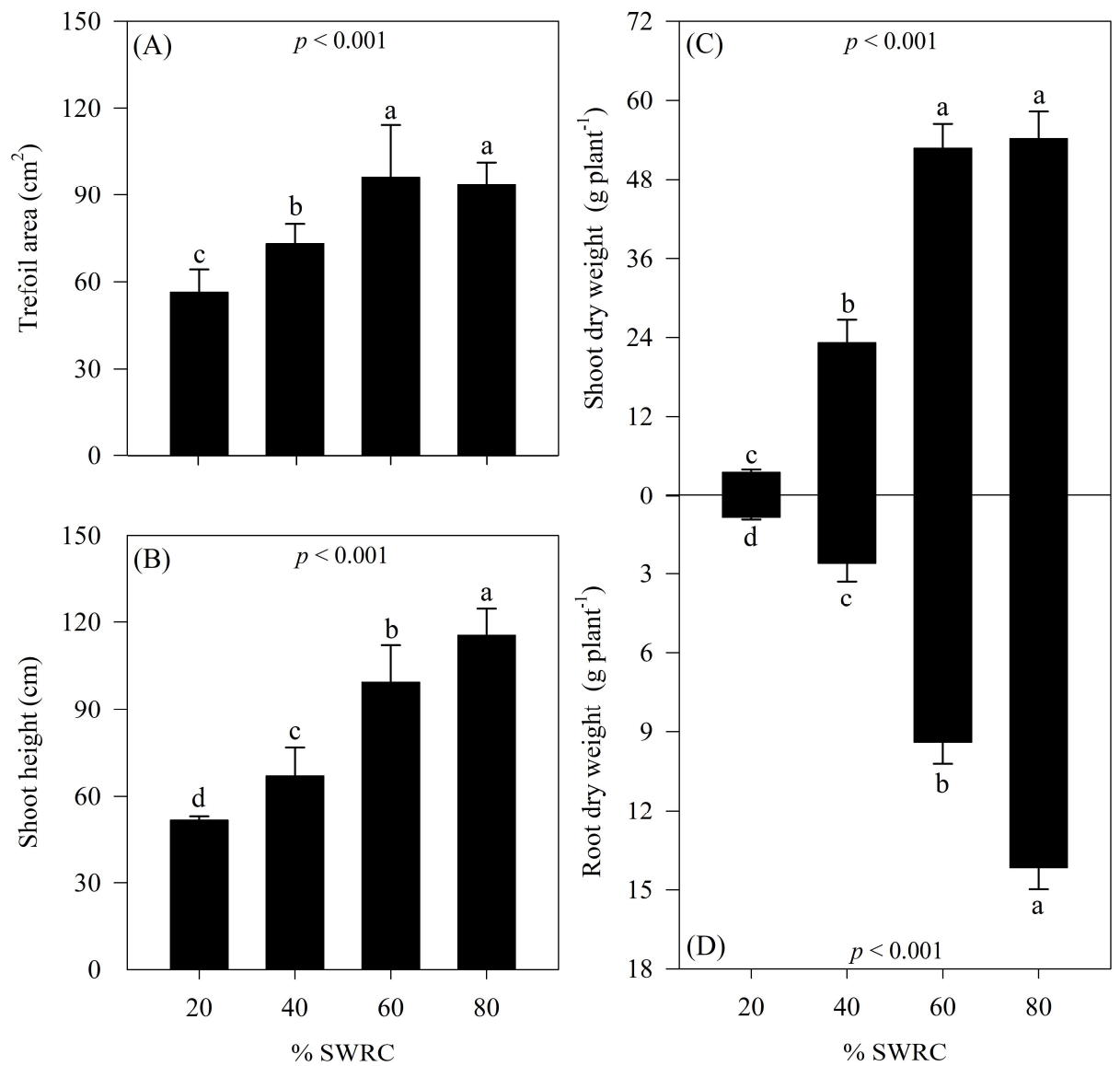
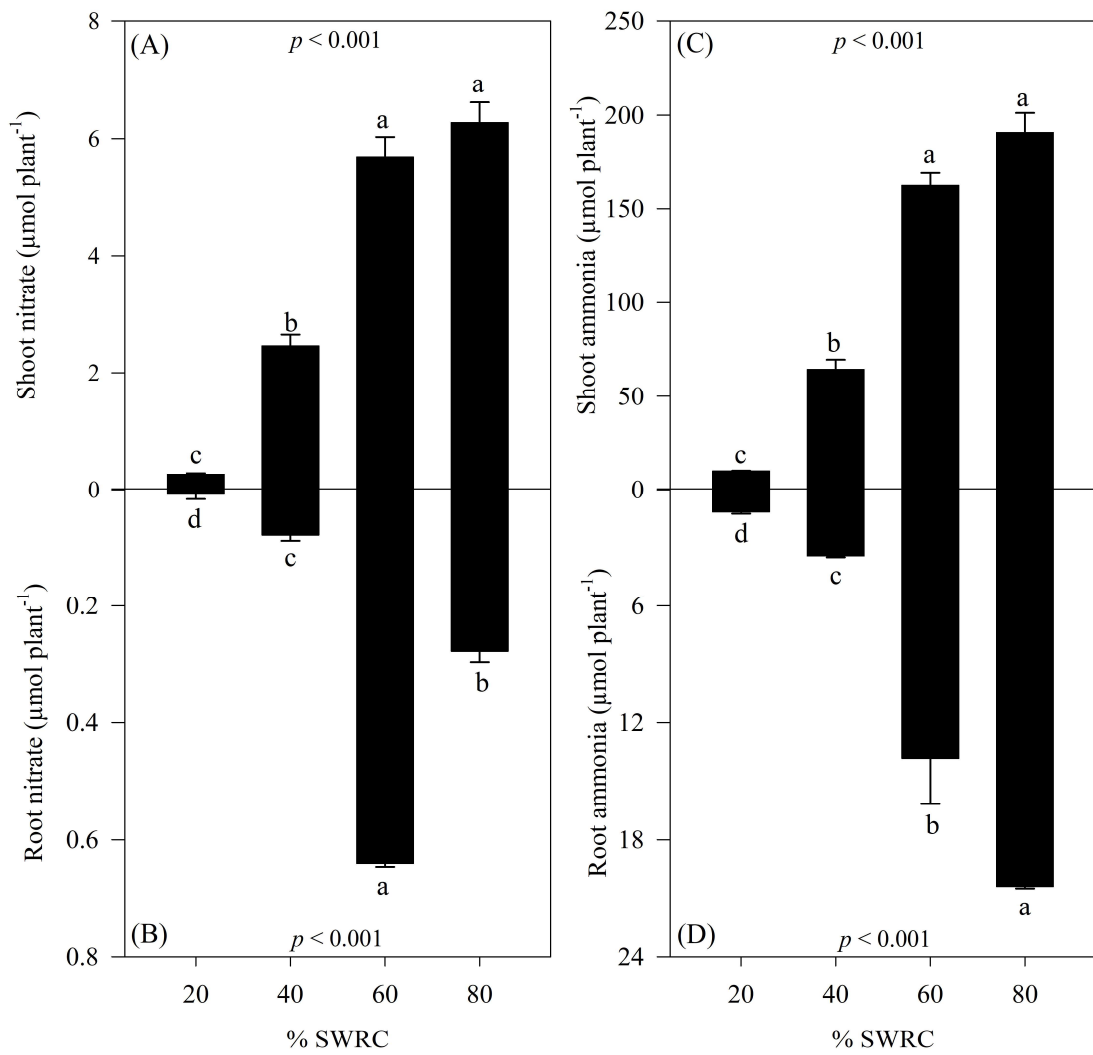


Figure 7. Principal component analysis (PCA) showing a set of observations of possibly correlated variables into a set of values of linearly uncorrelated variables (A), and a heatmap showing the Pearson's correlation coefficients obtained from parameters measured from cowpea plants. Green scale means the significant positive correlation ($p < 0.05$). Abbreviations: Chl *a* – chlorophyll *a*, chl *b* – chlorophyll *b*, chl *a+b* – total chlorophyll, carot – carotenoids, phe *a* – pheophytin *a*, pheo *b* – pheophytin *b*, LA – leaf area, SH – shoot height, S-DW – shoot dry weight, R-DW – root dry weight, S-TS – shoot total sugars, R-TS – root total sugars, S-Suc – shoot sucrose, R-Suc – root sucrose, S-aa – shoot amino acids, R-aa – root amino acids, S-All – shoot allantoin, R-All – root allantoin, S-Allac – shoot allantoic acid, R-Allac – root allantoic acid, S-NO₃ – shoot nitrate, R-NO₃ – root nitrate, S-NH₃ – shoot ammonia, R-NH₃ – root ammonia, NNP – number of nodule per plant, WNP – weight of nodule per plant, NSP – number of seeds per plant, A – photosynthesis, gs – stomatal conductance, E – transpiration, GY – grain yield.



Supplementary material 1. Effect of soil retention of water capacity (SRWC) on foliar area (A), shoot height (B), shoot dry weight (C), and root dry weight (D) of cowpea plants after 18 days of water deficit treatments. Letters classify the means according to Tukey test at a 5% error probability. The bars represent the standard deviation of the mean ($n = 4$).



Supplementary material 2. Effect of soil retention of water capacity (SRWC) on shoot nitrate (A), shoot ammonia (B), root nitrate (C), and root ammonia (D) accumulation in cowpea plants after 18 days after treatment. Letters classify the means according to Tukey test at a 5% error probability. The bars represent the standard deviation of the mean ($n = 4$).

3 RESPOSTAS MORFO-ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI SENSÍVEIS E TOLERANTES AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

O déficit hídrico é dos principais estresses abióticos associados à redução da produção de alimentos no mundo. O feijão-caupi é a principal fonte de proteína em regiões áridas e em países em desenvolvimento. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta morfofisiológica e bioquímica de genótipos de feijão caupi, sensíveis: BRS Tracuateua (G1) e BRS Tumucumaque (G2), e tolerantes: Pingo de ouro 1-2 (G3) e BRS Marataoã (G4) submetidos ao déficit hídrico (CAD 40%) ou não (CAD 80%) em delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições. A restrição hídrica se iniciou após 20 dias de plantio e no estágio R1 foram realizadas as análises biométricas, compostos nitrogenados, enzimas antioxidativas, fotossíntese de 4 repetições, e ao final do ciclo foi avaliado a produção das outras 4 repetições. Os nódulos foram processados anatomicamente e testes histoquímicos foram conduzidos. Todos os genótipos apresentaram redução na massa fresca e seca da parte aérea, entretanto os genótipos tolerantes a seca apresentaram a capacidade de reduzir a condutância estomática (gs), aumentar a taxa fotossintética (A) e eficiência no uso da água (WEU). Anatomicamente, verificamos uma redução nas células do córtex de genótipos sensíveis sob estresse hídrico se comparada com a CAD80%. Essa região do nódulo possui características de parênquima aquífero. Os testes histoquímicos ilustraram haver gotas de proteínas nas células não infectadas adjacentes às infectadas e que as paredes das células são ricas em pectina. Os genótipos sensíveis reduziram drasticamente as A e WEU em resposta ao estresse por seca. Apesar de ocorrer redução no número de nódulos dos genótipos tolerantes eles apresentaram nódulos maiores, esses genótipos apresentaram maior acúmulo de compostos nitrogenados (alantoína, ácido alantóico, nitrato, amônia e aminoácidos). Houve mitigação de espécies reativas de oxigênio pelo aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, maior concentração de sorbitol, frutose, sacarose que refletiu no aumento dos compostos nitrogenados e produtividade. A análise de cluster determinou agrupamento entre os genótipos sensíveis (G1 e G2) e os tolerantes (G3 e G4), as variáveis que possibilitou o agrupamento entre os genótipos tolerantes foram condutância estomática, fotossíntese e o acúmulo de sacarose, glicose, sorbitol e frutose nas raízes.

Palavras chave: taxa fotossintética, mecanismo de resistência, compostos nitrogenados, *Vigna unguiculata*

3.1 INTRODUÇÃO

A seca é considerada um dos perigos naturais mais complexos de monitorar devido ao seu início lento e impactos de longo prazo (ROJAS, 2020). A previsão é que a incidência e severidade aumentarão no futuro próximo como resultado das mudanças climáticas globais que direcionará para um declínio rigoroso na produção geral de alimentos (ANWAAR *et al.*, 2020). A estimativa populacional é mais 9 bilhões em 2050 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2020), o que promove uma elevada demanda mundial por alimento, portanto, encontrar soluções para o aumento da produtividade agrícola mesmo em situação de estresse é de extrema importância.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L., Walp.)) é uma importante fonte de proteína (WENG *et al.*, 2017), e está entre os alimentos mais ricos em nutrientes com potencial para promover a segurança alimentar e nutricional na África Subsaariana (OWADE *et al.*, 2020). Apesar de ser uma cultura que apresenta alta plasticidade, a falta de água durante estágios de crescimento pode ser prejudicial para a produção (MUNJONJI *et al.*, 2017). Além disso, o feijão-caupi é uma leguminosa de grãos promíscua que forma simbiose com uma ampla gama de cepas de bactéria do gênero *Rhizobia*, formando a base para a fixação biológica de nitrogênio (SMITH *et al.*, 2016).

O estresse hídrico altera drasticamente as relações hídricas e o potencial osmótico, desencadeando a resposta ao estresse multifacetada (SAÑKO-SAWCZENKO *et al.*, 2019). A perda de água em situação de seca ocasiona diminuição do potencial hídrico (LAXA *et al.*, 2019), afeta a abertura e fechamento estomático, causando ruptura do processo fisiológico (REN *et al.*, 2021) e elevada produção de espécies reativas ao oxigênio (EROS), como O_2^- e H_2O_2 (ARSLAN *et al.*, 2021). Para se defender as plantas desenvolveram uma série de mecanismos antioxidante, a superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima na linha de defesa contra as EROs no sistema antioxidante, sendo responsável por eliminar os O_2^- e convertê-los em H_2O_2 (Foyer, 2018). O H_2O_2 por sua vez é convertido em água, pela enzima antioxidante catalase (CAT) e peroxidase (POX) (Ighodaro and Akinloye, 2018).

A fotossíntese é um processo importante para a síntese de produtos de assimilação, mas é extremamente sensível às condições de déficit hídrico (LI *et al.*, 2021). Os produtos de

assimilação resultantes da fotossíntese atuam como fonte de energia e regulam as vias de sinalização celular envolvidas no metabolismo e desenvolvimento das plantas (RUAN *et al.*, 2010). A redução do processo fotossintético causado pela seca afeta drasticamente o transporte de açúcares dentro das plantas, essa baixa distribuição impossibilita o desenvolvimento e produtividade das culturas (DU *et al.*, 2020a).

Comumente a demanda por assimilados na formação e crescimento dos nódulos são supridas pelos produtos resultantes da fotossíntese (FISCHINGER; SCHULZE, 2010). Em contrapartida as bactérias dos nódulos conseguem fixar parte do nitrogênio necessário para o desenvolvimento do feijão caupi. O N_2 entra nos bacteróides e é reduzido a amônia pela enzima nitrogenase (COLLIER; TEGEDER, 2012). A amônia é então liberada no citosol da célula do nódulo infectada através da membrana peribacteróide e assimilada à glutamina (MASALKAR *et al.*, 2010). A glutamina é canalizada para as vias de síntese e degradação das purinas e, finalmente, o ácido úrico é sintetizado (SMITH; ATKINS, 2002). Após o movimento simplasmático para as células não infectadas, o ácido úrico é usado para a síntese de alantoína e o ácido alantóico (TODD *et al.*, 2006). Uma vez que os ureídeos começam a se acumular nas células não infectadas do nódulo são carregados pelo sistema vascular do xilema e então transportados (BARAL *et al.*, 2014). Para que esse processo ocorra é necessário energia para o nódulo, no entanto, a indisponibilidade de água pode levar ao acúmulo de sacarose nas folhas e a um distúrbio do equilíbrio metabólico da sacarose (DU *et al.*, 2020a), dificultando a distribuição para o restante das plantas, afetando o desenvolvimento e estruturação dos nódulos (KOUCHI; YONEYAMA, 1984).

Existe uma diversidade de tipos de nódulos, no entanto as principais características anatômicas dos nódulos de leguminosas são: indução de um novo meristema de planta normalmente envolvendo células corticais de raiz, invasão de tecidos e células por *Rhizobium*, desenvolvimento de tecido vascular periférico localizado fora da zona de infecção (Brewin, 1991). O córtex interno do feijão-caupi possui uma camada de células semelhante à endoderme (SEN *et al.*, 1986). James *et al.* (1993) sugeriram que o córtex bem desenvolvido em nódulo de soja (*Glycine max*) pode atuar como uma barreira iônica.

É importante compreender de que maneira o estresse hídrico interfere no desenvolvimento dos nódulos. Nesta pesquisa, mostramos mudanças fisiológicas de quatro genótipos de feijão-caupi: BRS Tracuateua (G1 – sensível), BRS Tumucumaque (G2 – sensível), Pingo de ouro 1-2 (G3 - tolerante) e BRS Marataoã (G4 - tolerante) (BASTOS *et al.*, 2011; DUTRA *et al.*, 2015) e como essas alterações modificaram os processos bioquímicos das plantas. Espécies e cultivares comportam-se de forma diferente em situação de estresse, é de extrema importância

compreender as respostas metabólicas e anatômicas que tornam genótipos tolerantes, sendo a realização de estudos necessária para contribuição no desenvolvimento de genótipos capazes de produzir grãos mesmo com baixa disponibilidade de água.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na casa de vegetação da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Ilha Solteira, localizada na cidade de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil (20° 25' 4.65" S, 51° 20' 27.89" O, 377 m). Antes da instalação do experimento foram coletadas amostras de solo, na camada 0,0 a 0,2 m da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNESP para determinação das características químicas, de acordo com (Raij *et al.*, 2001). As amostras foram encaminhadas ao laboratório de fertilidade do solo para análises químicas, não sendo necessária a calagem. As propriedades químicas observadas foram: pH: 4,9; P: 2 mg/dm³, K: 0,4 mmol/dm³, Ca: 4 mmol/dm³, Mg: 4 mmol/dm³, B: 0,02 mg/dm³, Cu: 0,5 mg/dm³, Fe: 15 mg/dm³, Mn: 4,9, Zn: 0,1 mg/dm³, H+Al: 12 mmol/dm³, CTC: 20,4 mmol/dm³, MO: 12 g/dm. O solo foi classificado como Rhodic Haplustox de acordo com (SOIL SURVEY STAFF, 2014).

A adubação de semeadura foi realizada de acordo com a análise do solo com as recomendações de (RAIJ *et al.*, 2001) sendo: 90 mg/kg P₂O₅ na forma de superfosfato simples, 60 mg/kg K₂O na forma de cloreto de potássio, 2,5 mg/kg de Zn na forma de sulfato de zinco, 2,86 mg/kg de B na forma de ácido bórico, 0,5 mg/kg de Co de solo na forma de cloreto de cobalto, 0,5 mg/kg de Mo de solo na forma de molibdato de amônio. Após 15 dias de plantio, foi realizada adubação de cobertura, sendo 50 mg/kg de N, na forma de uréia. As sementes de feijão-caupi foram semeadas no dia 22/04/2020 em vasos de polietileno contendo exatamente 3 kg de solo (mantendo duas plantas por vaso). As sementes foram tratadas com piraclostrobina (25 g L⁻¹ produto comercial), tiofanato-metil (225 g L⁻¹ produto comercial) e fipronil (250 g L⁻¹ produto comercial) em 2 mL de produto por kg de semente. Após a secagem, as sementes foram inoculadas com um inóculo de turfa premium para o feijão-caupi (cepa SEMIA 6464; número de registro do produto SP 00581-10030-1; BIOMAX; cidade de São Joaquim da Barra, Brasil) com 8 g kg⁻¹ de semente, objetivando atingir $2,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias g⁻¹. Devido a fenologia do caupi foi necessário realizar o tutoramento das plantas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando 2 níveis de capacidades de água disponível no solo (40% e 80% da CAD) (Carvalho *et al.*, 2019) e 4 genótipos de feijão-caupi: BRS Tracuateua (G1 - sensível), BRS Tumucumaque (G2 - sensível),

Pingo de ouro 1-2 (G3- tolerante) e BRS Marataoã (G4 - tolerante), contendo 8 repetições por tratamento. O solo foi mantido a 80% da CAD até 20 dias após a semeadura, na sequência foi iniciado o regime de restrição hídrica. A reposição hídrica foi feita a cada 24 horas utilizando o método de gravimetria.

3.3 COLETA DE AMOSTRAS

As coletas de plantas para análises fisiológicas foram realizadas no estágio fenológico R₁ (plantas contendo o primeiro botão floral no ramo principal) (Bastos *et al.*, 2011). O estágio fenológico R₁ foi escolhido para a coleta de amostras porque este estágio representa o máximo status fisiológico das plantas (e.g., máximo acúmulo de fotoassimilados, nutrientes e compostos nitrogenados) (MUNJONJI *et al.*, 2017). No florescimento as plantas foram separadas em raiz, nódulo e parte aérea. As raízes e nódulos foram lavadas em água corrente e depois em água deionizada, foi realizada a quantificação de nódulos. As amostras vegetais foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C até atingir peso constante. Os materiais vegetais foram pesados e os valores expressos em g planta⁻¹.

3.4 ANATOMIA DOS NÓDULOS

Os nódulos mais representativos foram coletados dentro de cada tratamento. Eles foram seccionados transversalmente na região mediana com ajuda de um bisturi e então fixados em solução de Karnovsky (2% paraformaldehyde, 2,5% glutaraldehyde, 0.05M CaCl₂ in 0.2 M cacodylate buffer of pH 7.2.) - por 24 h (Karnovsky, 1965). Nesse período, as amostras foram colocadas em bomba de vácuo por 15 minutos por 5 vezes e agitadas para melhor penetração do fixador. Os nódulos foram então desidratados por meio de uma série de álcool graduado (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 e 100%), 15 minutos em cada etapa e incorporado em resina plástica (Leica Historesin®, Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha). Nessa etapa, as amostras foram submetidas à bomba de vácuo por 10 vezes e as amostras foram continuamente agitadas. A etapa de infiltração em resina pura levou 4 dias. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotacional Leica RM 2045 com espessura de 5-7 µm. Para as análises histológicas usuais, parte dos cortes transversais foram montados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina (SAKAI, 1973). Testes histoquímicos de proteínas totais (detecção de radical catiônico total) foi realizado com Xylidine Ponceau 0,1% (VIDAL, 1970).

Após a coloração, as lâminas foram montadas com resina sintética Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). As imagens das lâminas foram capturadas digitalmente por meio de um microscópio Zeiss Axionscope com uma câmera de vídeo acoplada. As escalas micrométricas foram impressas diretamente nas imagens.

3.5 ESTIMATIVA DE PRODUÇÃO

No final do experimento, as vagens foram coletadas, armazenadas em saco de papel e secadas. Em seguida, os materiais foram colocados em estufa com ventilação forçada por 72 h a 65 °C até obter massa constante. Após pesagem determinou-se a produtividade de grãos a 13% de umidade (g planta⁻¹).

3.6 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS

Para análise de perfil de compostos nitrogenados o material vegetal foi extraído de acordo com a metodologia descrita por (Bielecki and Turner, 1966).

3.6.1 Determinação de ureídeos

Para a determinação de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) foi utilizado o método de (VOGELS; VAN DER DRIFT, 1970).

3.6.2 Aminoácidos

Para quantificar a concentração de aminoácidos solúveis totais, foi utilizado o método de (YEMM *et al.*, 1955).

3.6.3 Nitrato e amônia

Para a determinação de nitrato foi utilizado o método de (CATALDO *et al.*, 1975).

3.7 DETERMINAÇÃO DE TROCAS GASOSAS E EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA

A determinação das trocas gasosas foi realizada em aparelho portátil de troca gasosa (Infra Red Gas Analyzer –IRGA, marca ADC BioScientific Ltd, modelo LC-Pro) de acordo com (SANTOS *et al.*, 2017). Os seguintes parâmetros foram determinados: taxa fotossintética líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 na sub câmara estomática ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) e taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Para as medições, as condições padrão utilizadas foram: $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), fornecida por lâmpadas LED, 380 ppm de CO_2 e temperatura da câmara de 28°C , segundo (JIANG; XU, 2001).

A eficiência do uso da água foi calculada pela razão entre a taxa fotossintética e a taxa de transpiração. A EUA é um parâmetro fisiológico que expressa quantitativamente o comportamento momentâneo das trocas gasosas na folha e que varia entre e dentro das espécies vegetais (LARCHER, 2000).

3.8 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A avaliação da peroxidação lipídica foi determinada por meio da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído (MDA), segundo (Heath and Packer, 1968). A concentração de H_2O_2 foi determinada, de acordo com (ALEXIEVA *et al.*, 2001).

3.9 ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E ATIVIDADE DE ENZIMAS

Para avaliar a concentração de proteínas, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX), a amostragem foi realizada 50 DAP, 30 DAT. Dez folhas trifolioladas do terço superior das plantas foram coletadas aleatoriamente em cada vaso. O material foi congelado rapidamente em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C . Pesou-se 1,5 g de material fresco e adicionou 4 mL de tampão de fosfato de potássio 0,1 M a pH 7,5 contendo ditioneitol 3 mM e ácido etilenodiaminotetracético 1 mM. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi então mantido a -80°C .

Para a análise de proteínas, a absorbância foi registrada em 595 nm usando um espectrofotômetro. A determinação das proteínas foi realizada de acordo com (Bradford, 1976),

utilizando alíquota de 5 μL , a curva de calibração foi feita com albumina, e o resultado foi expresso em $\text{mg g}^{-1} \text{FW}$.

A determinação da atividade do APX foi realizada de acordo com (Gratão *et al.*, 2008). Primeiramente, foi feita uma solução contendo 600 μL de tampão de fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0) + 100 μL de ácido ascórbico 5 mM e 100 μL de EDTA 1 mM. A solução foi mantida em banho-maria a 30 °C durante 10 min. Em seguida, foram adicionados 100 μL de H_2O_2 0,1 mM e 10 μL de extrato protéico. O extrato foi agitado rapidamente e imediatamente analisado em espectrofotômetro a 290 nm por 1 min. Os resultados foram expressos como $\text{nmol min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da CAT foi determinada usando a metodologia de (Azevedo *et al.*, 1998). Em tubos eppendorf, foi adicionado 1 mL de tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5) e 2,5 μL de H_2O_2 30%, seguido de 20 μL de extrato protéico. Imediatamente após a adição do extrato proteico, os tubos foram rapidamente misturados por vórtex. A atividade da enzima foi determinada monitorando o registro de absorbância a 240 nm em um intervalo de 1 min usando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da SOD foi medida pelo método de (Giannopolitis and Ries, 1977). Para a reação enzimática foi utilizado 50 μL do sobrenadante em seguida adicionado 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8 (50 mM), 250 μL de metionina 13 mM (13 mM), 200 μL de nitroblue de tetrazólio 75 mM (NBT) (75 mM), 200 μL de EDTA 0,1 mM (0,1 mM) e 250 μL de riboflavina 2 μM (2 μM). As amostras foram homogeneizadas por vórtex e mantidas dentro da caixa iluminada por 25 min. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas novamente e registradas para leitura de absorbância em $\lambda = 560 \text{ nm}$ em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em $\text{U SOD mg}^{-1} \text{proteína}$.

3.10 ANÁLISE DO PERFIL DE AÇÚCARES

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da Shimadzu, modelo Prominence equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo RID-20^a. Os pontos da curva foram obtidos pela injeção de 5 μL da solução padrão em diferentes concentrações, utilizando um amostrador automático modelo SIL-10AF. O sistema é equipado com uma coluna Shim-Pack GIST NH2 com dimensões de 4,6 x 250 mm e diâmetro de partícula de 5 μm , a 40°C. A fase móvel foi composta de uma solução 90% de

acetonitrila. O método foi realizado em 25 minutos em modo socrático com fluxo de 1 mL min⁻¹.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por meio do Software R (R Development Core Team 2015, v. 3.6), os dados foram submetidos aos testes de normalidade proposto por (Shapiro and Wilk, 1965) e homocedasticidade de Levene, ambos a 5% de significância ($p > 0,05$). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$), e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$). A análise de correlação de Pearson ($p < 0,05$) também foi realizada para identificar variáveis dependentes que são diretamente correlacionadas com os tratamentos. O pacote “corrplot” foi utilizado para criar o Heatmap, com funções “cor” e “cor.mtest” para criar os coeficientes e matrizes de p-valores. Para realização do agrupamento clustering, foram utilizados os pacotes: RColorBrewer, gplots, pheatmap, d3heatmap, dendextend, ComplexHeatmap, circlize e cluster.

3.12 RESULTADOS

3.12.1 Efeito do estresse hídrico no crescimento do feijão-caupi

O estresse por déficit hídrico resultou na diminuição da área foliar em todos os genótipos dentro de 40% da SWRC. Além disso, folhas velhas caíram nos genótipos G3 e G4 (Figura 1). O peso fresco (Figura 2AD) e o peso seco (Figura 2BE) diminuíram em todos os genótipos estudados. Com base na diferença de peso da matéria fresca e do peso da matéria seca, é possível concluir que os genótipos dentro de 80% SWRC conseguiram acumular maior quantidade de água tanto na parte aérea quanto na raiz em comparação com 40% SWRC (Figura 2ABDE). A redução da área fotossintética refletiu em menos nodulação em 35%, 65%, 35% e 43%, para os genótipos G1, G2, G3 e G4, respectivamente (Figura 2C). Todos os genótipos crescendo abaixo de 40% de SWRC mostraram uma redução no número de tamanhos de nódulos (Figura 1). A produtividade de sementes dos genótipos também foi afetada, os genótipos G1, G2 e G4 apresentaram redução de 39%, 26% e 64% (Figura 2F), respectivamente. Em contraste, a produtividade do genótipo G3 aumentou abaixo de 40% SWRC (Figura 2F).

3.12.2 Anatomia do nódulo

O nódulo de feijão-caupi, é revestido por uma periderme e apresenta córtex composto por células vacuoladas, parede finas, não acumulam substâncias ergásticas e com citoplasma parietal. No córtex encontram-se feixe vasculares e, mais internamente, ocorre a zona de infecção que contém células infectadas e células não-infectadas (Figura 3). Foi observado que o déficit hídrico afeta consideravelmente na anatomia dos nódulos da cultivar G2 sob CAD 40%. Essa cultivar sob estresse hídrico apresenta córtex mais delgado e com células menores quando comparado com G4. Além disso, as células do parênquima cortical em G2 sob CAD 40% apresentavam-se com sinuosidades em suas paredes celulares (Figura 3B). Em relação à distribuição de proteínas, observou-se que as células não-infectadas apresentam gotas de proteínas (Figura 3 C;F; I;J). Nódulos do G4 sob CAD 40% apresenta maior quantidade de células não-infectadas quando comparada a G2. Não há alteração anatômica no córtex dos nódulos das plantas submetidas a CAD 80% (Figura 3 G-H; J-K). Porém, na zona infectada nota-se mais regiões com células não infectadas no G4 quando comparada com G2 (Figura 3I;L).

3.12.3 Metabolismo do N

Os genótipos G1, G2 e G3 apresentaram maior acúmulo (47%, 48% e 49%, respectivamente) de ureídeos totais na parte aérea dentro da CAD 80% quando comparado com a CAD 40%, o genótipo G4 não apresentou diferença no acúmulo entre CAD's. Já nas raízes é possível observar maior acúmulo na CAD 80% para os genótipos G2, G3 e G4 (64%, 76% e 55%, respectivamente). O genótipo que apresentou maior acúmulo na parte aérea de ureídeos totais na CAD 40% foi o G3. Já na raiz o G4 foi o genótipo que apresentou maior acúmulo. Considerando a CAD 80% o genótipo que apresentou maior acúmulo de ureídeos na parte aérea foi o G3, seguido do G2, G1 e G4, todos apresentaram diferença significativa entre si. Já na raiz foi o G3 seguido do G4, G2 e G1 diferindo estatisticamente entre si (Figura 4C-F).

Maiores teores de acúmulo de nitrato na parte aérea também foram encontrados em maior quantidade na CAD 80% nos genótipos G1, G2 e G3 (42%, 60% e 59 %, respectivamente), porém o G4 apresentou acúmulo de 54% a mais na CAD 40% (Figura 4G). Nas raízes os maiores teores de acúmulo foram encontrados na CAD 80% nos genótipos G2, G3 e G4 (66%, 75% e 50%, respectivamente) (Figura 4J). O genótipo G1 não apresentou diferença significativa entre

CAD no acúmulo de nitrato nas raízes. Dentro da CAD 40% o genótipo que mais acumulou nitrato na parte aérea foram G3 e G1.

Todos os genótipos apresentaram maiores acúmulo de amônia na raiz na CAD 80%, porém na parte aérea o G4 apresentou maior acúmulo na CAD 40%. O G4 se destacou entre os demais genótipos na CAD 40%, tanto na parte aérea quanto na raiz (Figura 4HK). Os genótipos G1, G2 e G3 apresentaram maiores valores de acúmulo dentro da CAD 80%.

Maiores acúmulos de aminoácidos foram encontrados na parte aérea do G1, G2 e G3 submetidas a CAD 80%, já o G4 apresentou maior teor na CAD 40%. Dentre todos os genótipos estudados o G4 foi o que apresentou maior acúmulo de aminoácido na CAD 40% (Figura 4IL).

3.12.4 Taxas fotossintéticas

Os genótipos G1 e G2 foram os que mais sofreram redução na fotossíntese (A) na CAD 40% (Figura 5A), cerca de 43% e 47%, respectivamente. Enquanto os genótipos G3 e G4 foram capazes de manter a atividade de fotossíntese mesmo em situação de estresse. Os genótipos G3 e G4 apresentaram menor valor de gs e maior valor de EUA em ambas as CAD's comparado aos genótipos G1 e G2.

3.12.5 Metabolismo oxidativo e antioxidativo

O déficit hídrico induziu o aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT, APX e SOD (Figura 6D), e resultou em redução de H₂O₂ (Figura 6B) e MDA (Figura 6A) no G1. No G2 houve aumento significativo de APX e SOD na CAD 40%, que também refletiu na redução de H₂O₂. O genótipo 3, apresentou comportamento distinto dos demais genótipos, onde os maiores valores de enzimas oxidantes foram encontrados nas plantas da CAD 80% (Figura 6). Os baixos níveis das enzimas antioxidativas na CAD 40 % resultaram no aumento do conteúdo de H₂O₂ e MDA, indicando peroxidação lipídica. O G4, apresentou maiores níveis de APX na CAD 40%, os níveis de SOD e CAT não apresentaram diferenças entre CAD para esse genótipo. Houve correlação positiva no conteúdo de H₂O₂ e MDA (Figura 7B) para todos os genótipos.

3.12.5 Teor de açúcares

Os genótipos G1 e G2 foram os que apresentaram maior acúmulo de frutose na parte aérea e menor acúmulo na raiz na CAD 40%. No entanto, os genótipos G3 e G4 apresentaram menor

acúmulo na parte aérea e maior acúmulo na raiz quando submetido ao estresse (Material Suplementar 1). O genótipo G2 conseguiu acumular maiores teores de glicose na parte aérea em ambas as CAD, porém na raiz o genótipo G3 acumulou maior teor. Nenhum genótipo acumulou sorbitol nas raízes, já na parte aérea o genótipo G3, conseguiu acumular maior quantidade em ambas as CAD. Todos os genótipos apresentaram maiores teores de sacarose na parte aérea na CAD 80%, já nas raízes o G1 e G4 acumularam maior teor na CAD 40%.

3.12.6 Análise de cluster e heatmap

A análise de cluster (Figura 7A) revelou o agrupamento entre os genótipos G1 e G2 (sensíveis), ocorreu também agrupamento entre os genótipos G3 e G4 (tolerantes). O heatmap (7B), apresentou correlação negativa entre o acúmulo de compostos nitrogenados com carbono interno. Já o número de nódulos se correlacionou positivamente com o acúmulo de compostos nitrogenados, tanto na parte aérea quanto nas raízes. O acúmulo de frutose se correlacionou positivamente com o acúmulo de outros açúcares e compostos nitrogenados.

3.13 DISCUSSÃO

O estresse por déficit hídrico reduziu drasticamente o crescimento das plantas e prejudicou o processo de fixação de nitrogênio. Vários mecanismos foram descritos para explicar essa redução, dentre eles nodulação, atividades de enzimas oxidantes, anatomia dos nódulos e parâmetros fotossintéticos.

A queda das folhas dos genótipos G3 e G4 (Figura 1) está relacionada com a capacidade das plantas realocarem solutos e nutrientes para as folhas jovens, garantindo assim o desenvolvimento da planta a custo da senescência foliar das folhas mais velhas (YANG *et al.*, 2019). Essa queda também foi observada nos genótipos com baixa atividade das enzimas CAT e SOD (Figura 6), a associação entre essas enzimas e aceleração de senescência também foi observada por (YE *et al.*, 2020).

A alteração no processo de nodulação ocorre porque a exposição à seca severa prejudica a atividade da nitrogenase. Isso pode ser causado por vários fatores, incluindo o comprometimento do fornecimento de fotoassimilados para os nódulos para conduzir a fixação simbiótica de nitrogênio e quebra da barreira de difusão de oxigênio ou perda de leghemoglobina (ARRESE-IGOR *et al.*, 2011). As cultivares G3 e G4 (tolerantes) exibiram

diminuição no número de nódulos, mas mantiveram o peso fresco do nódulo por planta. A fixação de nitrogênio é um processo de alta demanda de energia e, portanto, requer um alto nível de fotossíntese (SHEN; BISSELING, 2020) e a redução da fotossíntese bloqueia a nodulação (Taylor and Menge, 2018), isso explica a redução do número de nódulos nos genótipos com baixa atividade fotossintética, resultado semelhante foi obtido em amendoim (Furlan *et al.*, 2017). Além disso, toda alteração na ultraestrutura do nódulo e na pressão de turgor reduz a taxa de FBN e a síntese de ureídeos (BARAL; IZAGUIRRE-MAYORAL, 2017).

Os nódulos possuem bacteroides que são capazes de fixar N_2 atmosférico em NH_3 , esse processo se inicia nas células infectadas (ic) (Figura 3) (SWAIN; ABHIJITA, 2013). Para alcançar o sistema vascular do nódulo, primeiramente deve ocorrer biossíntese de purinas via metabolismo da xantina ou ácido úrico nas células infectadas. Então essas moléculas são direcionadas para as células não infectadas que são responsáveis pela biossíntese de ureídeos alantoína e ácido alantóico. Seguindo a sequência esses ureídeos são transportados via simplástica e apoplástica até o feixe vascular, para então serem carregados no xilema e exportados do nódulo para a parte aérea (Hartmann *et al.*, 2002; Tegeder, 2014). Análises histoquímicas utilizando o corante Xyidine Ponceau revelou intensa coloração das células infectadas e a presença de gotas de proteína nas células não infectadas. Anatomicamente, G4 apresentou mais células não infectadas tanto sob CAD 40% quando sob CAD 80%. É possível que a presença dessa maior quantidade de células não infectadas possa estar associada a uma maior habilidade dos nódulos em sintetizar ureídeos. Esse fato vai ao encontro da observação de que mesmo sob déficit hídrico (CAD 40%) as raízes da G4 apresentam teores de ácido alantóico parecidos com as plantas sob CAD 80% (Figura 4E), demonstrando haver um possível mecanismo de compensação de síntese de ácido alantóico nas células não infectadas mesmo sob estresse hídrico.

Ainda sobre o nódulo, houve diferença entre as cultivares G2 e G4 sob CAD 40% quanto ao córtex. As células do parênquima cortical são menores em G2 quando comparadas com G4 e, portanto, a espessura do córtex é reduzida em G2. O efeito do estresse por déficit hídrico no tamanho das células já tem sido reportado em diferentes plantas. Em folhas de *Brachiaria brizantha* sob 60% de molhamento houve a redução significativa no tamanho das células do mesófilo e conseqüentemente da espessura do limbo foliar (SILVA *et al.*, 2018). De modo surpreendente, G4 foi capaz de manter o maior tamanho das células e a ausência de sinuosidades das paredes celulares no córtex mesmo sob estresse. As características anatômicas da célula cortical do nódulo de *V. unculata* como paredes delgadas, citoplasma parietal, ausência de acúmulo de substâncias ergásticas e amplo vacúolo, sugerem uma possível função como

parênquima aquífero, sendo o primeiro relato da ocorrência desse tipo celular em nódulos. Levando em consideração sua provável natureza como parênquima aquífero, G2 sob déficit hídrico apresenta sinuosidades nas paredes celulares. Resultados semelhantes foram observados em folhas de *Alcantarea imperialis* cultivated in vitro for 6 meses em condições de 7.5% e 45% de polietilenoglicol (PEG-6000) (MOLLO *et al.*, 2019).

O custo do carbono para a dependência total de uma simbiose de nódulo fixador de nitrogênio é estimado em mais de 30% do total de fotoassimilados (Pate and Layzell, 2012). As tensões ambientais típicas enfrentadas pelo nódulo de leguminosas incluem a privação de fotoassimilado, o equilíbrio dos processos de transporte do nódulo pode controlar a permeabilidade do nódulo (WALSH, 1995). A sacarose sintase é uma das enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose em nódulos de leguminosas, (GONZÁLEZ *et al.*, 1995) verificaram que essa enzima diminuiu drasticamente em poucos dias após limitação hídrica na cultura da soja. Dakora e Atkins (1989), verificaram que nódulos de feijão-caupi desenvolveram grandes espaços intercelulares no córtex interno e uma proliferação de lenticelas quando expostos sob estresse, além disso o córtex interno desenvolveu muitas camadas de células pequenas e compactadas e lenticelas pouco desenvolvidas ou ausentes.

A seca reduziu a taxa fotossintética enquanto o processo de fototranspiração foi aumentado simultaneamente, portanto, a redução do peso dos grãos na CAD 40% para os genótipos G1, G2 e G4 (Figura 2) pode ser o resultado do comprometimento do processo fisiológico e bioquímico (YANG *et al.*, 2019; ZIA *et al.*, 2021). A senescência precoce também foi um limitante de rendimento para o genótipo G3 em decorrência da redução de superfície foliar e interferência na translocação de moléculas de carbono e nitrogênio entre a fonte e dreno (LI *et al.*, 2016).

Os ureídeos desempenham papel regulador na tolerância ao estresse hídrico (IRANI; TODD, 2016). A síntese de ureídeos está diretamente relacionada à quantidade de fotoassimilados translocados para as bactérias simbióticas através dos vasos do floema para alimentar a fixação de N₂ (SULIEMAN; TRAN, 2013). Neste estudo, G4 apresentou maior acúmulo de alantoína e ureídeos totais na raiz que os demais genótipos exposto ao estresse, isso pode ter ocorrido por ser um genótipo que apresenta maiores números de células não infectadas (Figura 3). Além disso, o acúmulo de ureídeos no sistema radicular pode ser explicado pela embolia dos vasos do xilema ocorrendo provavelmente simultaneamente com o fechamento estomático, diminuindo a taxa de fluxo ascendente de ureídeos através dos vasos do xilema (BARAL; IZAGUIRRE-MAYORAL, 2017). Porém, existe a possibilidade de que baixas concentrações de ureídeos em plantas tolerantes à seca possam ser devido ao

comprometimento da síntese de alantoína no nível para acumular ácido úrico, um conhecido ativador do sistema de defesa antioxidante (WATANABE *et al.*, 2010). Os ureídeos têm a função de transportar o nitrogênio dentro das plantas e se correlaciona com a fixação simbiótica de N₂ (FBN) (SANYAL *et al.*, 2018). Dessa forma, G4 foi capaz de transportar o N obtido pelo processo de FBN para demais partes da planta, como consequência houve aumento significativo no conteúdo de amônia, nitrato e aminoácidos. Esse ajuste osmótico devido ao acúmulo ativo de osmólitos pode ajudar a planta a tolerar condições de seca (TURNER, 2018) e genótipos com grande capacidade de ajuste osmótico sob seca frequentemente sustentam a produção.

De forma geral os genótipos que apresentaram maiores acúmulo de alantoína, ácido alantóico, nitrato, amônia e aminoácido na CAD 80% foram G1, G2 e G3. Já o G4 apresentou concentrações maiores dessas variáveis na CAD 40%, curiosamente foi o genótipo que mais apresentou mais células não infectadas, que possivelmente potencializou esse acúmulo (Figura 3). Dessa forma, é possível afirmar que o G4 apresenta mecanismo de tolerância diferente dos demais genótipos. Essa resistência está relacionada a capacidade de manter a condutância estomática, fotossíntese e eficiência no uso da água mesmo em situação de estresse. O genótipo G3 também apresentou valores altos de fotossíntese e condutância em condição de estresse, no entanto, os maiores teores de acúmulo de compostos nitrogenados foram encontrados na CAD 80%.

A redução da gs dos genótipos G3 e G4 (Figura 5) ocorreu em função do fechamento dos estômatos, sendo um mecanismo adaptativo para reduzir a perda de água (Zia *et al.*, 2021). Embora este seja um meio importante de adaptação, também restringiu as taxas de difusão de CO₂ na folha (Figura 5C), e pode ter limitado a disponibilidade de CO₂ para Rubisco, resultando na inibição da atividade do ciclo de Calvin e, portanto, diminuindo a demanda por NADPH e ATP (VANLERBERGHE *et al.*, 2016). Resultado semelhante foi obtido por (TANKARI *et al.*, 2020) em plantas de feijão-caupi sob déficit hídrico. A diminuição da gs de plantas em condições de seca têm sido sugeridos para indicar um controle adaptativo da transpiração eficiente (HESSINI *et al.*, 2008). A inibição da fotossíntese para os genótipos G1 e G2 pode ter ocorrido devido ao crescimento limitado da folha devido à diminuição da proliferação celular (WU *et al.*, 2018).

O déficit hídrico leva a um desequilíbrio na utilização dos recursos de carbono, produção reduzida de trifosfato de adenosina e geração aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZIA *et al.*, 2021). A peroxidação lipídica e a geração de H₂O₂ são indicadores eficazes de dano oxidativo (KUMAR *et al.*, 2020). O dano oxidativo aos lipídios da membrana é caracterizado pela produção de um composto denominado malondialdeído, que é um produto

da peroxidação lipídica (ANDA *et al.*, 2020). Neste estudo foi possível verificar que o genótipo G3 apresentou altos níveis de H_2O_2 e MDA na CAD 40% (Figura 6) indicando peroxidação lipídica da membrana celular induzido pela seca. Variedades menos tolerantes tendem a acumular maior quantidade de H_2O_2 e aumentar na peroxidação lipídica (CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012).

Para enfrentar estresses bióticos e abióticos as plantas desenvolvem mecanismos de defesa que compreendem na ativação de enzimas antioxidantes. A SOD é a primeira enzima na linha de defesa contra as EROs no sistema antioxidante, sendo responsável por eliminar os O_2^- e convertê-los em H_2O_2 (FOYER, 2018). A enzima CAT por sua vez, é responsável pela conversão de H_2O_2 em água (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Nesse trabalho foi possível observar correlação negativa entre CAT e H_2O_2 (Figura 7), ou seja, o declínio na atividade da CAT está relacionado ao aumento no acúmulo de H_2O_2 após o estresse hídrico, bem como ao aumento da peroxidação lipídica. A enzima APX desempenha um papel significativo na limpeza de H_2O_2 (SARKER; OBA, 2018), e está envolvido em outras funções, como crescimento da planta, regulação gênica e modulação de várias enzimas (CARRIZO *et al.*, 2020). A ausência de danos nas membranas celulares indicou a presença de um eficiente mecanismo de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo, atribuído ao aumento na atividade das enzimas antioxidantes, SOD CAT e APX nos genótipos de feijão-caupi.

O crescimento de plantas sobre estresse hídrico é principalmente regulado pelo metabolismo, alocação e transporte de açúcar (DU *et al.*, 2020a). O aumento da concentração de açúcar nas folhas sob estresse moderado e severo pode estar mantendo a estabilidade da membrana ou protegendo a fusão da membrana do estresse hídrico (HARIS *et al.*, 2020) como relatado em feijão fava (ANDRADE *et al.*, 2016) e feijão comum (ABID *et al.*, 2017). Ocorreu aumento de sorbitol na parte aérea dos genótipos G1 e G4 submetidos ao estresse hídrico. Esse aumento por ter ocorrido porque as plantas tendem a acumular ácido abscísico nas folhas quando as raízes são expostas a condições de seca (HERNANDEZ-ESPINOZA; BARRIOS-MASIAS, 2020), e esse mecanismo têm sido relatado como o responsável pelo aumento de sorbitol (GU *et al.*, 2021). O aumento de frutose, glicose e sorbitol na parte aérea e redução na raiz dos genótipos G1 e G2 (sensíveis) da CAD 40%, indicam que ocorreu menor transporte desses açúcares para outros órgãos. O maior acúmulo de sacarose nas raízes nos genótipos G1 e G4, sugere que o estresse hídrico aumentou o ciclo de metabolismo da sacarose, levando ao aumento do acúmulo de sacarose nas raízes. A glicose desempenha um papel fundamental no fechamento estomático e melhora a adaptabilidade da planta em condições de seca (OSAKABE *et al.*, 2014).

O heatmap revela alta correlação do coeficiente de Pearson da condutância estomática e produtividade (Figura 7B). Além disso, houve correlação negativa entre a produtividade e o acúmulo de sacarose, glicose, sorbitol e frutose na raiz. O número de nódulos foi a variável que apresentou maior correlação com o acúmulo de açúcares e consequentemente o açúcar com compostos nitrogenados (Figura 7B). Baixas concentrações de gs refletem em acúmulo de açúcares nas raízes. Nesse contexto, é possível compreender que as plantas acumulam esses açúcares como um mecanismo de defesa, no entanto quando o acúmulo ocorreu nas raízes refletiu na redução da produtividade (G3 e G4), quando o acúmulo ocorreu nas folhas, refletiu no aumento dos compostos nitrogenados e consequentemente a produtividade (G1 e G2) (Figura 7B). O acúmulo de açúcares nas raízes também foi relatado em outras espécies, como: em milho (*Zea mays*) (LI *et al.*, 2021) e soja (*Glycine max* L.) (DU *et al.*, 2020b) submetido a seca, em pepino (*Cucurbita pepo*) exposto a hipoxia (SOLHAUG *et al.*, 2020), em capim braquiária (*Urochloa brizantha*) e capim-da-índia (*Megathyrsus maximus*) submetidos ao estresse salino (ALVAREZ-PIZARRO *et al.*, 2020).

Genótipos que apresentaram gs menor, mas que conseguiram manter alta taxa fotossintética e eficiência no uso da água podem ser considerados genótipos tolerantes. O heatmap de cluster (Figura 7A) revela que os genótipos G3 e G4 se agrupam, evidenciando a tolerância desses genótipos. Os genótipos G1 e G2, se agruparam por apresentar baixo acúmulo de compostos nitrogenados nas raízes evidenciando a sensibilidade ao estresse por déficit hídrico.

3.14 CONCLUSÃO

A tolerância hídrica compreende a uma série de modificações anatômicas e bioquímicas para suportar algum tipo de estresse. Os genótipos de feijão-caupi considerados tolerantes ao estresse hídrico, apresentam mecanismos distintos para suportar a seca. Neste trabalho, os genótipos tolerantes foram G3 e G4 por apresentar capacidade de reduzir a condutância estomática, manter a atividade fotossintética e eficiência no uso da água mesmo em situação de estresse.

A produção e transporte de açúcares apresentam um importante papel na tolerância a seca. O baixo transporte de açúcares para as raízes indicou sensibilidade ao estresse hídrico (G1 e G2), esse resultado sugere que faltou energia para estruturação e desenvolvimento do nódulo, levando a redução das células do córtex, e má formação em diversas estruturas da cultivar sensível (G2). Plantas tolerantes (G3 e G4) apresentaram transportar de açúcares para outros

órgãos, isso possibilitou bom desenvolvimento das células do córtex e demais estruturas anatômicas dos nódulos (cultivar G4), indicando a importância dos fotoassimilados para o crescimento do nódulo. Além disso, o genótipo que apresentou maior número de células não-infectada curiosamente é o genótipo com maior capacidade de sintetizar compostos nitrogenados, sendo considerado um tipo de característica de genótipos tolerantes.

REFERÊNCIAS

- ABID, G. *et al.* Agro-physiological and biochemical responses of faba bean (*Vicia faba* L. var. 'minor') genotypes to water deficit stress. **Biotechnology, Agronomy and Society and Environment**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2017.
- ALEXIEVA, V. *et al.* The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.
- ALVAREZ-PIZARRO, J. C. *et al.* Osmolyte accumulation in leaves and Na⁺ exclusion by roots in two salt-treated forage grasses. **Grassland Science**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 231–237, 2020.
- ANDA, A. *et al.* Yield features of two soybean varieties under different water supplies and field conditions. **Field Crops Research**, [s. l.], v. 235, n. 107673, 2020.
- ANDRADE, E. R. *et al.* Biochemical indicators of drought tolerance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, [s. l.], v. 210, n. 12, p. 277–289, 2016.
- ANWAAR, H. A. *et al.* Assessment of grain yield indices in response to drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 1818–1823, 2020.
- ARRESE-IGOR, C. *et al.* Physiological Responses of Legume Nodules to Drought. **Plant Stress**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 24–31, 2011.
- ARSLAN, E. *et al.* Humic Acid as a Biostimulant in Improving Drought Tolerance in Wheat: the Expression Patterns of Drought-Related Genes. **Plant Molecular Biology Reporter**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 508–519, 2021.
- AZEVEDO, R. A. *et al.* Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 280–292, 1998.
- BARAL, B.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L. Purine-Derived Ureides Under Drought and Salinity. **Advances in Agronomy**, [s. l.], v. 146, p. 167–204, 2017.
- BARAL, B. *et al.* Xylem-mediated channeling of nitrogen in broad bean (*Vicia faba*). **Environmental and Experimental Biology**, [s. l.], v. 12, p. 187–197, 2014.
- BASTOS, E. A. *et al.* Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. **Revista Ciência Agronômica**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 100–107, 2011.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 278–293, 1966.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities

of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BREWING, N. J. Development of the Legume Root Nodule. **Annual Review of Cell Biology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 191–226, 1991.

CARRIZO, I. M. *et al.* Contrasting adaptive responses to cope with drought stress and recovery in *Cenchrus ciliaris* L. and their implications for tissue lignification. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 172, n. 2, p. 762–779, 2021.

CARVALHO, M. *et al.* Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 241, p. 153001, 2019.

CATALDO, D. A. *et al.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975.

CHAKRABORTY, U.; PRADHAN, B. Oxidative stress in five wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) exposed to water stress and study of their antioxidant enzyme defense system, water stress responsive metabolites and H₂O₂ accumulation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 117–130, 2012.

COLLIER, R.; TEGEDER, M. Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 355–367, 2012.

DAKORA, F.; ATKINS, C. Diffusion of Oxygen in Relation to Structure and Function in Legume Root Nodules. **Functional Plant Biology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 131, 1989.

DU, Y. *et al.* Effect of drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 146, p. 1–12, 2020 a.

DU, Y. *et al.* Effect of drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 146, n. October 2019, p. 1–12, 2020 b.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. **Embrapa Solos**, [s. l.], p. 353, 2013.

FISCHINGER, S. A.; SCHULZE, J. The importance of nodule CO₂ fixation for the efficiency of symbiotic nitrogen fixation in pea at vegetative growth and during pod formation. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 61, n. 9, p. 2281–2291, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Cereal Supply and Demand Brief | World Food Situation | Food and Agriculture Organization of the United Nations**. [s. l.], 2020.

FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 154, p. 134–142, 2018.

FURLAN, A. L. *et al.* Metabolic features involved in drought stress tolerance mechanisms in peanut nodules and their contribution to biological nitrogen fixation. **Plant Science**, [s. l.], v. 263, p. 12–22, 2017.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.

GONZALEZ, E. M. *et al.* The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 1515–1523, 1995.

GRATÃO, P. L. *et al.* Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, [s. l.], v. 153, n. 3, p. 321–333, 2008.

GU, C. *et al.* Spatio-temporally expressed sorbitol transporters cooperatively regulate sorbitol accumulation in pear fruit. **Plant Science**, [s. l.], v. 303, p. 110787, 2021.

HARIS, M. M. *et al.* Growth, quality and capsaicin concentration of hot pepper (*Capsicum annuum*) under drought conditions. **Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 100–110, 2020.

HARTMANN, K. *et al.* Chemical composition and ultrastructure of broad bean (*Vicia faba* L.) nodule endodermis in comparison to the root endodermis. **Planta**, [s. l.], v. 215, n. 1, p. 14–25, 2002.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

HERNANDEZ-ESPINOZA, L. H.; BARRIOS-MASIAS, F. H. Physiological and anatomical changes in tomato roots in response to low water stress. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 265, p. 109208, 2020.

HESSINI, K. *et al.* Biomass production, photosynthesis, and leaf water relations of *Spartina alterniflora* under moderate water stress. **Journal of Plant Research**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 311–318, 2008.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 287–293, 2018.

IRANI, S.; TODD, C. D. Ureide metabolism under abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 199, p. 87–95, 2016.

JAMES, E. K. *et al.* The Effect of Irradiance on the Recovery of Soybean Nodules from Sodium Chloride-Induced Senescence. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 997–1005, 1993.

JIANG, H.; XU, D.-Q. The Cause of the Difference in Leaf Net Photosynthetic Rate between

Two Soybean Cultivars. **Photosynthetica**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 453–459, 2001.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 1A-149A, 1965.

KOUCHI, H.; YONEYAMA, T. Dynamics of Carbon Photosynthetically Assimilated in Nodulated Soya Bean Plants under Steady-state Conditions 2. The Incorporation of ¹³C into Carbohydrates, Organic Acids, Amino Acids and some Storage Compounds. **Annals of Botany**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 883–896, 1984.

KUMAR, S. *et al.* Screening of mungbean for drought tolerance and transcriptome profiling between drought-tolerant and susceptible genotype in response to drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 157, p. 229–238, 2020.

LARCHER, W. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, [s. l.], v. 134, n. 3, p. 279–295, 2000.

LAXA, M. *et al.* The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 94, 2019.

LI, P. *et al.* Metabolic responses to combined water deficit and salt stress in maize primary roots. **Journal of Integrative Agriculture**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 109–119, 2021 a.

LI, S. *et al.* Photosynthesis product allocation and yield in sweetpotato with different irrigation levels at mid-season. **Agricultural Water Management**, [s. l.], v. 246, p. 106708, 2021 b.

LI, Y. *et al.* Effect of post-silking drought on nitrogen partitioning and gene expression patterns of glutamine synthetase and asparagine synthetase in two maize (*Zea mays* L.) varieties. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 102, p. 62–69, 2016.

MASALKAR, P. *et al.* Interaction of Cytosolic Glutamine Synthetase of Soybean Root Nodules with the C-terminal Domain of the Symbiosome Membrane Nodulin 26 Aquaglyceroporin. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 31, p. 23880–23888, 2010.

MOLLO, L. *et al.* Drought survival strategies of juvenile bromeliads of *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 295–304, 2019.

MUNJONJI, L. *et al.* Stomatal Behavior of Cowpea Genotypes Grown Under Varying Moisture Levels. **Sustainability**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 12, 2017.

OSAKABE, Y. *et al.* ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. **New Phytologist**, [s. l.], v. 202, n. 1, p. 35–49, 2014.

OWADE, J. O. *et al.* A review of the contribution of cowpea leaves to food and nutrition security in East Africa. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 36–47, 2020.

PATE, J. S.; LAYZELL, D. B. Energetics and Biological Costs of Nitrogen Assimilation. *In*:

Intermediary Nitrogen Metabolism: Elsevier, [s. l.], 1990. p. 1–42. *E-book*.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. **Campinas: Instituto Agrônômico**, [s. l.], n. 19, p. 285, 2001.

REN, H. *et al.* Slow anion channel GhSLAC1 is essential for stomatal closure in response to drought stress in cotton. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 258–259, p. 153360, 2021.

ROJAS, O. Agricultural extreme drought assessment at global level using the FAO-Agricultural Stress Index System (ASIS). **Weather and Climate Extremes**, [s. l.], v. 27, p. 100184, 2020.

RUAN, Y. L. *et al.* Sugar Input, Metabolism, and Signaling Mediated by Invertase: Roles in Development, Yield Potential, and Response to Drought and Heat. **Molecular Plant**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 942–955, 2010.

SAKAI, W. S. Simple Method for Differential Staining of Paraffin Embedded Plant Material Using Toluidine Blue O. [s. l.], 48, n. 5, p. 247–249, 1973.

SAŃKO-SAWCZENKO, I. *et al.* Transcriptomic Changes in *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* Root Nodules during Drought Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 1204, 2019.

SANTOS, E. F. *et al.* Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 113, p. 6–19, 2017.

SANYAL, D. *et al.* Determining Symbiotic Nitrogen Fixation in Dry Bean Cultivars Using Ureide Method and Isotope Dilution Techniques. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s. l.], v. 49, n. 16, p. 2042–2052, 2018.

SARKER, U.; OBA, S. Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 16496, 2018.

SEN, D. *et al.* Structure and Organization of Effective Peanut and Cowpea Root Nodules Induced by Rhizobial Strain 32H1. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 356–363, 1986.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, [s. l.], v. 52, n. 3/4, p. 591, 1965.

SHEN, D.; BISSELING, T. The Evolutionary Aspects of Legume Nitrogen–Fixing Nodule Symbiosis. *In: Symbiosis: Cellular, Molecular, Medical and Evolutionary Aspects*. [S. l.]: Springer, 2020. p. 387–408. *E-book*.

SILVA, D. V. *et al.* Anatomical adaptations to different soil moisture contents in palisade grass and smooth pigweed. **Revista Ceres**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 306–313, 2018.

SMITH, A. *et al.* Doubled-up legume rotations improve soil fertility and maintain productivity under variable conditions in maize-based cropping systems in Malawi. **Agricultural Systems**, [s. l.], v. 145, p. 139–149, 2016.

SMITH, P. M. C.; ATKINS, C. A. Purine Biosynthesis. Big in Cell Division, Even Bigger in Nitrogen Assimilation. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 128, n. 3, p. 793–802, 2002.

SOLHAUG, E. M. *et al.* The role of alanine synthesis and nitrate-induced nitric oxide production during hypoxia stress in Cucurbita pepo nectaries. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 580–599, 2021.

SULIEMAN, S.; TRAN, L.-S. P. Asparagine: an amide of particular distinction in the regulation of symbiotic nitrogen fixation of legumes. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 309–327, 2013.

SWAIN, H.; ABHIJITA, S. Nitrogen Fixation and Its Improvement Through Genetic Engineering. **Journal of Global Biosciences**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 98–112, 2013.

TANKARI, M. *et al.* Drought priming improved water status, photosynthesis and water productivity of cowpea during post-anthesis drought stress. **Agricultural Water Management**, [s. l.], v. 245, p. 106565, 2021.

TAYLOR, B. N.; MENGE, D. N. L. Light regulates tropical symbiotic nitrogen fixation more strongly than soil nitrogen. **Nature Plants**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 655–661, 2018.

TODD, C. D. *et al.* Update on ureide degradation in legumes. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 5–12, 2006.

TURNER, N. C. Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 69, n. 13, p. 3223–3233, 2018.

VANLERBERGHE, G. C. *et al.* Alternative oxidase: a respiratory electron transport chain pathway essential for maintaining photosynthetic performance during drought stress. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 157, n. 3, p. 322–337, 2016.

VIDAL, B. de C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. **Annales d'histochemie**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 289–96, 1970.

VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 143–157, 1970.

WALSH, K. B. Physiology of the legume nodule and its response to stress. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 27, n. 4–5, p. 637–655, 1995.

WATANABE, S. *et al.* RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in Arabidopsis. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 584, n. 6, p. 1181–1186, 2010.

WENG, Y. *et al.* A Rapid Method for Measuring Seed Protein Content in Cowpea (*Vigna*

unguiculata (L.) Walp). **American Journal of Plant Sciences**, [s. l.], v. 08, n. 10, p. 2387–2396, 2017.

WU, Y. *et al.* Leaf area and photosynthesis of newly emerged trifoliolate leaves are regulated by mature leaves in soybean. **Journal of Plant Research**, [s. l.], v. 131, n. 4, p. 671–680, 2018.

YANG, M. *et al.* Effect of post-silking drought stress on the expression profiles of genes involved in carbon and nitrogen metabolism during leaf senescence in maize (*Zea mays* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 135, p. 304–309, 2019.

YE, Y. *et al.* Effects of post-silking water deficit on the leaf photosynthesis and senescence of waxy maize. **Journal of Integrative Agriculture**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 2216–2228, 2020.

YEMM, E. W. *et al.* The determination of amino-acids with ninhydrin. **The Analyst**, [s. l.], v. 80, n. 948, p. 209, 1955.

ZIA, R. *et al.* Plant survival under drought stress: Implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 242, p. 126626, 2021.

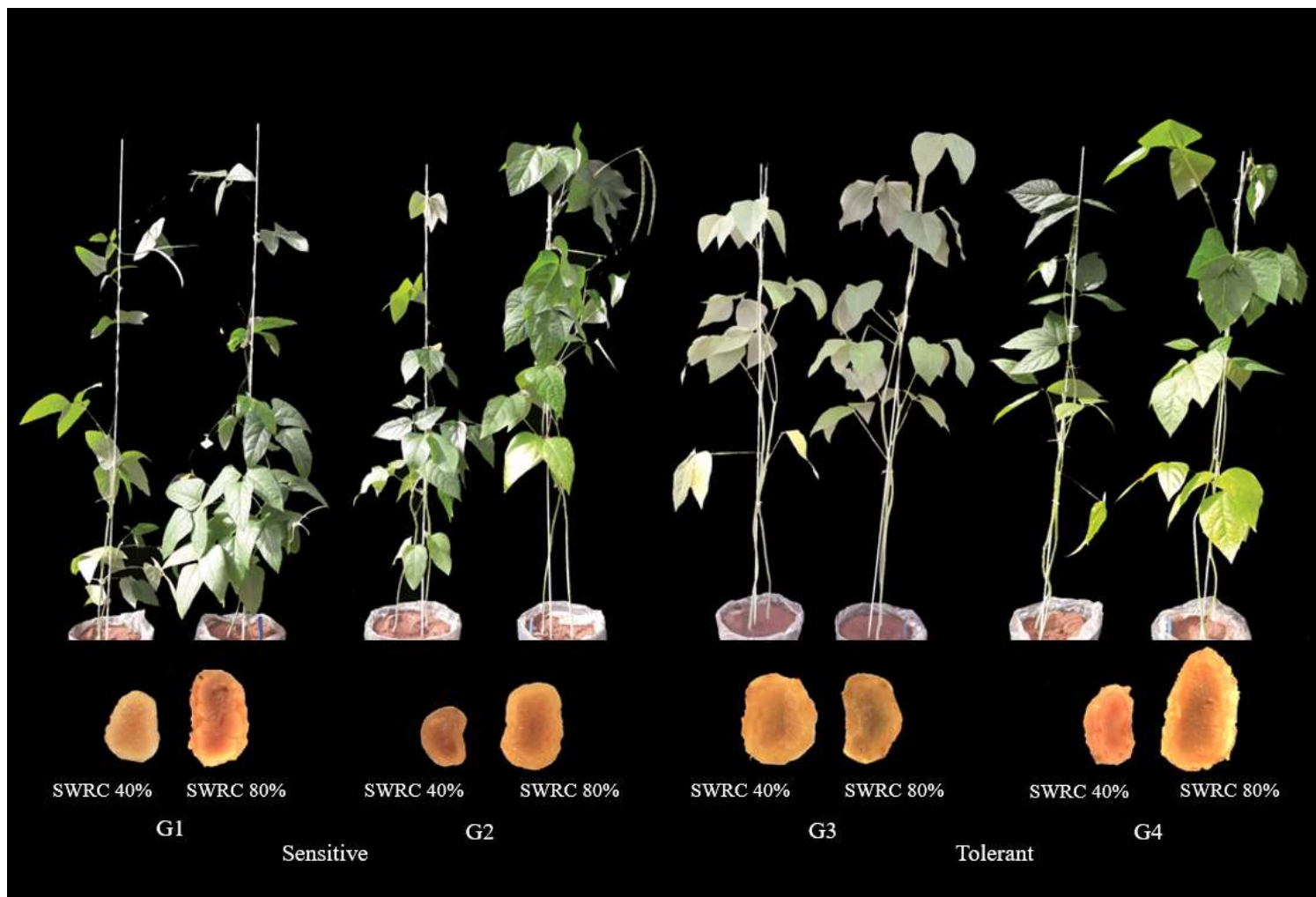


Figure 1. Effect of soil retention of water capacity (SWRC) on the growth of cowpea plants. Drought stress was applied at 20 days after seed sowing. The pictures were taken 42 days after water deficit stress treatment. G1 (BRS Tracuateua), G2 (BRS Tumucumaque), G3 (Pingo de Ouro 1-2) and G4 (BRS Marataoã).

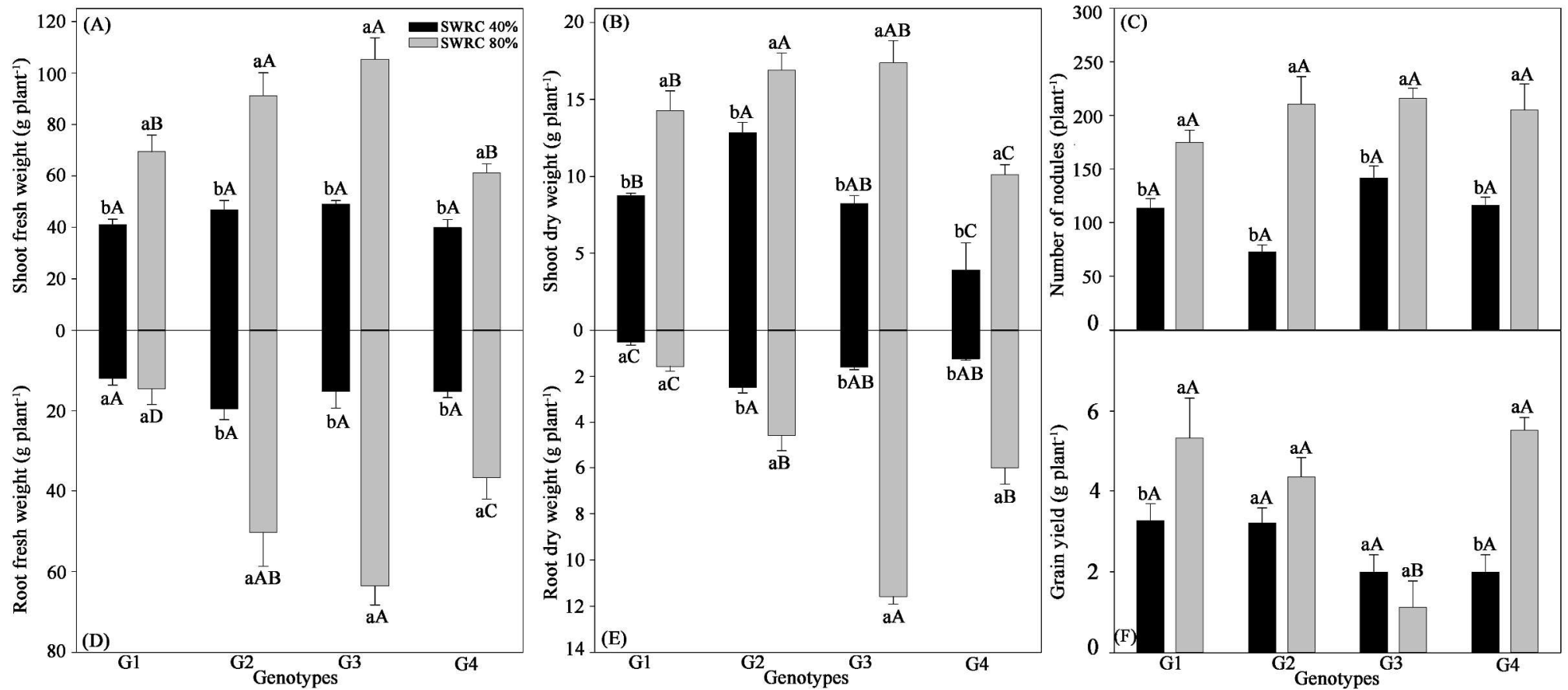


Figure 2. Effect of drought stress on cowpea plant growth, where: shoot fresh weight (a), root dry weight (b), number of nodules per plant (c), root fresh weight (d), root dry weight (e), grain yield (f). Error bars indicate the standard error of the mean (n = 4). Different letters indicate the difference between means according to a Tukey test ($P \leq 0.05$). Uppercase letters correspond to cowpea genotypes, and lowercase letters correspond to SWRC.

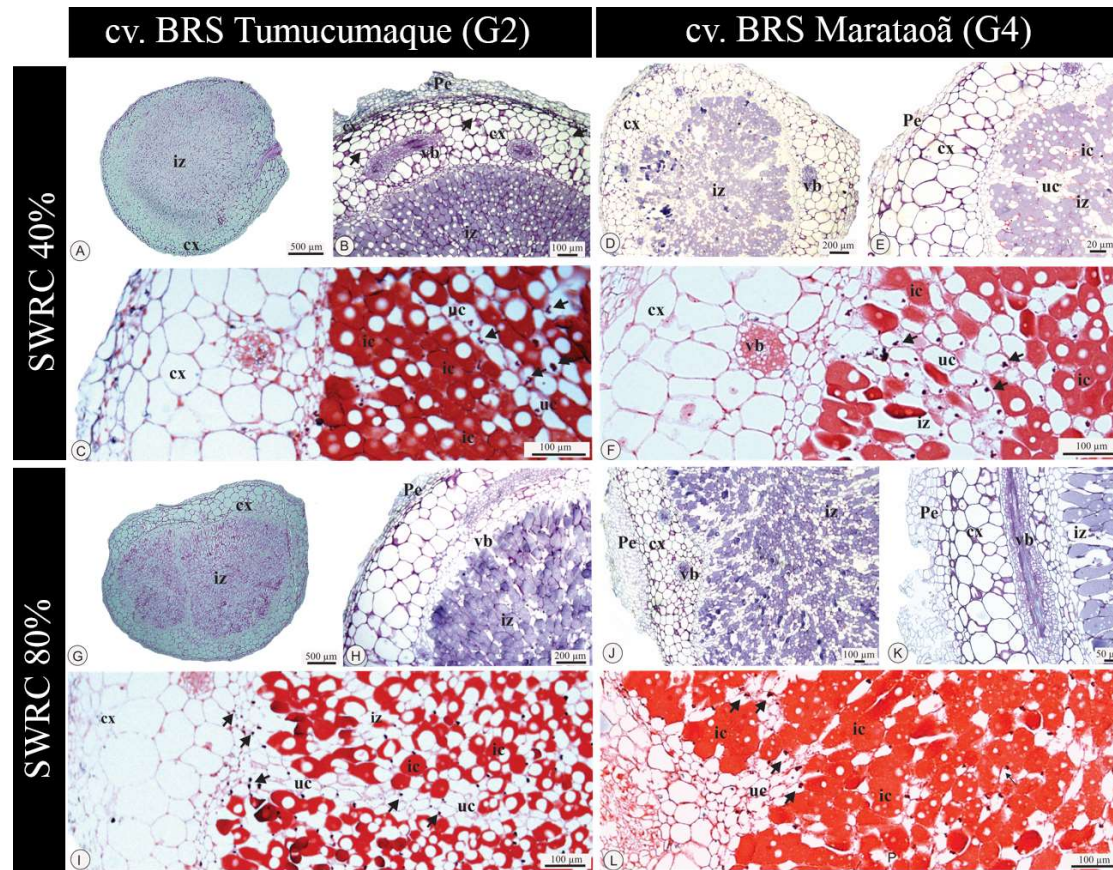


Figure 3. Light microscopy of cross-sectioned nodules *Vigna unguiculata* cultivars under CAD 40% and CAD 80%. A-B; D-E; G-H; J-K: Toluidine blue staining method; C; F; I; L: Xylidine Ponceau staining method. A-C. Cultivar G2 under CAD 40%; D-F. Cultivar G4 under CAD 40%; G-I. G2 under CAD 80%; J-L. Cultivar G4 under CAD 80%; A; D; G; J. Overview of nodules. B;D. The cortical parenchyma cells of nodules of cv. G2 (B) under CAD 40% are smaller than those from the cv. G4 under CAD 40% and present sinuosity in their cell walls. Note a large number of uninfected cell sites in G4 that accumulate protein droplets (arrows in F). G-H; J-K; No difference in the cortex was observed between cultivars under CAD 80%. The infected zone also has more uninfected cells in G4 compared to G2. **cx**-cortex; **vb**- vascular bundle; **iz**- infection zone; **ic**-infected cell; **uc**- uninfected cell; **pe**-periderm.

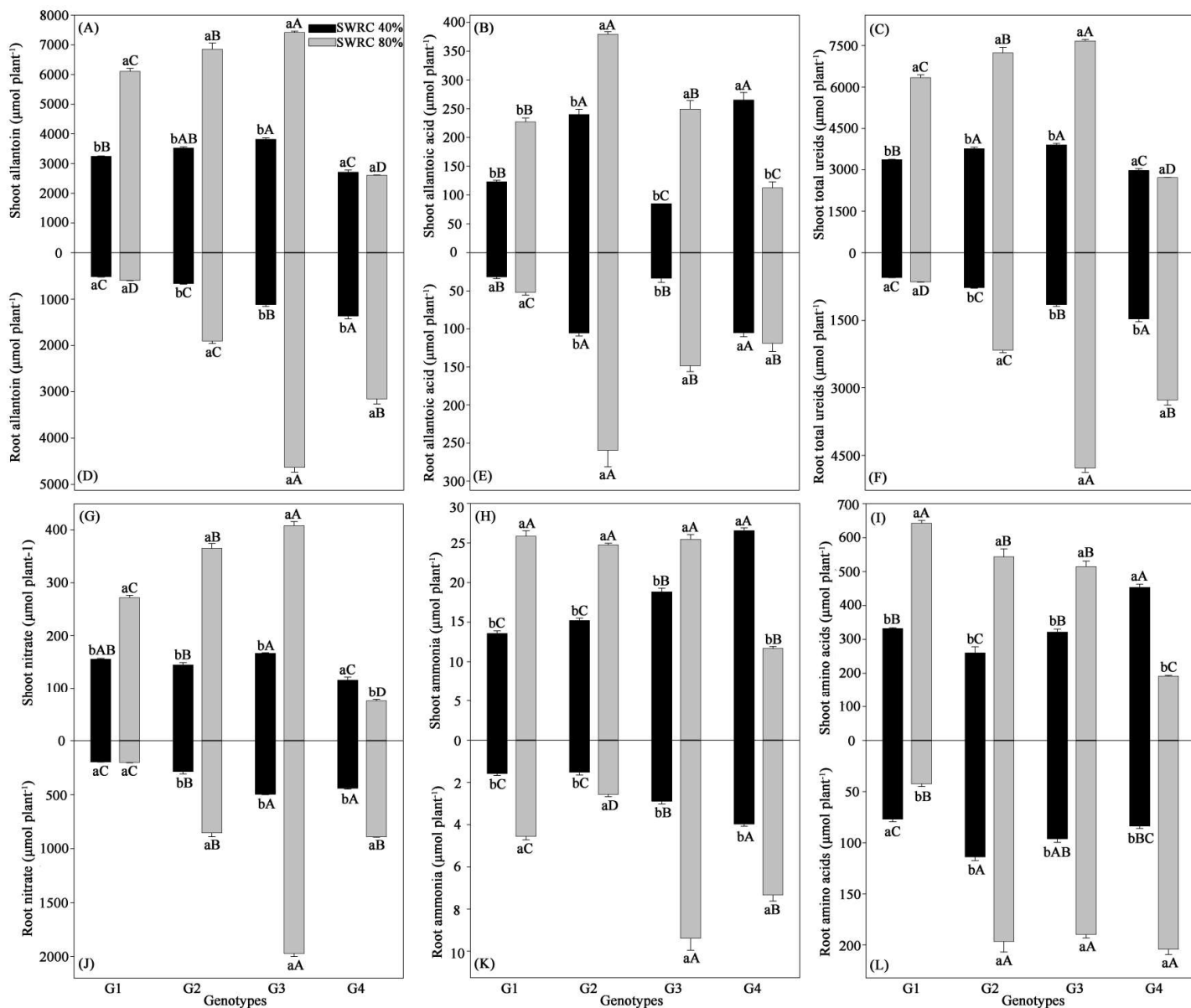


Figure 4. (A) Allantoin accumulation in the aerial part, (B) Allantoic acid accumulation in the aerial part, (C) total ureide accumulation in the aerial part, (D) allantoin accumulation in the root, (E) allantoic acid accumulation in the root, (F) ureid accumulation in the root, (G) nitrate accumulation in the aerial part, (H) ammonia accumulation in the aerial part, (I) accumulation of amino acids in the aerial part, (J) nitrate accumulation in the root, (K) accumulation of ammonia in the root, (L) accumulation of amino acids in the root. Uppercase letters indicate a higher average of genotypes within each CAD and lowercase letters indicate a higher average of each CAD within each genotype.

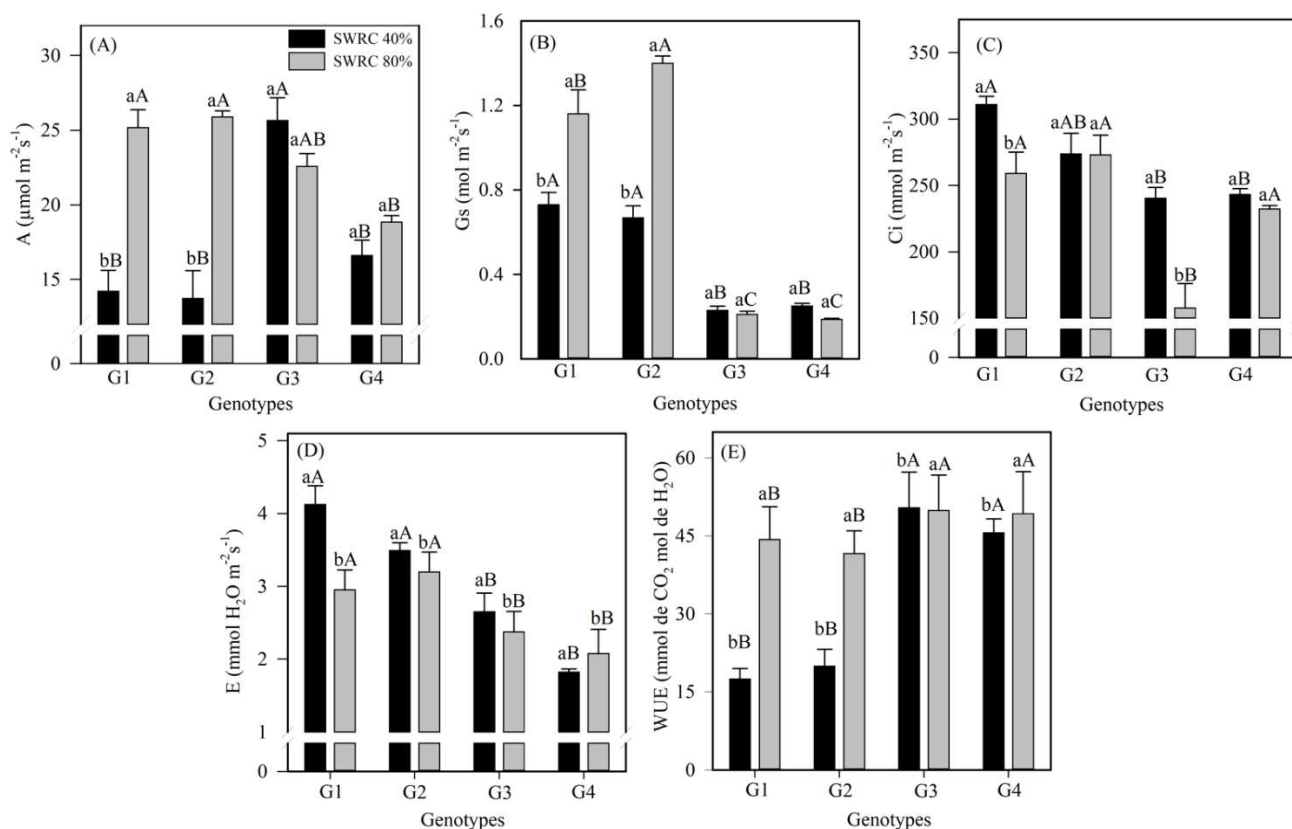


Figure 5. Effect of drought stress on photosynthetic apparatus and water use efficiency of cowpea plants, where; net photosynthetic rates (a), stomatal conductance (b), cellular internal CO₂ concentration (c), transpiration rate (d), water use efficiency (e). Error bars indicate the standard error of the mean (n = 4). Different letters indicate difference between means according to a Tukey test (P ≤ 0.05). Uppercase letters correspond to cowpea genotypes, and lowercase letters correspond to SWRC.

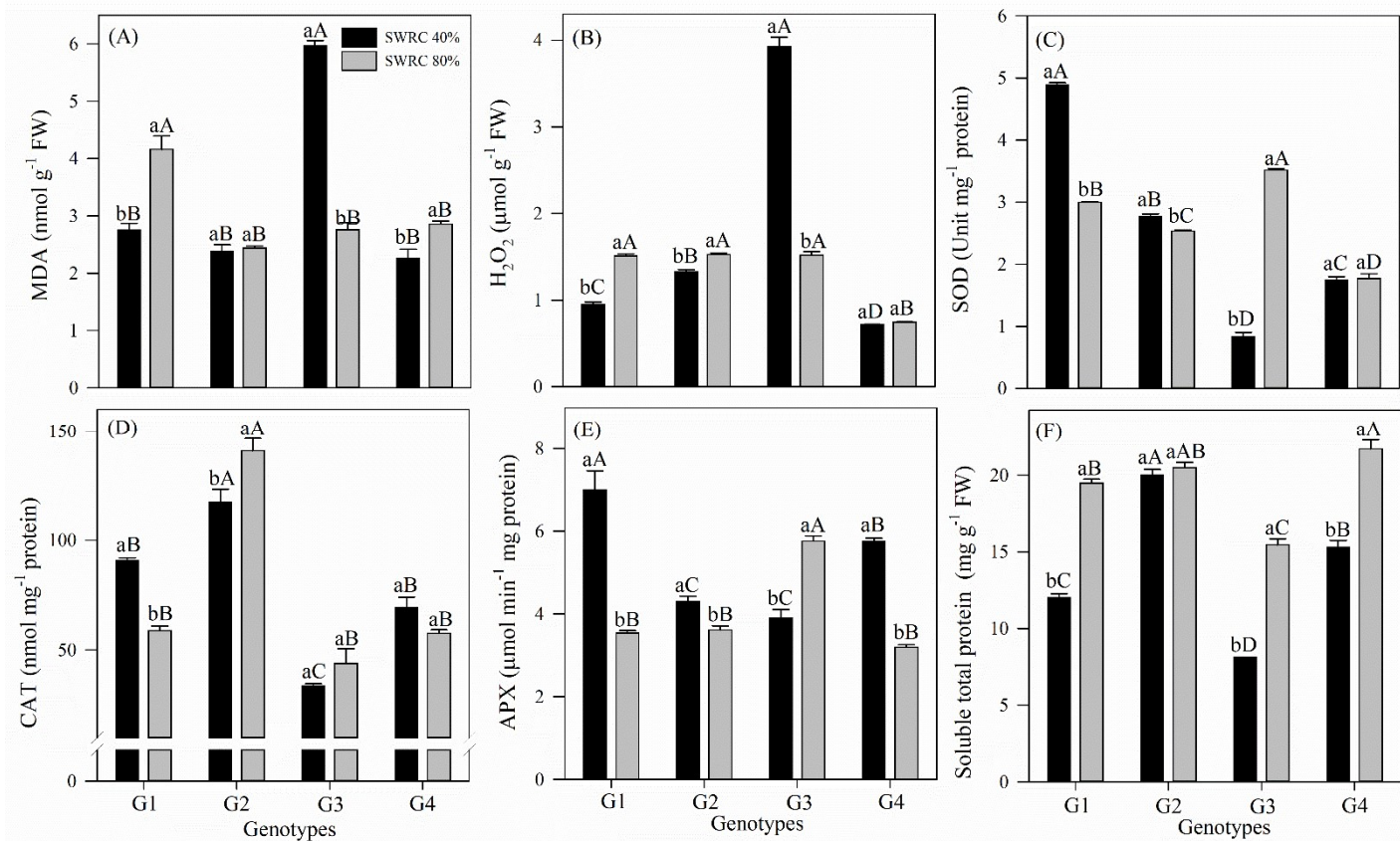


Figure 6. Effect of drought stress on antioxidant metabolism in cowpea leaves, where; lipid peroxidation rates (a), hydrogen peroxide concentration (b), superoxide dismutase activity (c), catalase activity (d), ascorbate peroxidase activity (e) and soluble total protein (f). Error bars indicate the standard error of the mean (n = 4). Different letters indicate difference between means according to a Tukey test ($P \leq 0.05$). Uppercase letters correspond to cowpea genotypes, and lowercase letters correspond to SWRC.

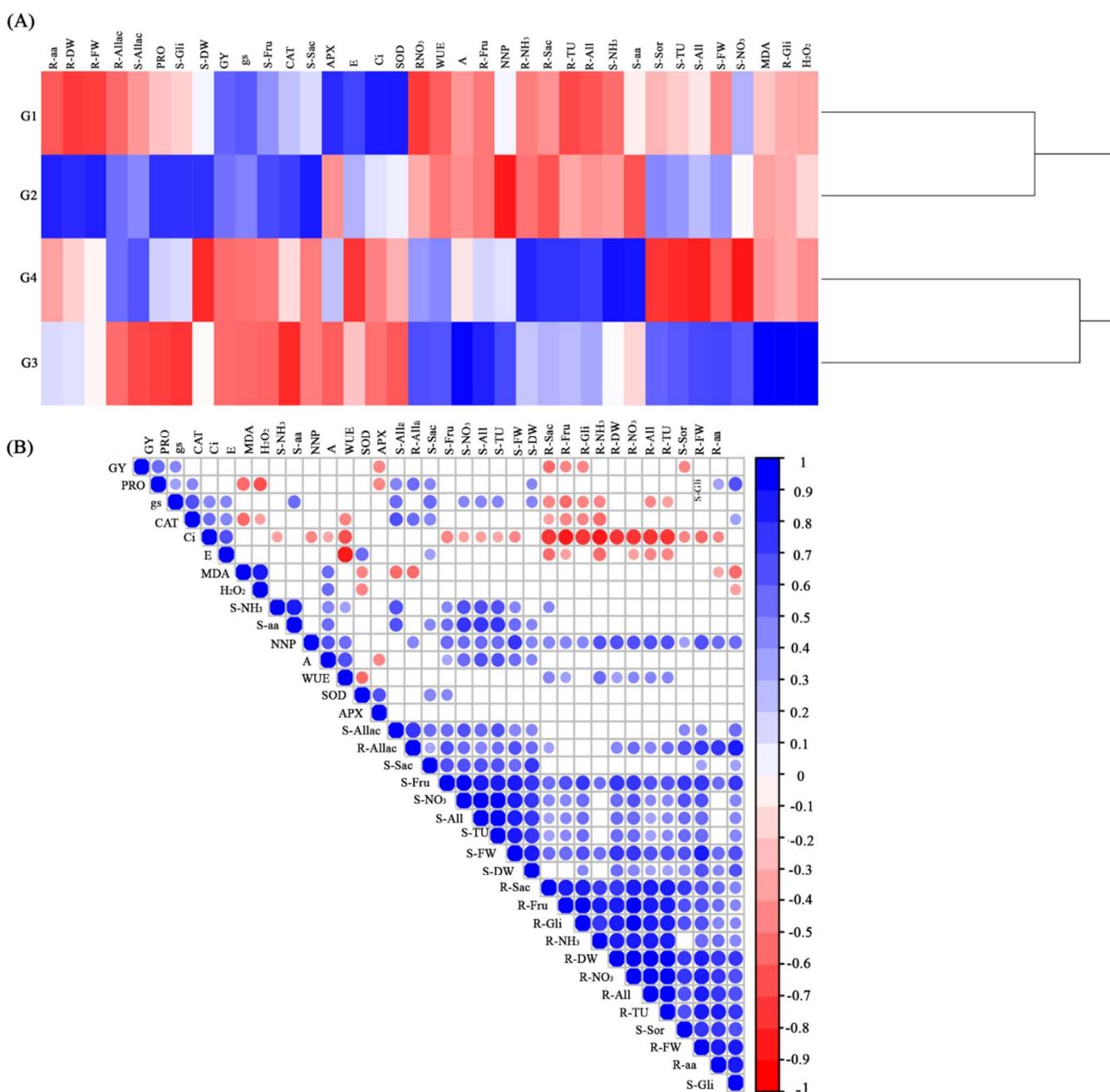


Figure 7. Effect of drought stress on physiological and biochemical parameters in cowpea plants. Cluster heatmap analysis (a) and Heatmap showing the Pearson's correlation coefficients obtained from parameters measured from cowpea plants. Blue scale means the significant positive correlation ($p < 0.05$). Abbreviations: GY – grain yield, PRO – protein, gs – stomatal conductance, CAT – catalase, Ci – internal carbon, E – transpiration, MDA – malondialdehyde, H_2O_2 – peroxide de hydrogen, S- NH_3 – shoot ammonia, S-aa – shoot amino acids, NNP – number of nodules, A – photosynthesis, WUE – water use efficiency, SOD – superoxide dismutase, APX - ascorbate peroxidase, S-Allac – shoot allantoic acid -, R-Allac – root allantoic acid, S-Sac – shoot sucrose, S-Fru – shoot fructose, S- NO_3 – shoot nitrate, S-All – shoot allantoin, S-TU – shoot total ureides, S-FW – shoot fresh weight, S-DW – shoot dry weight, R-Sac – root sucrose, R-Fru – root fructose, R-Gli – root glycose, R- NH_3 – root ammonia, R-DW – root dry weight, R- NO_3 – root nitrate, R-All – root allantoin, R-TU – root total ureides, S-Sor – shoot sorbitol, R-FW – root fresh weight, R-aa – root amino acids, S-Gli – shoot glycose.

Supplementary material

Table 1S. Concentration of fructose, glucose, sorbitol and sucrose in leaves of cowpea genotypes in response to drought stress. Uppercase letters indicate difference between genotypes, and lowercase letters indicate difference between treatments. Identical letters indicate non-significance (ns) according to the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Leaves								
	Fructose		Glucose		Sorbitol		Sucrose	
	mg plant ⁻¹ FW		mg plant ⁻¹ FW		mg plant ⁻¹ FW		mg plant ⁻¹ FW	
	SRWC 40%	SRWC 80%	SRWC 40%	SRWC 80%	SRWC 40%	SRWC 80%	SRWC 40%	SRWC 80%
G1	43.75 bA	63.43 aC	151.76 aB	167.51 aC	23.52 aC	0 bD	332.05 bB	445.98 aA
G2	50.40 bA	106.41 aB	352.38 bA	709.92 aA	27.06 bB	51.70 aB	455.76 aA	444.81 aA
G3	17.95 bB	148.79 aA	31.79 bC	606.50 aB	27.68 bA	60.06 aA	221.57 bC	424.70 aA
G4	19.81 bB	39.41 aD	220.31 bB	548.71 aB	21.25 aD	20.34 bD	222.55 aC	254.24 aB
Roots								
G1	0 C	0 C	0 aB	0 aC	0 aA	0 aA	13.57 aC	0 bC
G2	0 C	0 C	0 aB	0 aC	0 aA	0 aA	0 bC	59.05 aB
G3	16.21 A	100.88 A	25.67 bA	178.73 bA	0 aA	0 aA	56.93 bB	172.24 aA
G4	8.00 B	29.77 B	0 bB	28.61 bB	0 aA	0 aA	85.48 aA	57.50 bB

4 MECANISMO DE DEFESA DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDOS A SECA

RESUMO

O feijão-caupi é uma importante fonte de proteína na alimentação humana, sendo consumida em regiões áridas e semi-áridas no mundo. O estresse por déficit hídrico pode afetar a produção de feijão-caupi, devido ao comprometimento do desenvolvimento de nódulos e o processo de fixação biológica do nitrogênio. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta anatômicas, morfofisiológica e bioquímica de nódulos de diferentes genótipos de feijão caupi, sensíveis: BRS Tracuateua (G1) e BRS Tumucumaque (G2), e tolerantes: Pingo de ouro 1-2 (G3) e BRS Marataoã (G4) submetidos ao déficit hídrico (CAD 40%) ou não (CAD 80%) em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. No estágio R1 foram realizadas as análises de enzimas antioxidativas (SOD, CAT, APX), peroxidação lipídica (MDA e H_2O_2), compostos nitrogenados (alantoína, ácido alantóico, nitrato, amônia), açúcares (sorbitol, manitol, sacarose, frutose e glicose), cortes histológicos e testes histoquímicos. Maiores quantidades de alantoína foram encontradas nos genótipos sensíveis. Houve transporte de frutose para os nódulos dos genótipos tolerantes, o transporte foi maior quando esses genótipos estavam submetidos a restrição hídrica, não houve transporte para os genótipos sensíveis. O teor de sacarose foi maior quando as plantas estavam submetidas ao estresse em todos os genótipos, sendo maior no G4, isso propiciou uma melhor estruturação e organização celular do nódulo dessa cultivar. Anatomicamente, o genótipo tolerante apresentou melhor desenvolvimento do nódulo, células do córtex bem desenvolvidas e endoderme dos feixes vasculares mais organizados. Já no genótipo sensível a seca resultou em uma perda no turgor das células no córtex e alteração na estrutura do nódulo que se transformou em paredes celulares corticais deformadas. Além disso, houve presença de protuberâncias de lenticelas na superfície dos nódulos nos genótipos G2 e G4 em CAD 80%, o estresse hídrico parece reduzir a presença de lenticelas. Os nódulos da cultivar tolerante apresentaram proporção de células infectadas e não infectadas de 5/5, enquanto o genótipo sensível apresentou 7/4 quando cultivadas sob restrição hídrica. Esses resultados demonstram que genótipos apresentam comportamento distinto, e as modificações anatômicas e bioquímicas podem ser fundamental na tolerância em ambiente de estresse. Neste trabalho, foi possível perceber que a capacidade de transporte de açúcares propicia melhor

estruturação anatômica do nódulo, além disso, apresentar alto número de células não infectadas pode contribuir com a síntese dos compostos nitrogenados, sendo um dos melhores marcadores genéticos de genótipos de feijão-caupi tolerantes a seca.

Palavras chave: células infectadas, anatomia de nódulos, alterações fisiológicas, estresse hídrico.

4.1 INTRODUÇÃO

Entre os estresses abióticos, o estresse hídrico está ganhando atenção devido ao seu efeito adverso no crescimento, desenvolvimento e rendimento das plantas, causando insegurança alimentar global (SELEIMAN *et al.*, 2021). A previsão é que a mudanças climáticas acelere no futuro por causa do aumento contínuo da temperatura do ar e dos níveis de CO₂ atmosférico, afetando a distribuição de chuvas (YANG *et al.*, 2019).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é uma importante fonte de proteína vegetal de alta qualidade em muitas partes do mundo (JAYATHILAKE *et al.*, 2018), principalmente em regiões áridas e semi-áridas, onde a escassez hídrica é frequente. Apesar de ser uma cultura conhecida por sua alta plasticidade, a seca, durante os diferentes estágios de crescimento pode reduzir a divisão e a expansão das células, levando ao retardo do crescimento e perdas dramáticas de produção (Tankari *et al.*, 2020). A incorporação da característica tolerante à seca em cultivares permitiria seu cultivo em áreas onde prevalecem condições de déficit hídrico (RAVELOMBOLA *et al.*, 2020).

Os microbiomas do solo podem regular e influenciar o crescimento e a produção das plantas por meio de vários mecanismos metabólicos, formando comunidades ecológicas (Hartmann *et al.*, 2017). A escassez de água tem forte efeito no solo e em seus microbiomas (CHANDRA *et al.*, 2021), pois limita o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), reduzindo a sobrevivência, multiplicação e mobilidade da bactéria *Rhizobia*, levando a baixos níveis de infecção e desenvolvimento radicular (SHRESTHA *et al.*, 2021), podendo resultar em baixo número e tamanho de nódulos.

A FBN é uma reação essencial no ciclo global do nitrogênio, em leguminosas a fixação de N₂ ocorre em nódulos radiculares e é realizada por bacteróides (TEGEDER; MASCLAUX-DAUBRESSE, 2018). A relação simbiótica é iniciada pela planta através da liberação de flavonóides da raiz na rizosfera (KUNERT *et al.*, 2016). Em seguida, as bactérias rizobianas se

fixam aos pelos radiculares e induzem o enrolamento da raiz aprisionando as bactérias e formando os fios de infecção (LI *et al.*, 2015). O acesso bacteriano às células epidérmicas e corticais da planta, induzem a divisão celular da raiz e a formação do meristema do Nódulo (ROY *et al.*, 2020). Divisões simultâneas de células vegetais no córtex da raiz e periciclo desencadeiam a organogênese dos nódulos em células que sofrem infecções com sucesso (XIAO *et al.*, 2014).

As expansinas foram identificadas como mediadores do afrouxamento da parede celular pela teoria de acidificação (MCQUEEN-MASON *et al.*, 1992). Estas proteínas ancoram-se na celulose, onde interrompem a ligação dos glicanos à superfície das microfibrilas ou enfraquecem a ligação não covalente entre os polissacarídeos da parede celular, o que permite o movimento da cadeia do polímero e o relaxamento do estresse e, portanto, podem acomodar a expansão da superfície da parede celular e alargamento (COSGROVE, 2000), possibilitando o crescimento dos nódulos.

O N₂ atmosférico é convertido a amônia pelos bacteróides (Oldroyd *et al.*, 2011) e reduzida em glutamina. Em seguida canalizada para as vias de síntese e degradação das purinas até se transformar em ácido úrico (Smith and Atkins, 2002). Após o movimento simplasmático para as células não infectadas, o ácido úrico é usado para a síntese de alantoína e o ácido alantóico (TODD *et al.*, 2006). O transporte de alantoína e ácido alantóico para fora dos nódulos requer a função de permeases de ureídeo localizadas em células adjacentes à vasculatura (PÉLISSIER *et al.*, 2004).

Collier and Tegeder (2012) observaram correlação positiva entre o acúmulo de alantoína e ácido alantóico nos nódulos com sintomas de deficiência de nitrogênio nas folhas, além disso, verificaram que o tamanho das células foi menor, indicando que a atividade de transporte de ureídeo nos nódulos não é apenas essencial para a exportação e translocação de nitrogênio para a parte aérea, mas também para o desenvolvimento e função do nódulo. A alantoína no nódulo contribui para a proteção contra o estresse e tem sido inexplorado até agora (WATANABE *et al.*, 2014).

Condições desfavoráveis para as plantas, como estresse por seca, congelamento e altas temperaturas resultam na produção elevadas de espécies reativas ao oxigênio (EROS), que são prejudiciais o metabolismo dos nódulos, por propiciar o rompimento da camada lipídica e o extravasamento do líquido do citosol (CHANG *et al.*, 2009), sendo o MDA um indicador de peroxidação lipídica (FOYER, 2018). As enzimas antioxidativas protegem as células contra os efeitos potencialmente danosos de reações destas espécies reativas de oxigênio (Santos *et al.*, 2017).

Avanços recentes na compreensão sobre os efeitos da seca no crescimento do feijão-caupi têm se baseado predominantemente na avaliação de crescimento vegetativo da parte aérea, floração, estágios de desenvolvimento de vagens e sementes e pouca informação sobre como o estresse hídrico afeta a relação simbiótica entre os rizóbios do solo fixadores de nitrogênio e a planta hospedeira. Neste contexto, o objetivo do trabalho é avaliar alterações anatômicas, bioquímicas e influencia dessas alterações na produção de EROS e enzimas antioxidativas nos nódulos de 4 genótipos de feijão-caupi: BRS Tracuateua (G1), BRS Tumucumaque (G2), Pingo de ouro 1-2 (G3) e BRS Marataoã (G4), dessa forma será possível compreender mecanismos de defesa dos nódulos de plantas tolerantes.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na casa de vegetação da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Ilha Solteira, localizada na cidade de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil (20° 25' 4.65" S, 51° 20' 27.89" O, 377 m). Foram coletadas amostras de solo, na camada 0,0 a 0,2 m da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNESP para determinação das características químicas, de acordo com (Raij *et al.*, 2001). As amostras foram encaminhadas ao laboratório de fertilidade do solo para análises químicas, não sendo necessária a calagem. As propriedades químicas observadas foram: pH: 4,9; P: 2 mg/dm³, K: 0,4 mmol/dm³, Ca: 4 mmol/dm³, Mg: 4 mmol/dm³, B: 0,02 mg/dm³, Cu: 0,5 mg/dm³, Fe: 15 mg/dm³, Mn: 4,9, Zn: 0,1 mg/dm³, H+Al: 12 mmol/dm³, CTC: 20,4 mmol/dm³, MO: 12 g/dm. O solo foi classificado como Rhodic Haplustox de acordo com (Soil Survey Staff, 2014).

A adubação de semeadura foi realizada de acordo com a análise do solo com as recomendações de (Raij *et al.*, 2001) sendo: 90 mg/kg P₂O₅ na forma de superfosfato simples, 60 mg/kg K₂O na forma de cloreto de potássio, 2,5 mg/kg de Zn na forma de sulfato de zinco, 2,86 mg/kg de B na forma de ácido bórico, 0,5 mg/kg de Co de solo na forma de cloreto de cobalto, 0,5 mg/kg de Mo de solo na forma de molibdato de amônio. Após 15 dias de plantio, foi realizado adubação de cobertura, sendo 50 mg/kg de N, na forma de uréia. As sementes de feijão-caupi foram semeadas no dia 22/04/2020 em vasos de polietileno contendo exatamente 3 kg de solo (mantendo duas plantas por vaso). As sementes foram tratadas com piraclostrobina (25 g L⁻¹ produto comercial), tiofanato-metil (225 g L⁻¹ produto comercial) e fipronil (250 g L⁻¹ produto comercial) em 2 mL de produto por kg de semente. Após a secagem, as sementes foram inoculadas com um inóculo de turfa premium para o feijão-caupi (cepa SEMIA 6464;

número de registro do produto SP 00581-10030-1; BIOMAX; cidade de São Joaquim da Barra, Brasil) com 8 g kg⁻¹ de semente, objetivando atingir $2,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias g⁻¹. Devido a fenologia do caupi foi necessário realizar o tutoramento das plantas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando 2 níveis de capacidades de água disponível no solo (40% e 80% da CAD) (Carvalho *et al.*, 2019) e 4 genótipos de feijão-caupi: BRS Tracuateua (G1 - sensível), BRS Tumucumaque (G2 - sensível), Pingo de ouro 1-2 (G3- tolerante) e BRS Marataoã (G4 - tolerante) (Bastos *et al.*, 2011; Dutra *et al.*, 2015), contendo 8 repetições por tratamento. O solo foi mantido a 80% da CAD até 20 dias após a semeadura, na sequência foi iniciado o regime de restrição hídrica. A reposição hídrica foi feita a cada 24 horas utilizando o método de gravimetria.

4.3 COLETA DE AMOSTRAS

As coletas de nódulos para análise fisiológicas e anatômicas foram realizadas no estágio fenológico R₁ (plantas contendo o primeiro botão floral no ramo principal. O estágio fenológico R₁ foi escolhido para a coleta de amostras porque este estágio representa o máximo status fisiológico das plantas (e. g., máximo acúmulo de fotoassimilados, nutrientes e compostos nitrogenados) (MUNJONJI *et al.*, 2017). As raízes e nódulos foram lavadas em água corrente e depois em água deionizada, foi realizada a quantificação de nódulos.

4.4 COMPOSTOS NITROGENADOS

Para análise de perfil de compostos nitrogenados e açúcares o material vegetal foi extraído de acordo com a metodologia descrita por (BIELESKI; TURNER, 1966). Para a determinação de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) foi utilizado o método de Vogels and Van Der Drift (1970). Para quantificar a concentração de aminoácidos solúveis totais, foi utilizado o método de (YEMM *et al.*, 1955). Para a determinação de nitrato foi utilizado o método de (CATALDO *et al.*, 1975). A concentração de amônia foi quantificada de acordo com a metodologia descrita por (MCCULLOUGH, 1967).

4.5 ANÁLISE DO PERFIL DE AÇÚCARES

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da Shimadzu, modelo Prominence equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo RID-20^a. Os pontos da curva foram obtidos pela injeção de 5 µL da solução padrão em diferentes concentrações, utilizando um amostrador automático modelo SIL-10AF. O sistema é equipado com uma coluna Shim-Pack GIST NH2 com dimensões de 4,6 x 250 mm e diâmetro de partícula de 5 µm, a 40°C. A fase móvel foi composta de uma solução 90% de acetonitrila. O método foi realizado em 25 minutos em modo isocrático com fluxo de 1 mL min⁻¹.

4.6 Peroxidação lipídica e determinação de peróxido de hidrogênio

A avaliação da peroxidação lipídica foi determinada por meio da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído (MDA), segundo Heath and Packer (1968). A concentração de H₂O₂ foi determinada, de acordo com (Alexieva *et al.*, 2001).

4.7 ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA E ATIVIDADE DE ENZIMAS

Para avaliar a concentração de proteínas, catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), e superóxido dismutase (SOD) a amostragem foi realizada 50 DAP, 30 DAT. O material foi congelado rapidamente em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C.

A extração para enzimas e análise de proteínas foi realizada usando 5 mL de tampão de fosfato de potássio 0,1 M a pH 7,5 contendo ditioneitol 3 mM e ácido etilenodiaminotetracético 1 mM. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi então mantido a -80 °C. Para a análise de proteínas, a absorbância foi registrada em 595 nm usando um espectrofotômetro. A determinação das proteínas foi realizada de acordo com (Bradford, 1976), utilizando alíquota de 5 µL, a curva de calibração foi feita com albumina, e o resultado foi expresso em mg g⁻¹ FW.

A determinação da atividade do ascorbato peroxidase (APX) foi realizada de acordo com (Gratão *et al.*, 2008). Primeiramente, foi feita uma solução contendo 600 µL de tampão de fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0) + 100 µL de ácido ascórbico 5 mM e 100 µL de EDTA 1 mM. A solução foi mantida em banho-maria a 30 °C durante 10 min. Em seguida, foram adicionados 100 µL de H₂O₂ 0,1 mM e 10 µL de extrato protéico. O extrato foi agitado

rapidamente e imediatamente analisado em espectrofotômetro a 290 nm por 1 min. Os resultados foram expressos como $\text{nmoL min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada usando a metodologia de (Azevedo *et al.*, 1998). Em tubos eppendorf, foi adicionado 1 mL de tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5) e 2,5 μL de H_2O_2 30%, seguido de 20 μL de extrato protéico. Imediatamente após a adição do extrato proteico, os tubos foram rapidamente misturados por vórtex. A atividade da enzima foi determinada monitorando o registro de absorbância a 240 nm em um intervalo de 1 min usando um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como $\mu\text{moL min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da SOD foi medida pelo método de (Giannopolitis and Ries, 1977). Para a reação enzimática foi utilizado 50 μL do sobrenadante em seguida adicionado 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8 (50 mM), 250 μL de metionina 13 mM (13 mM), 200 μL de nitroblue de tetrazólio 75 mM (NBT) (75 mM), 200 μL de EDTA 0,1 mM (0,1 mM) e 250 μL de riboflavina 2 μM (2 μM). As amostras foram homogeneizadas por vórtex e mantidas dentro da caixa iluminada por 25 min. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas novamente e registradas para leitura de absorbância em $\lambda = 560 \text{ nm}$ em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em U SOD $\text{mg}^{-1} \text{ proteína}$.

4.8 ANATOMIA DOS NÓDULOS

Foi selecionado um genótipo dentro de cada grupo, sendo o G2 representando os sensíveis e o G4 representando os tolerantes, foram coletados os nódulos mais representativos da raiz principal de cada tratamento. Eles foram seccionados transversalmente na região mediana com ajuda de um bisturi e então fixados em solução de Karnovsky (2% paraformaldehyde, 2,5% glutaraldehyde, 0.05M CaCl_2 in 0.2 M cacodylate buffer of pH 7.2.) - por 24 h (Karnovsky, 1965). Nesse período, as amostras foram colocadas em bomba de vácuo por 15 minutos por 5 vezes e agitadas para melhor penetração do fixador. Os nódulos foram então desidratados por meio de uma série de álcool graduado (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 e 100%), 15 minutos em cada etapa e incorporado em resina plástica (Leica Historesin®, Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha). Nessa etapa, as amostras foram submetidas à bomba de vácuo por 10 vezes e as amostras foram continuamente agitadas. A etapa de infiltração em resina pura levou 4 dias. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotacional Leica RM 2045 com espessura de 5-7 μm . A proporção

de células infectadas / células não infectadas, foi determinada em área de 100 μm x 100 μm , quantificados em 3 pontos diferentes dos nódulos.

Para as análises histológicas usuais, parte dos cortes transversais foram montados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina (Sakai, 1973). Testes histoquímicos de proteínas totais (detecção de radical catiônico total) foi realizado com Xylidine Ponceau 0,1% (Vidal, 1970).

Após a coloração, as lâminas foram montadas com resina sintética Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). As imagens das lâminas foram capturadas digitalmente por meio de um microscópio Zeiss Axionscope com uma câmera de vídeo acoplada. As escalas micrométricas foram impressas diretamente nas imagens.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por meio do Software R (R Development Core Team 2015, v. 3.6), os dados foram submetidos aos testes de normalidade proposto por (Shapiro and Wilk, 1965) e homocedasticidade de Levene, ambos a 5% de significância ($p > 0,05$). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$), e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$). A análise de correlação de Pearson ($p < 0,05$) também foi realizada para identificar variáveis dependentes que são diretamente correlacionadas com os tratamentos. O pacote “corrplot” foi utilizado para criar o Heatmap, com funções “cor” e “cor.mtest” para criar os coeficientes e matrizes de p-valores.

4.10 RESULTADOS

A seca agiu de maneiras diferentes no desenvolvimento de nódulos de feijão-caupi, tolerantes ou sensíveis ao estresse. Maiores quantidades de alantoína nos genótipos submetidos a CAD 40% e 80% foram encontrados no genótipo G1 e G2 (Figura 3A). O acúmulo de ácido alantóico foram encontrados nos genótipos G1, G2 e G4 na CAD 40% (Figura 3B). Quando quantificado os teores de ureídeos totais nos nódulos é possível perceber que os genótipos sensíveis apresentam maiores valores em ambas as CAD's, detalhadamente o genótipo G1 e G2 apresentaram maiores valores e não tiveram diferença significativa entre si, o G2 por sua

vez não apresentou diferença em relação ao G3. O genótipo G4 foi o que menos acumulou ureídeos nos nódulos e foi o único genótipo que apresentou maior teor de ureídeos na CAD 40%, quando comparamos com a CAD 80% (Figura 3C).

Em relação ao acúmulo de nitrato todos os genótipos apresentaram maiores valores na CAD 40% (cerca de 9%, 10%, 12% e 35%, respectivamente) (Figura 3D). O acúmulo de amônia também foi maior para os genótipos G1, G2 e G4 na CAD 40%, apenas o G3 apresentou maior acúmulo na CAD 80% (cerca de 49%) (Figura 3E). Não houve diferença significativa no acúmulo de aminoácidos para as cultivares G2, G3 e G4 quando comparado entre CAD's, na cultivar G1 a CAD 80% foi 14% maior que a CAD 40% (Figura 3F).

O acúmulo elevado de MDA nos genótipos G1, G2 e G3 na CAD 40% indica peroxidação lipídica, nesses genótipos foi possível observar maior conteúdo de MDA na CAD 40%. O genótipo G4 apresentou menor nível de MDA na CAD 40% (Figura 4A). Já o acúmulo de H_2O_2 não houve diferença significativa entre CAD's para os genótipos G2, G3 e G4. Já o genótipo G1 apresentou menor teor na CAD 40% (Figura 4B). A redução de H_2O_2 no genótipo G1 submetido ao estresse pode estar relacionado com a alta atividade das enzimas APX, SOD e CAT. Os altos teores das enzimas antioxidativas na CAD 40% pro genótipo G3, resultou na redução de peroxidação lipídica e H_2O_2 nesse tratamento (Figura 4CDE). Houve aumento significativo de CAT para todos os genótipos da CAD 40% (cerca de 61%, 46%, 32% e 59%, respectivamente).

O transporte de açúcares e fotoassimilados para os nódulos possui papel importante na estruturação e desenvolvimento dos nódulos, bem como na sobrevivência das bactérias. Nesse trabalho foi possível observar que houve transporte de frutose para os nódulos em genótipos tolerantes ao estresse hídrico, o transporte foi maior quando esses genótipos estavam submetidos a restrição hídrica, não houve transporte de frutose para os genótipos sensíveis (Figura 4A). Houve transporte de glicose para os nódulos em todos os genótipos, no entanto, o teor foi maior no G4 quando submetido a CAD 40%. Houve presença de sorbitol nos genótipos G1, G2 e G4 na CAD 40%, mas apenas no G4 existia presença desse açúcar quando as plantas estavam em CAD 80%. O teor de sacarose foi maior quando as plantas estavam submetidas ao estresse em todos os genótipos, sendo que o G4 apresentou maior valor. Quando analisado o acúmulo de açúcares totais, é possível perceber que tanto os genótipos sensíveis quanto os tolerantes apresentaram maiores teores na CAD 40% (cerca de 42%, 28%, 43% e 71%) (Figura 5F).

Os nódulos de feijão-caupi são compostos periderme, que protege o córtex dos nódulos. Na região do córtex existe a ocorrência de feixes vasculares. No interior do nódulo existe a zona de infecção, composta por células infectadas e não-infectadas (Figura 2).

O corante vermelho de rutênio indicou gotas de compostos polissacarídeos na coloração verde em grande quantidade nas células não infectadas e em alguns casos em vacúolos de células infectadas. Essas gotas parecem estar caminhando até os feixes vasculares. No genótipo G2 as gotas parecem estar presentes apenas dentro da zona de infecção, já no G4 foi possível perceber presença na região do córtex e entorno da endoderme dos feixes vascular (Figura 2).

O corante xylidine ponceau indicou maior presença de proteínas nas células não infectadas dos nódulos, no entanto o G2 na CAD 40% apresentou proteína nos vacúolos de células infectadas. As gotas de proteínas também parecem caminhar sentido ao feixe vascular. Apesar de apresentar menor número de célula não-infectada na CAD 40%, houve maior presença de proteína no G2 da CAD 40% (Figura 2), colaborando com o resultado obtido a partir da metodologia de Bradford.

O corante azul de toluidina indicou que o genótipo G4 apresentou redução no número de células infectadas quando submetido a restrição hídrica. Apesar desse resultado foi possível verificar células maiores do córtex, e boa organização da endoderme do feixe vascular. O genótipo sensível apresentou células com sinuosidade na região do córtex e desorganização da endoderme. Curiosamente o genótipo que apresentou melhor estruturação dos nódulos foi o genótipo com maior teor total de açúcar. Foi possível observar protuberâncias das lenticelas na superfície do nódulo quando os genótipos estavam em CAD 80%, a restrição hídrica parece ter limitado o desenvolvimento de lenticelas (Figura 2).

4.11 DISCUSSÕES

O feijão-caupi desenvolve nódulos esféricos determinados com uma região interna que contém as células infectadas por bacteróides que atuam na fixação de N_2 e assimilação de N, bem como células não infectadas onde ocorre a síntese de ureídeos. Essa zona central é circundada por uma camada de células do córtex interno, composta pela zona de distribuição e a camada limite, que é delimitada por um córtex médio, córtex externo e, finalmente, a periderme. Os feixes vasculares são circundados por uma endoderme que ficam localizados na periferia adjacente ao córtex interno e estão conectados ao sistema vascular da raiz. Os ureídeos deixam o nódulo pelo xilema que está conectado à vasculatura da raiz (Figura 2).

O estresse hídrico pode afetar o desenvolvimento de nódulos em vários níveis, no entanto plantas tolerantes apresentam algumas características que possibilitam suportar o estresse e manter a FBN.

A formação de ureídeos é iniciada com a biossíntese das purinas em plastídios e mitocôndrias de células infectadas (Smith and Atkins, 2002; Tajima *et al.*, 2004). Já o transporte ocorre pela expressão dos mRNAs transportador de ureídeos na endoderme e feixes vasculares dos nódulos (Springer Netherlands, 2008). O acúmulo de ureídeos nos nódulos de genótipos sensíveis pode ter ocorrido má formação da endoderme e feixes vasculares, sendo um indicador de baixa expressão de mRNAs transportador de alantoína e ácido alantóico. Outros autores relaram que o acúmulo de ureídeos em nódulos pode ser uma característica de plantas sensíveis a seca. Uma das hipóteses postulada para explicar o acúmulo de compostos nitrogenados nos órgãos subterrâneos sugere um declínio na demanda de nitrogênio na parte aérea (Valentine *et al.*, 2018). (Gil-Quintana *et al.*, 2013) observaram que o acúmulo de ureídeos nos nódulos pode ser mais atribuível a um declínio na atividade de degradação do que ao aumento da biossíntese.

A redução de H₂O₂ no genótipo G1 é resultado do aumento da CAT, pois é uma das duas principais vias de remoção de H₂O₂ intracelular (Noctor *et al.*, 2016). As bactérias também devem lidar com as EROS, pois se não desintoxicadas podem danificar as macromoléculas celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA (Kunert *et al.*, 2016). A enzima APX é abundante em algumas camadas de células no córtex interno do nódulo, sugerindo que APX pode estar envolvido como parte da barreira de difusão de oxigênio (Springer Netherlands, 2008), a atividade dessa enzima foi maior no genótipo G4 em CAD 40 %, esse resultado levou a redução de MDA nesse tratamento, significando baixa peroxidação lipídica. Embora abundante nos peroxissomos de células não infectadas de nódulos, não está claro se a atividade da catalase ocorre nos mitocôndrias dos nódulos (Becana *et al.*, 2010), neste trabalho a atividade da CAT foi maior quando os genótipos foram submetidos ao estresse hídrico (Figura 4).

O estresse hídrico pode reduzir a atividade fotossintética e eficiência no uso da água (LI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2018), esse resultado pode causar disruptura nos processos fisiológicos das plantas, levando a baixa produção e transporte de fotoassimilados para outros órgãos das plantas, aumentando a expressão de genes envolvidos no armazenamento e utilização de carboidratos e suprimindo a expressão do gene fotossintético e o crescimento subsequente (STITT *et al.*, 2010). O carregamento bem sucedido de açúcares depende muito das peculiaridades anatômicas dos tipos de células envolvidos (KELLER *et al.*, 2021). O acúmulo de açúcares nas folhas foi relatado em várias culturas, entre elas a soja (*Glycine max.*) submetido ao estresse hídrico (DU *et al.*, 2020), em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*)

submetido ao estresse por frio (SUN *et al.*, 2017). Esse acúmulo indica baixo transporte e disponibilidade de energia para estruturação de outros tecidos das plantas.

A principal via para o metabolismo de carbono nos nódulos envolve a clivagem da sacarose em UDP-glicose e frutose seguida pela glicólise para produzir os ácidos orgânicos oxaloacetato e malato (LÓPEZ *et al.*, 2008) (Figura 1). A sacarose foi o açúcar mais presente nos nódulos de todos os genótipos, sendo em maior quantidade quando os genótipos foram submetidos ao estresse hídrico (Figura 5E), resultado semelhante foi encontrado por (Streeter, 2003) em nódulos de soja (*Glycine max.*). O acúmulo de solutos orgânicos em resposta ao estresse está envolvido em mecanismos de proteção, como a restauração do volume e turgor celular, redução do dano celular induzido por radicais livres e a proteção e estabilização de enzimas e membrana (CHEN; MURATA, 2002). Apesar desse resultado o G4 foi o genótipo que apresentou maior teor de sacarose no nódulo na CAD 40%, isso propiciou maior tamanho de nódulo (Figura 2O), (Borisjuk *et al.*, 2002) relataram a probabilidade do aumento da concentração local de sacarose ser um sinal para o início do alongamento celular, isso explicaria o aumento das células do córtex do G4 sob restrição hídrica (Figura 2).

Enquanto a sacarose está localizada principalmente no citosol, a glicose e frutose são preferencialmente armazenadas no vacúolo de algumas espécies (KELLER *et al.*, 2021). Nos nódulos de feijão-caupi foi possível observar presença de frutose apenas nos nódulos de genótipos tolerantes ao estresse (Figura 5A). A sacarose pode ser descarregada do floema por transportadores. Podendo entrar nas células por meio de transportadores sacarose ou hidrolisado pela invertase da parede celular para produzir glicose e frutose, que podem entrar nas células fonte por meio de transportadores de hexose (Ruan, 2014). O acúmulo de carboidratos e nitrogênio em nódulos estressados pela seca sugere que o poder de redução para sustentar a nitrogenase estava se acumulando e que a exportação de produtos de fixação foi retardada em condições de seca. A tolerância ao estresse salino foi aumentada em células com níveis maiores de aminoácidos, sacarose, glicose e frutose (Niazian *et al.*, 2021).

A taxa de fluxo do floema parece ser determinada adicionalmente pela anatomia da parede celular das células próximas ao floema (KELLER *et al.*, 2021). As condições de deficiência de água resultaram em uma perda no turgor das células no córtex do nódulo e alteração na estrutura do nódulo que se transformou em paredes celulares corticais externas deformadas no genótipo sensível. Essa alteração estrutural afetou a disponibilidade de fotoassimilados para sustentação de bacteróides. Também houve presença de protuberâncias de lenticelas na superfície dos nódulos nos genótipos G2 e G4 em CAD 80%, o estresse hídrico reduziu essas protuberância (Figura 2), resultado semelhante foi obtido por (Kanu and Dakora, 2017; Minchin and

Summerfield, 1976). As protuberâncias das lenticelas na superfície do nódulo têm sido implicadas como agentes físicos no transporte de oxigênio para os tecidos bacterianos internos (SPRENT, 1972), podendo prevenir a degeneração dos tecidos bacterianos e, assim, facilitar a fixação contínua de nitrogênio simbiótico e o crescimento vegetativo da planta.

Em plantas irrigadas os nódulos pareciam estar bem desenvolvidos e sem perturbações. No entanto, os nódulos da cultivar tolerante apresentaram número de células infectadas e não infectadas de 5/5, enquanto o genótipo sensível apresentou 7/4 quando cultivadas em estresse hídrico, quando submetidas a CAD 80% a cultivar tolerante apresentou proporção de 5/3 e a sensível de 2/1. Vários feixes vasculares foram espalhados na periferia das seções transversais. A região do córtex do genótipo tolerante na CAD 40% apresentou células do córtex maiores que o genótipo sensível, essa extensão celular possibilitou que os genótipos desse tratamento apresentassem nódulos maiores. As células infectadas foram espalhadas em no centro do nódulo e consistia em células vacuoladas e células não vacuoladas misturadas com células intersticiais não infectadas. Para manter um número apropriado de nódulos, as plantas hospedeiras possuem ambos sistemas regulatórios positivos e negativos para facilitar a formação de nódulos e evitar a hipernodulação (Li *et al.*, 2015).

A coloração histoquímica utilizando o corante xyloidine ponceau indicou maior presença de proteína nas células não-infectadas. O fato de o genótipo tolerante apresentar menor teor de proteína nos nódulos que o genótipo sensível (Figura 2).

4.12 CONCLUSÃO

A capacidade de produzir e transportar açúcares para os nódulos pode propiciar turgor das células do córtex e melhor organização de estruturas, como endoderme, feixes vasculares, resultado obtido pelo genótipo tolerante. A presença de frutose nos nódulos de genótipos tolerantes e ausência nos nódulos de genótipos sensíveis, demonstra importância desse açúcar no desenvolvimento nodular. No genótipo sensível, a seca resultou em redução do transporte de açúcar e consequentemente perda no turgor das células no córtex e alteração na estrutura do nódulo que se transformou em paredes celulares corticais externas deformadas.

Apesar da importância das células infectadas dos nódulos, a síntese de compostos nitrogenados ocorre nas células não-infectadas, apresentar quase os mesmos números de células infectadas e não infectadas pode ser um indicativo de maior síntese de ureídeos, resultado obtido pelo genótipo tolerante. O genótipo sensível apresentou maior número de célula

infectada que não infectada, podendo dificultar a síntese e transporte de nitrogênio para outras partes das plantas.

Os resultados demonstraram que genótipos apresentam comportamento distinto, e as modificações anatômicas e bioquímicas podem ser fundamental na tolerância em ambiente de estresse. Neste trabalho, foi possível perceber que a capacidade de transporte de açúcares propicia melhor estruturação anatômica do nódulo, além disso, apresentar alto número de células não infectadas pode contribuir com a síntese dos compostos nitrogenados, sendo um dos melhores marcadores genéticos de genótipos de feijão-caupi tolerantes a seca.

REFERÊNCIAS

- ALEXIEVA, V. *et al.* The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.
- AZEVEDO, R. A. *et al.* Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 280–292, 1998.
- BASTOS, E. A. *et al.* Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. **Revista Ciência Agronômica**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 100–107, 2011.
- BECANA, M. *et al.* Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. **New Phytologist**, [s. l.], v. 188, n. 4, p. 960–976, 2010.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 278–293, 1966.
- BORISJUK, L. *et al.* Spatial analysis of plant metabolism: Sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 521–530, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CARVALHO, M. *et al.* Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 241, p. 153001, 2019.
- CATALDO, D. A. *et al.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975.
- CHANDRA, P. *et al.* Strategies to mitigate the adverse effect of drought stress on crop plants— influences of soil bacteria: A review. **Pedosphere**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 496–509, 2021.
- CHANG, C. *et al.* Redox Changes during the Legume–Rhizobium Symbiosis. **Molecular Plant**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 370–377, 2009.
- CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 250–257, 2002.
- COLLIER, R.; TEGEDER, M. Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 355–367, 2012.
- COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, [s. l.], v. 407, n. 6802, p. 321–326, 2000.
- DILWORTH, M. J. *et al.* **Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses**. Dordrecht: Springer Netherlands, [S. l.: s. n.], 2008. *E-book*.
- DU, Y. *et al.* Effect of Drought Stress during Soybean R2–R6 Growth Stages on Sucrose Metabolism in Leaf and Seed. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n.

2, p. 618, 2020.

DUTRA, A. F. *et al.* Physiologic parameters and yield components of cowpea grown under water deficit. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 189-197, 2015.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. **Embrapa Solos**, [s. l.], p. 353, 2013.

FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 154, p. 134–142, 2018.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.

GIL-QUINTANA, E. *et al.* Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 64, n. 8, p. 2171–2182, 2013.

GRATÃO, P. L. *et al.* Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, [s. l.], v. 153, n. 3, p. 321–333, 2008.

HARTMANN, M. *et al.* A decade of irrigation transforms the soil microbiome of a semi-arid pine forest. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 1190–1206, 2017.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

JAYATHILAKE, C. *et al.* Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 98, n. 13, p. 4793–4806, 2018.

KANU, S. A.; DAKORA, F. D. Symbiotic functioning, structural adaptation, and subcellular organization of root nodules from *Psoralea pinnata* (L.) plants grown naturally under wetland and upland conditions in the Cape Fynbos of South Africa. **Protoplasma**, [s. l.], v. 254, n. 1, p. 137–145, 2017.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 1A-149A, 1965.

KELLER, I. *et al.* Improved resource allocation and stabilization of yield under abiotic stress. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 257, p. 153336, 2021.

KNEESHAW, S. *et al.* Nucleoredoxin guards against oxidative stress by protecting antioxidant enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 114, n. 31, p. 8414–8419, 2017.

KUNERT, K. J. *et al.* Drought Stress Responses in Soybean Roots and Nodules. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, n. 1015, 2016.

LI, B. *et al.* Elevated CO₂-induced changes in photosynthesis, antioxidant enzymes and signal transduction enzyme of soybean under drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 154, p. 105–114, 2020.

LI, X. *et al.* GmEXPB2, a Cell Wall β -Expansin Gene, Affects Soybean Nodulation through Modifying Root Architecture and Promoting Nodule Formation and Development. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 169, n. 4, p. 2640–2653, 2015.

LÓPEZ, M. *et al.* Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*

- under NaCl stress: Nodule carbon metabolism. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 165, n. 6, p. 641–650, 2008.
- MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 297–304, 1967.
- MCQUEEN-MASON, S. *et al.* Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 1425–1433, 1992.
- MINCHIN, F. R.; SUMMERFIELD, R. J. Symbiotic nitrogen fixation and vegetative growth of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) in waterlogged conditions. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 113–127, 1976.
- MUNJONJI, L. *et al.* Stomatal Behavior of Cowpea Genotypes Grown Under Varying Moisture Levels. **Sustainability**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 12, 2017.
- NIAZIAN, M. *et al.* Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) vs. Flavodoxin (Fld): Two Important Genes for Enhancing Plants Stress Tolerance and Productivity. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, 2021.
- NOCTOR, G. *et al.* Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 1140–1160, 2016.
- OLDROYD, G. E. D. *et al.* The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. **Annual Review of Genetics**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 119–144, 2011.
- PÉLISSIER, H. C. *et al.* PvUPS1, an Allantoin Transporter in Nodulated Roots of French Bean. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 134, n. 2, p. 664–675, 2004.
- RAIJ, B. V. *et al.* Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. **Campinas: Instituto Agrônômico**, [s. l.], n. 19, p. 285, 2001.
- RAVELOMBOLA, W. *et al.* Evaluation of cowpea for drought tolerance at seedling stage. **Euphytica**, [s. l.], v. 216, n. 8, p. 123, 2020.
- ROY, S. *et al.* Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 15–41, 2020.
- RUAN, Y. L. Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 33–67, 2014.
- SAKAI, W. S. Simple Method for Differential Staining of Paraffin Embedded Plant Material Using Toluidine Blue O. **Stain Technology**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 247–249, 1973.
- SANTOS, E. F. *et al.* Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 113, p. 6–19, 2017.
- SELEIMAN, M. F. *et al.* Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects. **Plants**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 259, 2021.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, [s. l.], v. 52, n. 3/4, p. 591, 1965.
- SHRESTHA, R. *et al.* Does the drought tolerance of guar *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. extend belowground to root nodules? **Journal of Agronomy and Crop Science**, [s. l.], 2021.

- SMITH, P. M. C.; ATKINS, C. A. Purine Biosynthesis. Big in Cell Division, Even Bigger in Nitrogen Assimilation. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 128, n. 3, p. 793–802, 2002.
- SPRENT, J. I. THE EFFECTS OF WATER STRESS ON NITROGEN-FIXING ROOT NODULES. **New Phytologist**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 443–450, 1972.
- STITT, M. *et al.* Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism - more than the icing on the cake. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 1067–1091, 2010.
- STREETER, J. G. Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 1199–1204, 2003.
- SUN, B. *et al.* Effects of Cold Stress on Root Growth and Physiological Metabolisms in Seedlings of Different Sugarcane Varieties. **Sugar Tech**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 165–175, 2017.
- TAJIMA, S. Ureide biosynthesis in legume nodules. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. 9, n. 1–3, p. 1374, 2004.
- TANKARI, M. *et al.* Drought priming improved water status, photosynthesis and water productivity of cowpea during post-anthesis drought stress. **Agricultural Water Management**, [s. l.], v. 245, p. 106565, 2021.
- TEGEDER, M.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. **New Phytologist**, [s. l.], v. 217, n. 1, p. 35–53, 2018.
- TODD, C. D. *et al.* Update on ureide degradation in legumes. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 5–12, 2006.
- VALENTINE, A. J. *et al.* Legume Nitrogen Fixation and Soil Abiotic Stress: From Physiology to Genomics and Beyond. In: **Annual Plant Reviews online**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018. p. 207–248. *E-book*.
- VIDAL, B. de C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. **Annales d'histochimie**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 289–96, 1970.
- VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 143–157, 1970.
- WANG, Z. *et al.* Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. **Biology Open**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. bio035279, 2018.
- XIAO, T. T. *et al.* Fate map of Medicago truncatula root nodules. **Development**, [s. l.], v. 141, n. 18, p. 3517–3528, 2014.
- YANG, H. *et al.* Compensatory climate effects link trends in global runoff to rising atmospheric CO₂ concentration. **Environmental Research Letters**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 124075, 2019.
- YEMM, E. W. *et al.* The determination of amino-acids with ninhydrin. **The Analyst**, [s. l.], v. 80, n. 948, p. 209, 1955.

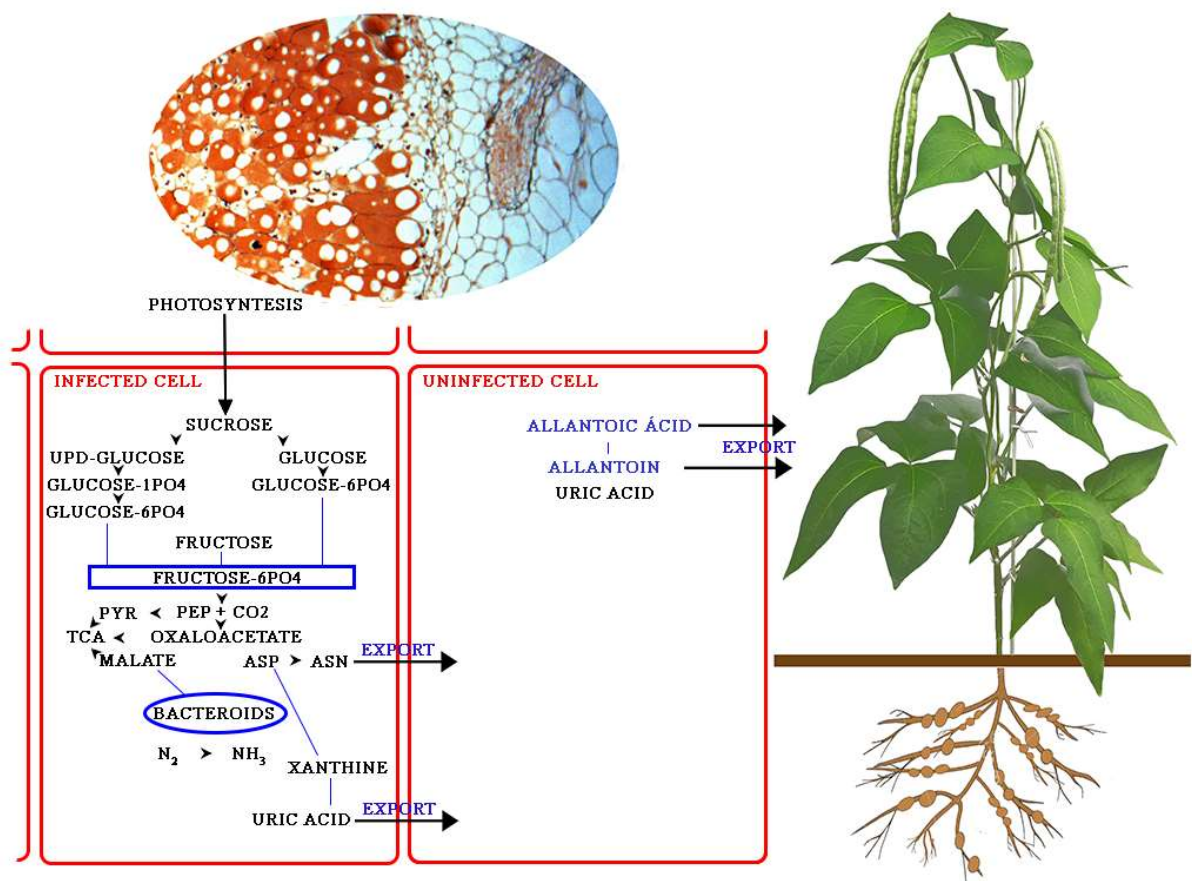


Figura 1. Esquema geral do metabolismo de N e C em nódulos de leguminosas. A sacarose é clivada pela sacarose sintase ou invertase formando UDP-glucose ou frutose. As hexoses são metabolizadas podendo ser convertido em piruvato para entrar no ciclo do TCA ou, alternativamente, em oxaloacetato. O oxaloacetato pode ser reduzido a malato fornecendo carbono para os bacteróides e para a biossíntese do aspartato. Com a entrada do N_2 no bacteróides a assimilação inicial de NH_4^+ em glutamina ocorre no citosol da célula infectada. As células infectadas também desempenham um papel importante na síntese de glutamato (GLU), aspartato (ASP) e xanthine. A xanthine por sua vez é metabolizada em ácido úrico na célula infectada. O ácido úrico é exportado para as células não infectadas e metabolizado em alantoína e ácido alantóico, que são exportados através do xilema para outros órgãos das plantas.

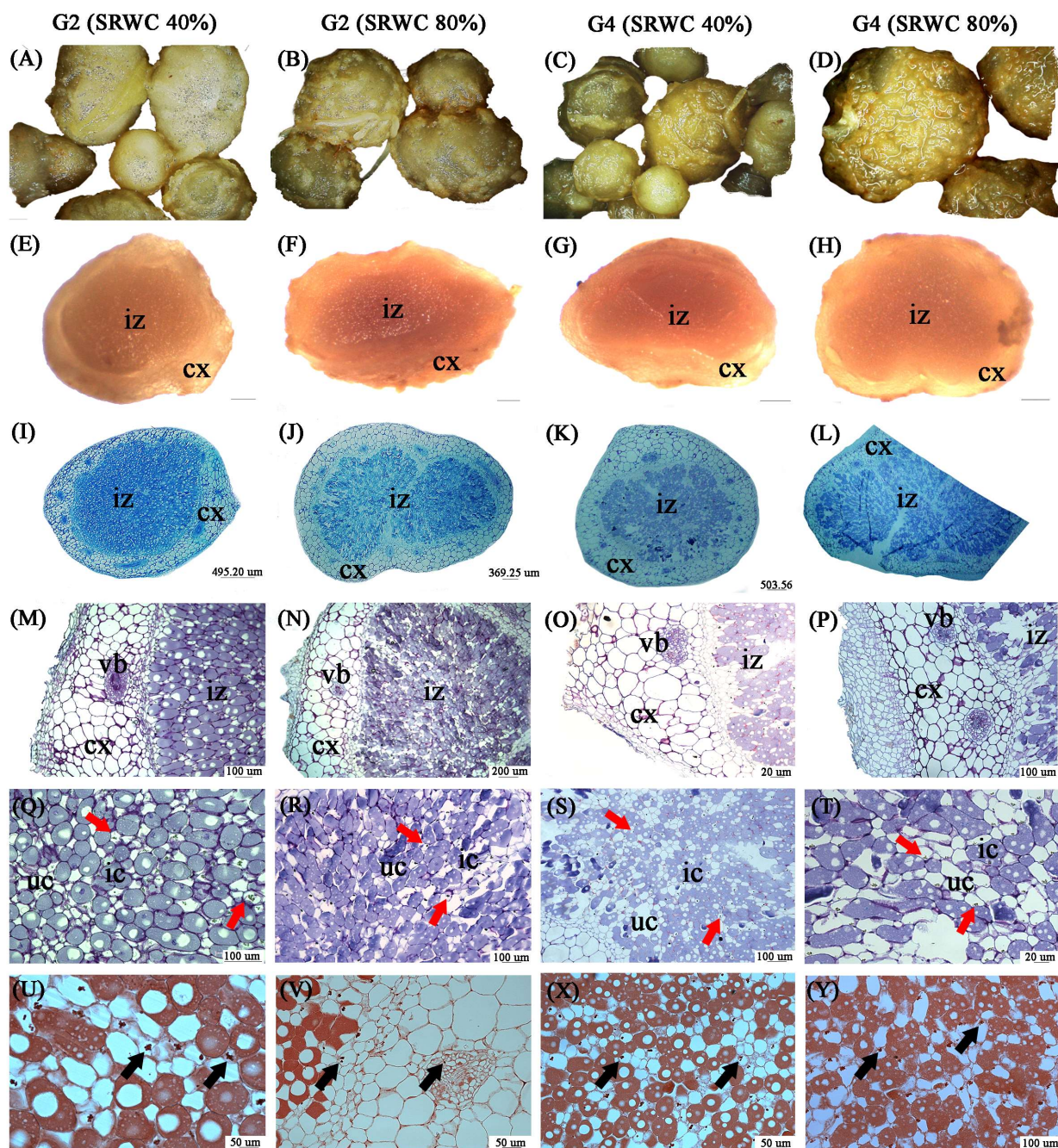


Figura 2. (A) Nódulo completo G2 CAD 40%, (B) Nódulo completo G2 CAD 80%, (C) Nódulo completo G4 CAD 40%, (D) Nódulo completo G4 CAD 80%, (E) Corte transversal nódulo G2 CAD 40%, (F) Corte transversal nódulo G2 CAD 80%, (G) Corte transversal nódulo G4 CAD 40%, (H) Corte transversal nódulo G4 CAD 80%, (I) G2 CAD 40%, (J) G2 CAD 80%, (K) G4 CAD 40%, (L) G4 CAD 80%, (M) G2 CAD 40%, (N) G2 CAD 80%, (O) G4 CAD 40%, (P) G4 CAD 80%, (Q) G2 CAD 40%, (R) G2 CAD 80%, (S) G4 CAD 40%, (T) G4 CAD 80%, (U) Proteína G2 CAD 40%, (V) G2 CAD 80%, (W) G4 CAD 40%, (X) G4 CAD 80%. **cx**-cortex; **vb**-feixe vascular; **iz**-zona de infecção; **ic**-célula infectada, **uc**-célula, não-infectada, mucilagem (indicado pela seta vermelha), proteína (indicado pela seta preta).

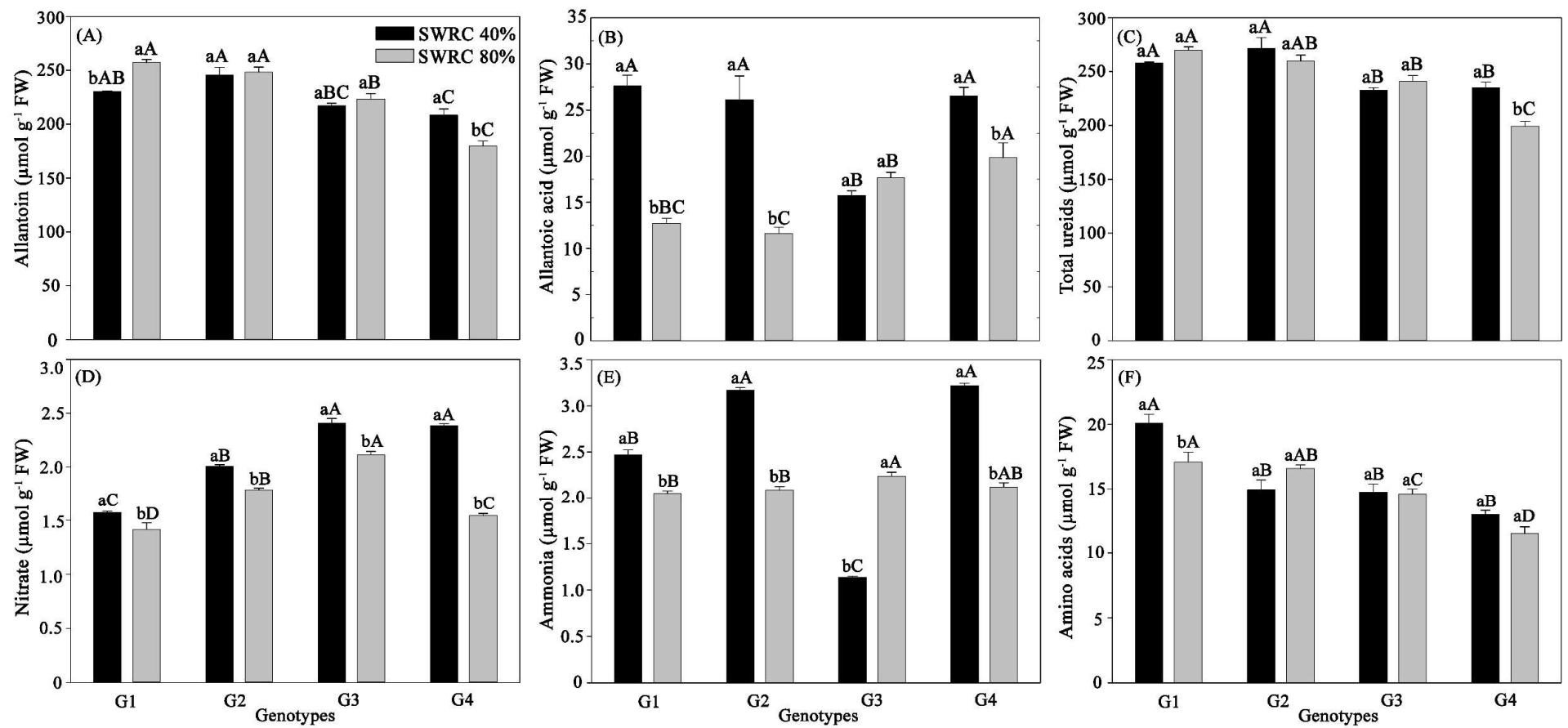


Figura 3. (A) alantoína, (B) ácido alantóico, (C) ureídeos totais, (D) nitrato, (E) amônia, (F) aminoácidos. Letras maiúscula indicam maior média de genótipos dentro de cada CAD e letra minúscula indica maior média de cada CAD dentro de cada genótipo.

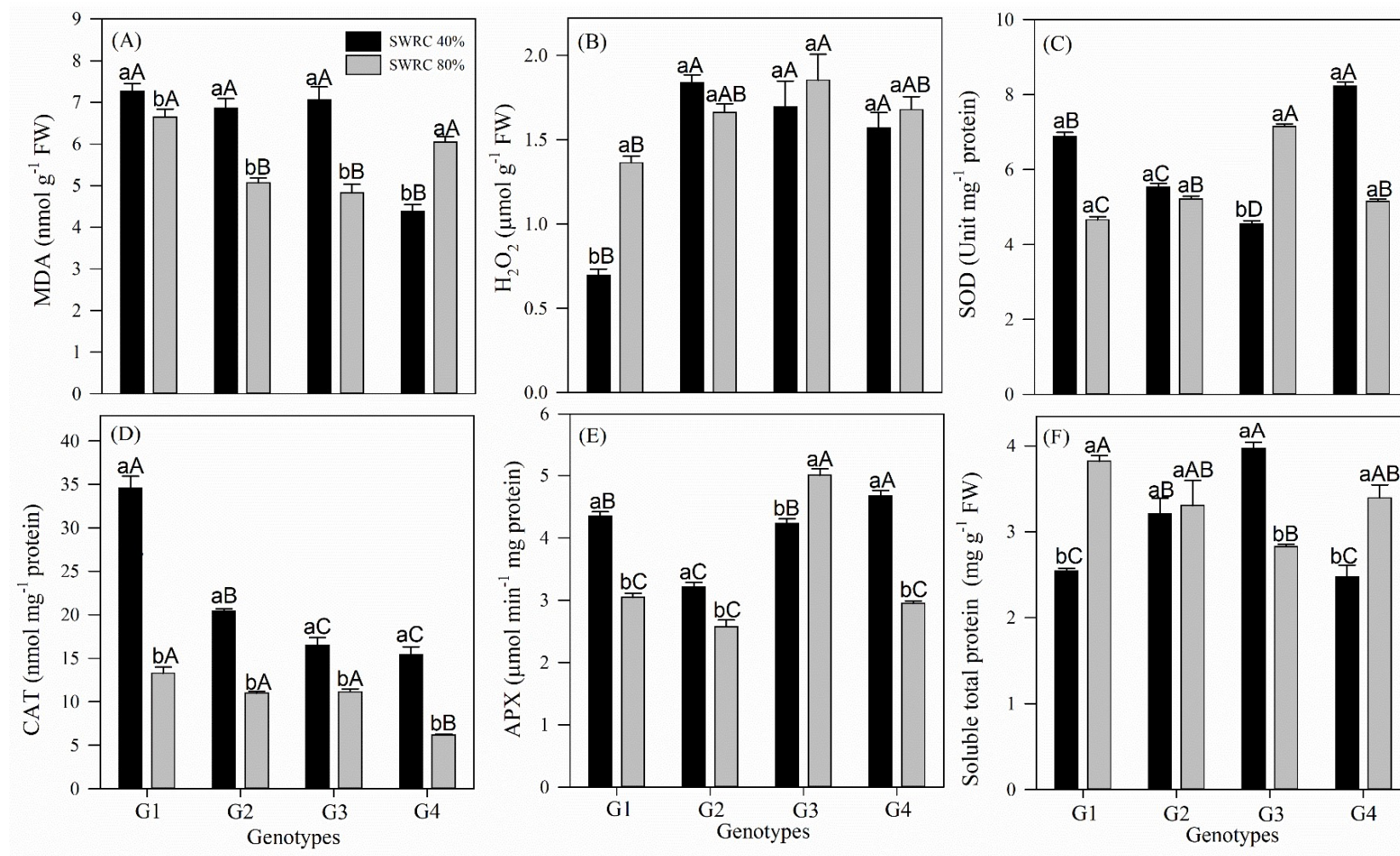


Figura 4. (A) MDA, (B) H₂O₂, (C) SOD, (D) CAT, (E) APX, (F) proteínas. Letras maiúscula indicam maior média de genótipos dentro de cada CAD e letra minúscula indica maior média de cada CAD dentro de cada genótipo.

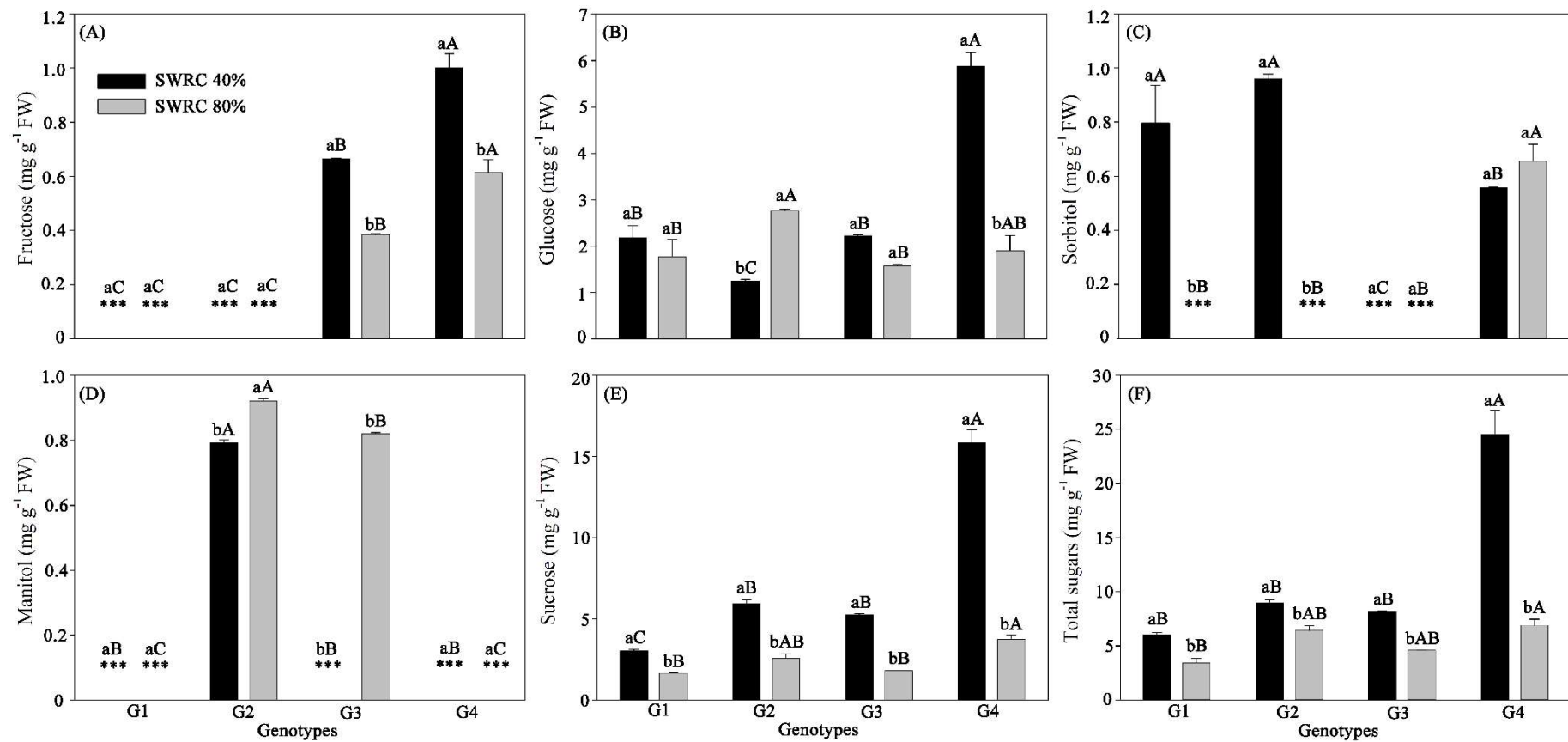


Figure 5. (A) frutose, (B) glicose, (C) sorbitol, (D) manitol, (E) sacarose, (F) açúcares totais. Letras maiúscula indicam maior média de genótipos dentro de cada CAD e letra minúscula indica maior média de cada CAD dentro de cada genótipo.

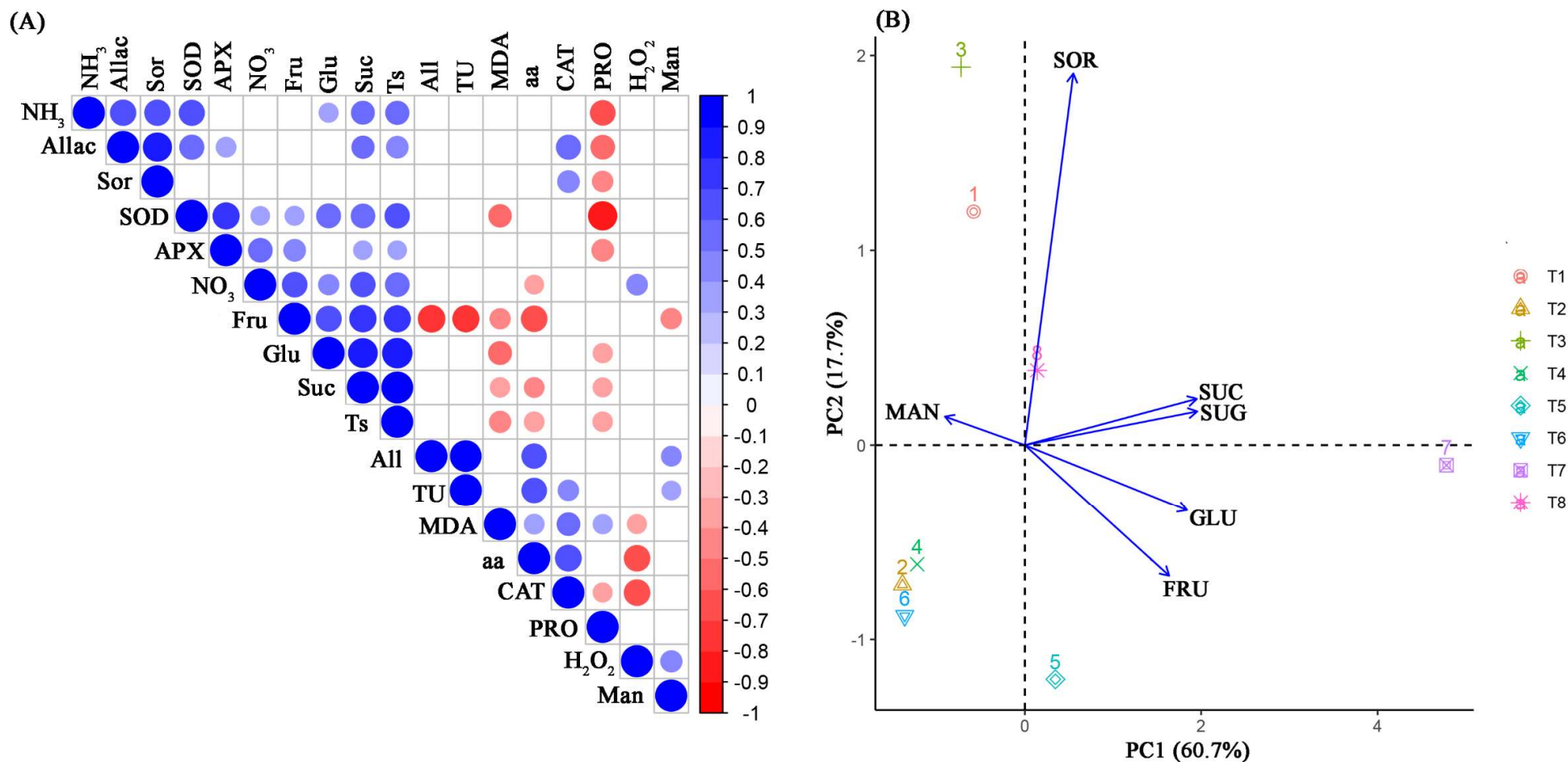


Figure 6. Effect of drought stress on physiological and biochemical parameters in cowpea nodules. (A) Heatmap showing the Pearson's correlation coefficients obtained from parameters measured from cowpea plants. Blue scale means the significant positive correlation ($p < 0.05$). (B) PCA. Abbreviations: PRO – protein, CAT – catalase, MDA – malondialdehyde, H_2O_2 – peroxide de hydrogen, NH_3 – ammonia, aa – amino acids, SOD – superoxide dismutase, APX - ascorbate peroxidase, Allac – allantoic acid -, Sac -sucrose, Fru – fructose, NO_3 – nitrate, All – allantoin, TU – total ureides, Glu – glucose, Man – mannitol, Sor – sorbitol, Ts – Total sugar.

5 MUDANÇAS ANATÔMICAS E ULTRAESTRUTURAL DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI

RESUMO

A seca interfere em várias reações essenciais no metabolismo das plantas podendo levar à perda de produtividade. A tolerância compreende em características adaptativas a situações de estresse, essas características podem ser diferentes em plantas da mesma espécie. O objetivo do trabalho foi avaliar 2 genótipos de feijão-caupi: BRS Tumucumaque (sensível) e BRS Marataoã (tolerante) submetidos a 2 níveis de capacidades de água disponível no solo (40% e 80% da CAD). O solo foi mantido a 80% da CAD até 20 dias após a semeadura, quando então foi iniciado o sistema de restrição hídrica. As folhas e raízes foram coletadas aos 48 DAE e fixados em solução Karnovsky para análises anatômicas e ultraestruturais. Os parâmetros avaliados nas folhas foram: espessura da epiderme adaxial, do parênquima paliçádico, do parênquima lacunoso, da epiderme abaxial, da cutícula, da parede celular e acúmulo de amido. Já nas raízes foram avaliados: espessura do floema secundário, do xilema secundário, diâmetro da célula do raio parenquimático e acúmulo de amido. O genótipo tolerante apresentou células do parênquima lacunoso mais organizado, espessura do parênquima paliçádico maior, aumento da epiderme adaxial e maior espessura foliar total que o genótipo sensível. Já o parênquima lacunoso e espessura da parede celular foram maiores no genótipo sensível quando submetido ao estresse, além disso as células da epiderme adaxial e abaxial se modificou em ambiente de seca. Houve aumento da espessura da cutícula em ambos os genótipos em situação de estresse, no entanto não houve diferença significativa entre genótipos. Maior quantidade de grãos de amido foram encontrados nos genótipos da CAD 40%, sendo maior no genótipo tolerante. A microscopia eletrônica de transmissão revelou que o genótipo tolerante apresentou maior volume de tilacóides em relação ao sensível quando submetidos ao estresse hídrico. Nas raízes foi possível observar que os elementos de vasos do genótipo sensível apresentaram maior diâmetro na CAD 40%, comportamento que não ocorreu no genótipo tolerante.

Palavras chave: anatomia, estresse hídrico, mecanismo de tolerância, *Vigna unguiculata*

5.1 INTRODUÇÃO

A produção global de alimentos tem enfrentando diversos desafios em decorrência das alterações climáticas. A seca interfere em várias reações essenciais no metabolismo das plantas podendo levar a perda de produtividade. Para enfrentar ambientes de estresse as plantas desenvolveram uma série de mecanismos de defesa para sua sobrevivência (JOGAWAT *et al.*, 2021). Esses mecanismos compreendem alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas, tanto em folhas quanto raízes (YADAV *et al.*, 2021).

Na cana-de-açúcar o estresse hídrico diminuiu o comprimento do cloroplasto (ZHANG *et al.*, 2015), causou redução no parênquima paliçádico e lacunoso em soja (Gonçalves *et al.*, 2017), aumentou a espessura da parede celular em feijão (Martínez *et al.*, 2007). A proporção de granuns e estroma também foram alterados em plantas superiores submetidas a estresse luminoso (KIRCHHOFF, 2013). Além disso, o acúmulo de amido nas folhas foi relatado por diversos autores, sendo um mecanismo de proteção durante o crescimento e desenvolvimento de planta (SEHGAL *et al.*, 2017).

Já na anatomia de raízes, o estresse abiótico pode causar mudanças no córtex, cilindro vascular, diâmetro do xilema, epiderme e endoderme, em diferentes regiões da raiz (Silva *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2019). A seca também pode levar ao enchimento de ar nos elementos de vasos, ocasionando embolia (Smertenko *et al.*, 2020). Variedades tolerantes de trigo apresentaram alto teor de amido ao redor dos feixes vasculares e região periférica das raízes após a seca (SINGH *et al.*, 2013).

A tolerância compreende em características adaptativas a situações de estresse, essas características podem ser diferentes em plantas da mesma espécie. O feijão-caupi apesar de ter alta plasticidade à seca, apresenta comportamentos distintos entre seus diferentes genótipos (CARVALHO *et al.*, 2019; MUNJONJI *et al.*, 2017). O objetivo do presente trabalho foi avaliar alterações anatômicas de genótipos de feijão-caupi: sensível (BRS Tumucumaque) e tolerante (BRS Marataoã), quanto submetidos ao estresse por déficit hídrico.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (20 ° 25 '4,65 "S, 51 ° 20' 27,89" O, 377 m) em casa de vegetação, localizada na cidade de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil. O solo foi coletado e enviado para análise físico-química, fornecendo as seguintes propriedades: pH: 4,9; P: 2 mg/dm³, K: 0,4 mmol/dm³, Ca: 4 mmol/dm³, Mg: 4 mmol/dm³, B: 0,02 mg/dm³, Cu: 0,5 mg/dm³, Fe: 15 mg/dm³, Mn: 4,9, Zn:0,1 mg/dm³, H+Al: 12 mmol/dm³, CTC: 20,4 mmol/dm³, MO: 12 g/dm. O solo foi classificado como Rhodic Haplusfox de acordo com (Soil Survey Staff, 2014). A correção foi realizada conforme recomendações de (RAIJ *et al.*, 2001).

As sementes foram tratadas com Piraclostrobina (25 g L⁻¹ produto comercial), tiofanato-metila (225 g L⁻¹ produto comercial) e fipronil (250 g L⁻¹ produto comercial) e na sequência inoculadas com inóculo de turfa de feijão-caupi de alta qualidade (cepa SEMIA 6464; registro do produto SP 00581-10030-1; BIOMAX; São Jorge da Barra, Brasil). As sementes de feijão-caupi foram semeadas no dia 22/04/2020 em vasos de polietileno contendo exatamente 3 kg de solo (mantendo duas plantas por vaso). O solo foi mantido a 80% da CAD até 20 dias após a semeadura, quando então foi iniciado o sistema de restrição hídrica. O método gravimétrico foi utilizado para reposição de água a cada 24 horas.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo 2 níveis de capacidades de água disponível no solo (40% e 80% da CAD) (Carvalho *et al.*, 2019) e 2 genótipos de feijão-caupi: BRS Tumucumaque (sensível) e BRS Marataoã (tolerante), contendo 8 repetições por tratamento.

5.3 ANATOMIA DE FOLHAS E RAÍZES

Foram coletadas as folhas mais representativas do terço médio superior das plantas e parte das raízes principal aos 48 dias após emergência. As folhas e raízes foram seccionadas transversalmente na região mediana com ajuda de um bisturi e então fixados em solução de Karnovsky (2% paraformaldehyde, 2,5% glutaraldehyde, 0.05M CaCl₂ in 0.2 M cacodylate buffer of pH 7.2.) - por 24 h (Karnovsky, 1965). Nesse período, as amostras foram colocadas em bomba de vácuo por 15 minutos por 5 vezes e agitadas para melhor penetração do fixador. As folhas foram então desidratadas por meio de uma série de álcool graduado (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 e 100%), 15 minutos em cada etapa e incorporado em resina plástica (Leica Historesin®,

Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha). Nessa etapa, as amostras foram submetidas à bomba de vácuo por 10 vezes e as amostras foram continuamente agitadas. A etapa de infiltração em resina pura levou 4 dias. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotacional Leica RM 2045 com espessura de 5-7 μm . Para as análises histológicas usuais, parte dos cortes transversais foram montados em lâminas de vidro e corados com zinco iodado para teste de amido.

Após a coloração, as lâminas foram montadas com resina sintética Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). As imagens das lâminas foram capturadas digitalmente por meio de um microscópio Zeiss Axionscope com uma câmera de vídeo acoplada. As escalas micrométricas foram impressas diretamente nas imagens.

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As amostras foram fixadas solução de Karnovsky (2% paraformaldehyde, 2,5% glutaraldehyde, 0.05M CaCl_2 in 0.2 M cacodylate buffer of pH 7.2.) - por 24 h (Karnovsky, 1965). As amostras foram secas ao ar em uma câmara de vácuo por 5 min, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 h, desidratadas através de um graduado série de soluções de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), e incorporado na resina de Spurr (Marques *et al.*, 2016). Os blocos foram cortados com um ultra-micrótomo Leica UC6. As imagens foram analisadas usando microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100 a uma tensão de aceleração de 80 kV.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por meio do Software R (R Development Core Team 2015, v. 3.6), os dados foram submetidos aos testes de normalidade proposto por (Shapiro and Wilk, 1965) e homocedasticidade de Levene, ambos a 5% de significância ($p > 0,05$). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$), e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$). A análise de correlação de Pearson ($p < 0,05$) também foi realizada para identificar variáveis dependentes que são diretamente correlacionadas com os tratamentos. O pacote “corrplot” foi utilizado para criar o Heatmap, com funções “cor” e “cor.mtest” para criar os coeficientes e matrizes de p-valores. Para realização do agrupamento clustering, foram utilizados os pacotes: RColorBrewer, gplots, pheatmap, d3heatmap, dendextend, ComplexHeatmap, circlize e cluster.

5.6 RESULTADOS

As folhas de feijão-caupi na seção transversal (Fig 1) apresentam epiderme unisseriada, mesofilo dorsiventral, apresentando o parênquima paliçádico voltado à epiderme adaxial e parênquima lacunoso próximo à face abaxial da epiderme.

O genótipo tolerante apresentou células do parênquima lacunoso mais organizadas que o genótipo sensível, ficando evidente a presença de menor espaço intercelular nessa região (Fig. 1BJ). As células da epiderme adaxial e abaxial no genótipo sensível quando submetido ao estresse estava visivelmente achatada quando comparado com o tratamento sem estresse (Fig 1BF). O teste histoquímico utilizando o corante zinco iodado evidenciou que a maior parte do amido na nervura principal se acumula próximo aos tecidos do xilema, já na internervura, a maior parte de grãos de amido está presente no parênquima paliçádico, com ocorrência maior nas folhas do genótipo tolerante (Fig 1CGKO).

As medições anatômicas demonstraram modificações distintas para os genótipos estudados quanto à espessura do parênquima paliçádico. No genótipo sensível ao estresse não houve diferença entre os tratamentos, já no genótipo tolerante a espessura aumentou 62% quando submetido ao estresse hídrico em comparação com o tratamento irrigado (Fig 2B). No genótipo tolerante não houve diferença na espessura do parênquima lacunoso, já o genótipo sensível aumentou 74% quando submetido ao estresse hídrico (Fig 2C). O genótipo sensível não apresentou aumento na espessura da epiderme adaxial, já o genótipo tolerante apresentou aumento da espessura em 72% quando submetido ao estresse (Fig 1D). Em ambos tratamentos o genótipo tolerante apresentou maior espessura foliar total, sendo maior no tratamento de limitação de água (Fig 1E). Os genótipos sensível e tolerante aumentaram a espessura da cutícula na CAD 40% (51% e 61%, respectivamente), mas não diferiram estatisticamente entre si (Fig 1F). Em relação à parede celular, o genótipo sensível apresentou aumento significativo quando submetido ao estresse hídrico (51%), o genótipo tolerante apresentou comportamento distinto, pois apresentou redução da parede celular quando submetido ao estresse (Fig 1G). Não houve diferença na espessura da epiderme adaxial entre genótipos e tratamentos (Fig 1A).

A microscopia eletrônica de transmissão revelou que os cloroplastos de feijão-caupi apresentam formato discóide (Fig 3), contendo amido (grânulos branco) e plastoglôbulos (grânulos preto). As membranas do envoltório são separadas pelo espaço intermembranas, o

estroma é preenchido por um elaborado sistema de membranas, e os tilacóides arranjam-se formando o grânulo (Fig 3). O espessamento da cutícula em ambos os genótipos na CAD 40% ficou evidente (Fig 3DL). Curiosamente o genótipo tolerante apresentou maior volume de tilacóides que o sensível, quando submetidos ao estresse hídrico (Fig 3CGKO).

Aos 48 dias após a emergência das plantas as raízes já apresentam o crescimento secundário evidenciado pela presença dos raios parenquimáticos (Fig 4). Visivelmente os elementos de vasos das raízes do genótipo sensível ao estresse apresentaram maior diâmetro na CAD 40% quando comparado com a CAD 80%, comportamento que não ocorreu no genótipo tolerante (Fig 4AECG). O teste histoquímico utilizando o corante zinco iodado revelou maior acúmulo de amido quando os genótipos estavam submetidos ao estresse hídrico, sendo maior no genótipo tolerante. Ambos genótipos apresentaram o diâmetro da célula do raio parenquimático e espessura do xilema secundário maior na CAD 80%, sendo maior no genótipo sensível (Fig 5AB). Já a espessura do floema secundário foi maior na CAD 80% para o genótipo tolerante e na CAD 40% no genótipo sensível (Fig 5C).

A rede de correlação de Pearson apresentou forte correlação positiva entre a espessura da epiderme adaxial com a espessura da cutícula, espessura foliar total com a espessura do parênquima lacunoso, diâmetro do elemento de vaso com a espessura da parede célula e média correlação positiva entre a espessura da cutícula com a espessura foliar total. Já a espessura da parede celular apresentou forte correlação negativa com espessura do floema secundário, e a espessura da cutícula forte correlação negativa com o diâmetro da célula do raio parenquimático (Fig 6).

5.7 DISCUSSÃO

Mudanças na ultraestrutura das células ocorrem em diferentes espécies em resposta ao estresse abiótico (Martínez *et al.*, 2007). O genótipo tolerante apresentou parênquima lacunoso mais organizado que o genótipo sensível, tecido foliar onde ocorrem as trocas gasosas (Sorin *et al.*, 2015). A organização dessa estrutura possibilita maior eficiência fotossintética, característica comumente observada em plantas resistentes ao estresse (Sam *et al.*, 2003). Além disso, o aumento do espaço intercelular no parênquima lacunoso do genótipo tolerante pode ser explicado por mudanças no formato das células dessa região, propiciando uma otimização da difusão interna do CO₂ (FLEXAS *et al.*, 2006).

A fotossíntese é realizada principalmente no parênquima paliçádico (Nardini *et al.*, 2010). O aumento da espessura desse tecido em ambos os genótipos quando submetido ao estresse pode ter ocorrido pela capacidade de hidratação da folha e pode ser explicada pelo afrouxamento da parede celular, provavelmente com a redução do potencial osmótico dos vacúolos (SORIN *et al.*, 2015).

A presença de amido e plastoglóbulos foi mais evidente quando os genótipos estavam submetidos a CAD 40%, sendo maior no genótipo tolerante. Apesar do acúmulo de amido em cloroplasto ser considerado um evento temporário, visto que a função primária dessas organelas não é de reserva (Vitova *et al.*, 2014), o amido transitório atua como uma fonte imediata de carbono sob as condições climáticas adversas (V and Tyagi, 2020), funcionando como um osmoprotetor. Além disso, os açúcares são importantes compostos utilizados para compensar os efeitos negativos dos radicais $^{\circ}\text{OH}$, que só podem ser neutralizados de forma não enzimática (DONG; BECKLES, 2019).

Altas concentrações de ERO's levam à peroxidação da membrana celular (Foyer and Noctor, 2016), podendo ocasionar mudanças na morfologia e ultraestrutura da epiderme (DU *et al.*, 2019). O aumento da espessura da epiderme adaxial do genótipo tolerante pode ter ocorrido por um mecanismo de adaptação, resultado semelhante foi obtido por (Nawazish *et al.*, 2006).

A cutícula é uma camada hidrofóbica extracelular, cuja função primária é evitar a perda de água (CHEN *et al.*, 2021). Os genótipos aumentaram a espessura da cutícula na CAD 40%, esse resultado pode ter ocorrido pelo aumento do acúmulo de ceras cuticulares na superfície da folha (HASANUZZAMAN *et al.*, 2017). Em relação à parede celular, o genótipo sensível apresentou aumento na CAD 40%, o genótipo tolerante apresentou comportamento distinto, pois ocorreu redução da parede celular, isso ocorreu para manter o turgor via contração, associado ao ajuste elástico (PATAKAS; NOITSAKIS, 1997). O encolhimento celular significa redução do tamanho da célula, sendo associado à resistência da planta ao estresse hídrico (LECOEUR *et al.*, 1995).

Dentro dos cloroplastos na membrana do tilacóide ocorre a conversão de energia fotossintética (KOOCHAK *et al.*, 2019), situações de estresse levam à excitação de elétrons podendo causar produção de ERO's (FOYER, 2018). Para suportar essa situação, a membrana do tilacóide reorganiza sua composição protéica estequiométrica (WILHELM *et al.*, 2020). O genótipo tolerante apresentou maior volume de tilacóides que o sensível, quando submetidos ao

estresse hídrico, essa alteração pode estar associada ao mecanismo de tolerância, sendo necessário maiores estudos acerca do assunto.

O aumento do diâmetro dos elementos de vaso nas raízes pode facilitar a formação de embolia. Nesse estudo o aumento do diâmetro de elementos de vaso ocorreu no genótipo sensível, resultado semelhante foi obtido nas raízes de soja severamente estressadas (ZHENG *et al.*, 2019). A formação da embolia é um importante indicativo de sensibilidade ao estresse abiótico, já que essa condição pode causar falha hidráulica e levar à morte da planta (Creek *et al.*, 2018). A diminuição do diâmetro da célula do raio parenquimático e espessura do xilema secundário nas plantas da CAD 40% ocorreu porque nessa condição as raízes com vasos estreitos podem ser vantajosas na resistência à desidratação (STROCK *et al.*, 2021).

Ocorreu acúmulo de amido nas raízes de plantas submetidas à seca, sendo maior no genótipo tolerante. Resultado semelhante foi obtido na cultura do trigo, onde ocorreu o acúmulo de amido nas folhas e uma subsequente exportação para as raízes, refletindo na taxa de crescimento das raízes (HU *et al.*, 2015).

5.8 CONCLUSÃO

Algumas alterações anatômicas parecem regular tolerância ou sensibilidade ao estresse hídrico por seca. Nesse trabalho as características anatômicas que evidenciaram tolerância para o genótipo BRS Marataoã foram: parênquima lacunoso organizado, espessamento do parênquima paliçádico, da epiderme adaxial e foliar, além do aumento no volume de tilacóides.

O espessamento da parede celular, achatamento das células da epiderme abaxial e adaxial e aumento do diâmetro dos elementos de vasos parecem estar relacionados com a sensibilidade do genótipo BRS Tumucumaque ao déficit hídrico. O espessamento da cutícula ocorreu em ambos os genótipos, mas não foi o suficiente para ser um indicativo de tolerância ou sensibilidade nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, M. *et al.* Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 241, p. 153001, 2019.
- CHEN, M. *et al.* Leaf Cuticular Transpiration Barrier Organization in Tea Tree Under Normal Growth Conditions. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, p. 1316, 2021.
- CREEK, D. *et al.* Coordination between leaf, stem, and root hydraulics and gas exchange in three arid-zone angiosperms during severe drought and recovery. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 41, n. 12, p. 2869–2881, 2018.
- DONG, S.; BECKLES, D. M. Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissues promote a better abiotic stress response. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 234–235, p. 80–93, 2019.
- DU, Q. *et al.* Effects of potassium deficiency on photosynthesis, chloroplast ultrastructure, ROS, and antioxidant activities in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Integrative Agriculture**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 395–406, 2019.
- EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. **Embrapa Solos**, [s. l.], p. 353, 2013.
- FLEXAS, J. *et al.* Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. **New Phytologist**, [s. l.], v. 172, n. 1, p. 73–82, 2006.
- FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 154, p. 134–142, 2018.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 951–964, 2016.
- GONÇALVES, C. G. *et al.* Morphological modifications in soybean in response to soil water management. **Plant Growth Regulation**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 105–117, 2017.
- HASANUZZAMAN, M. *et al.* Residual transpiration as a component of salinity stress tolerance mechanism: a case study for barley. **BMC Plant Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 107, 2017.
- HU, M. *et al.* Wheat acclimate to water deficit by modifying carbohydrates metabolism, water use efficiency, and growth. **Brazilian Journal of Botany**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 505–515, 2015.
- JOGAWAT, A. *et al.* Crosstalk between phytohormones and secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 172, n. 2, p. 1106–1132, 2021.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 1A-149A, 1965.

- KIRCHHOFF, H. Architectural switches in plant thylakoid membranes. **Photosynthesis Research**, [s. l.], v. 116, n. 2–3, p. 481–487, 2013.
- KOOCHAK, H. *et al.* The structural and functional domains of plant thylakoid membranes. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 412–429, 2019.
- LECOEUR, J. *et al.* Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 46, n. 9, p. 1093–1101, 1995.
- MARQUES, J. P. R. *et al.* Ultrastructural changes in the epidermis of petals of the sweet orange infected by *Colletotrichum acutatum*. **Protoplasma**, [s. l.], v. 253, n. 5, p. 1233–1242, 2016.
- MARTÍNEZ, J. P. *et al.* Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **European Journal of Agronomy**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 30–38, 2007.
- MUNJONJI, L. *et al.* Stomatal Behavior of Cowpea Genotypes Grown Under Varying Moisture Levels. **Sustainability**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 12, 2017.
- NARDINI, A. *et al.* Leafminers help us understanding leaf hydraulic design. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 1091–1100, 2010.
- NAWAZISH, S. *et al.* Leaf anatomical adaptations of *Cenchrus ciliaris* L. from the salt range, Pakistan against drought stress. **American Journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 48, n. 33, p. 352–356, 1997, 2006.
- PATAKAS, A.; NOITSAKIS, B. Cell wall elasticity as a mechanism to maintain favorable water relations during leaf ontogeny in grapevines. **American Journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 352–356, 1997.
- PRATHAP, V.; TYAGI, A. Correlation between expression and activity of ADP glucose pyrophosphorylase and starch synthase and their role in starch accumulation during grain filling under drought stress in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 157, p. 239–243, 2020.
- RAIJ, B. V. *et al.* Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. **Campinas: Instituto Agrônômico**, [s. l.], n. 19, p. 285, 2001.
- SAM, O. *et al.* Changes in Tomato Leaves Induced by NaCl Stress: Leaf Organization and Cell Ultrastructure. **Biologia plantarum**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 361–366, 2003.
- SEHGAL, A. *et al.* Effects of Drought, Heat and Their Interaction on the Growth, Yield and Photosynthetic Function of Lentil (*Lens culinaris* Medikus) Genotypes Varying in Heat and Drought Sensitivity. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, p. 1776, 2017.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, [s. l.], v. 52, n. 3/4, p. 591, 1965.

SILVA, B. R. S. *et al.* Anatomical changes in stem and root of soybean plants submitted to salt stress. **Plant Biology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 57–65, 2021.

SINGH, A. *et al.* Genotypic Variation in Root Anatomy, Starch Accumulation, and Protein Induction in Upland Rice (*Oryza sativa*) Varieties Under Water Stress. **Agricultural Research**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 24–30, 2013.

SMERTENKO, T. *et al.* Brachypodium distachyon MAP20 functions in metaxylem pit development and contributes to drought recovery. **New Phytologist**, [s. l.], v. 227, n. 6, p. 1681–1695, 2020.

SORIN, C. *et al.* Assessment of nutrient remobilization through structural changes of palisade and spongy parenchyma in oilseed rape leaves during senescence. **Planta**, [s. l.], v. 241, n. 2, p. 333–346, 2015.

STROCK, C. F. *et al.* Root metaxylem and architecture phenotypes integrate to regulate water use under drought stress. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 49–67, 2021.

VITOVA, M. *et al.* Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 1204–1218, 2015.

WILHELM, C.; GOSS, R.; GARAB, G. The fluid-mosaic membrane theory in the context of photosynthetic membranes: Is the thylakoid membrane more like a mixed crystal or like a fluid? **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 252, p. 153246, 2020.

YADAV, V. *et al.* Structural modifications of plant organs and tissues by metals and metalloids in the environment: A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 159, p. 100–112, 2021.

ZHANG, F. J. *et al.* Effect of Drought Stress on Anatomical Structure and Chloroplast Ultrastructure in Leaves of Sugarcane. **Sugar Tech**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 41–48, 2015.

ZHENG, Y. *et al.* Elevated CO₂ concentration induces photosynthetic down-regulation with changes in leaf structure, non-structural carbohydrates and nitrogen content of soybean. **BMC Plant Biology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 255, 2019.

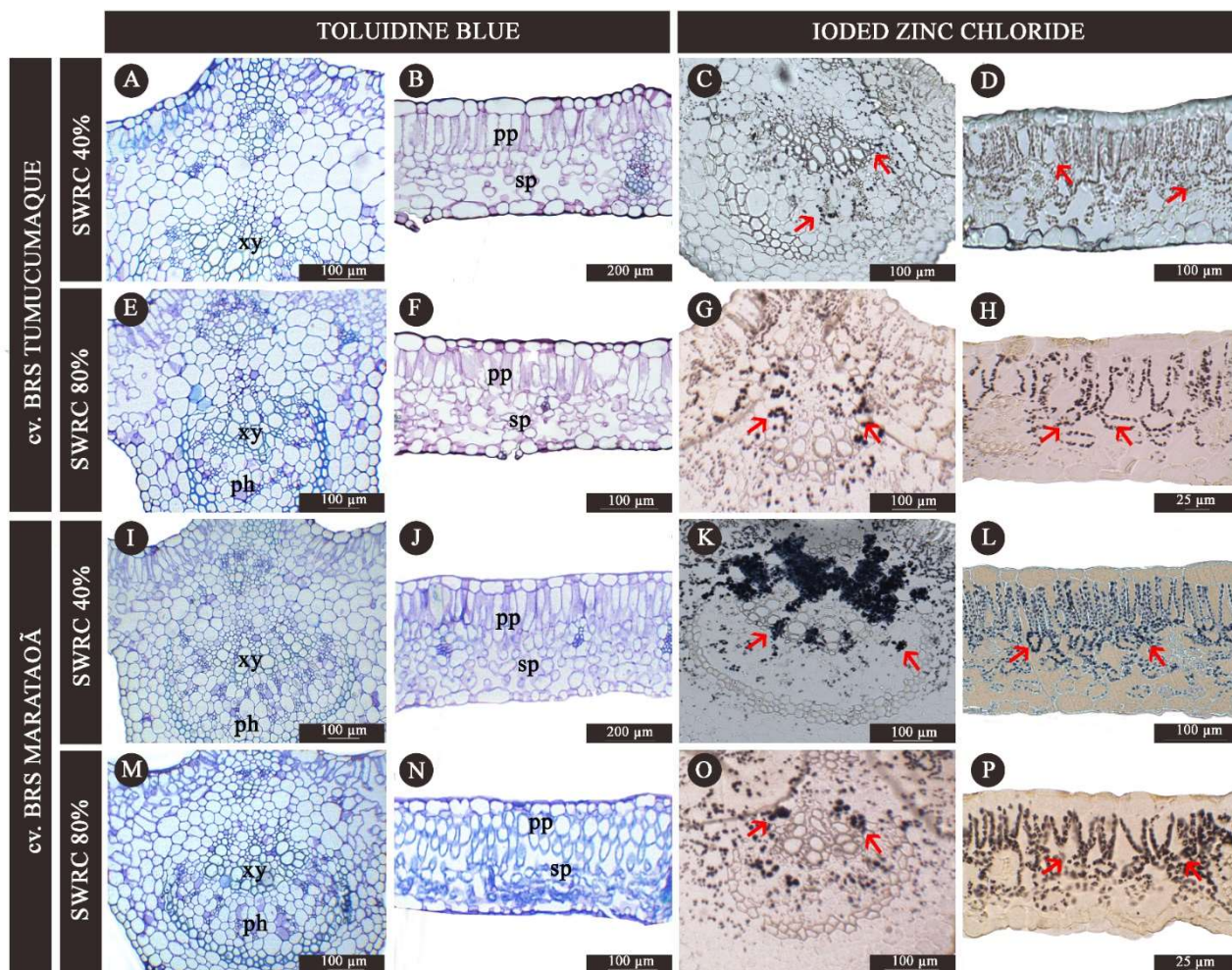


Figura 1. Cortes transversais da nervura central e limbo foliar de diferentes genótipos de Feijão-caupi. Flexas vermelhas indicam presença de amido nos órgãos do tecido foliar: xy (xilema), ph (floema), pp (parênquima paliçádico) e sp (parênquima lacunoso).

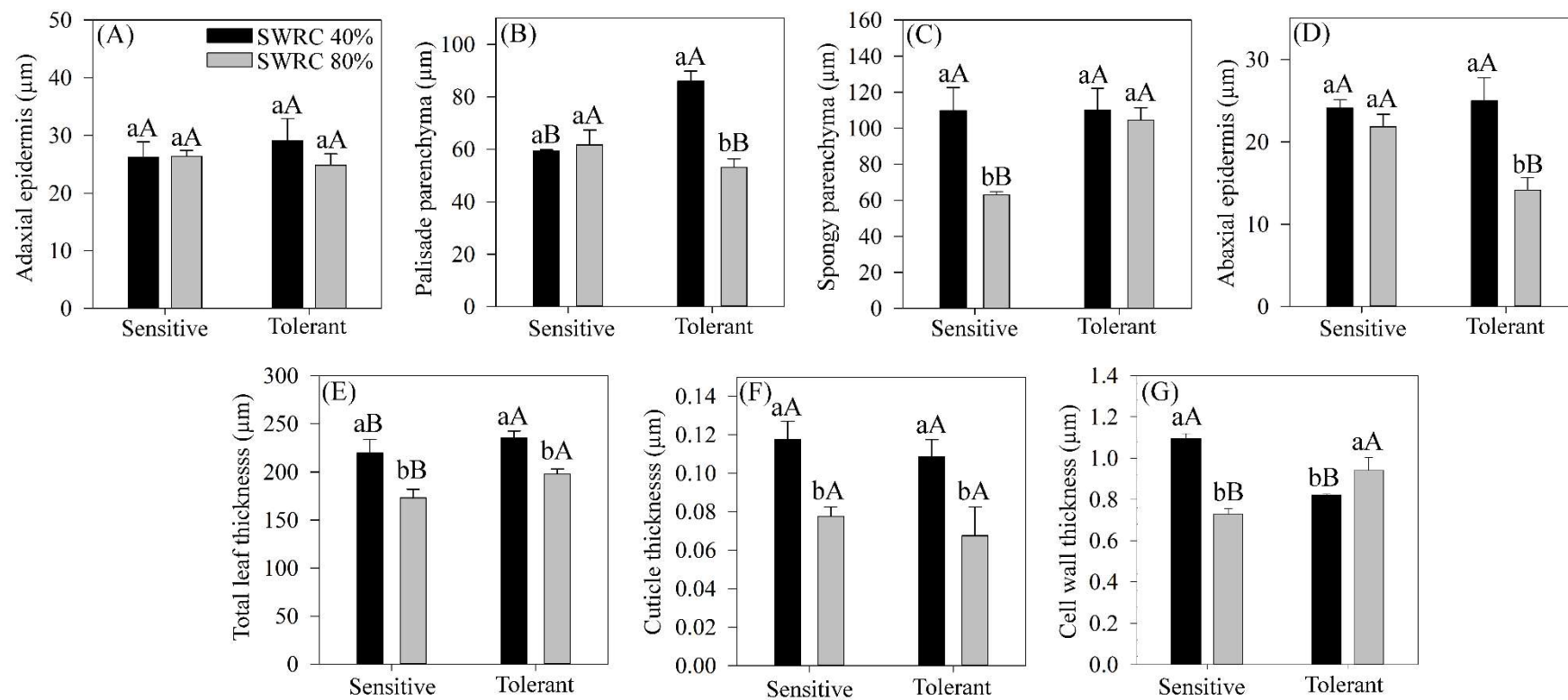


Figura 2. Efeito do estresse hídrico na anatomia de folhas de feijão-caupi, onde; Espessura de epiderme adaxial (A), espessura de parênquima paliádico (B), espessura de parênquima lacunoso (C) espessura de epiderme adaxial (D), espessura foliar total (E), espessura de cutícula (F), espessura de parede celular (G). As barras de erro indicam o erro padrão da média ($n = 4$). Letras diferentes indicam diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras maiúsculas correspondem aos genótipos do feijão-caupi e as letras minúsculas correspondem a capacidade de água disponível no solo (SWRC).

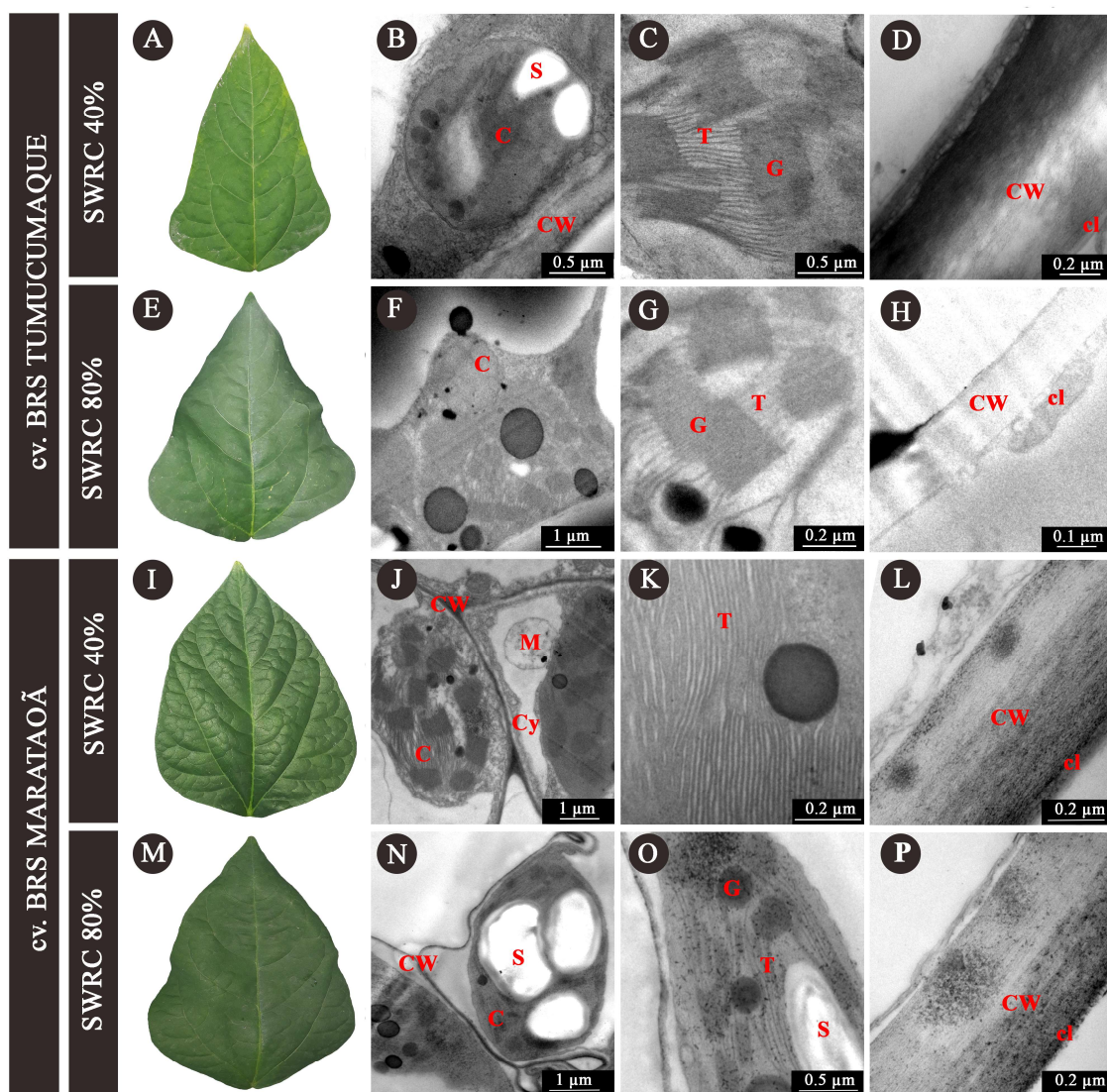


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão de folhas de Feijão-caupi. C – cloroplastos, CW- parede celular, Cy – citosol, S - amido, V – vacúolo, G – granum, M – mitocôndria, T – tilacóides, cl - cutícula.

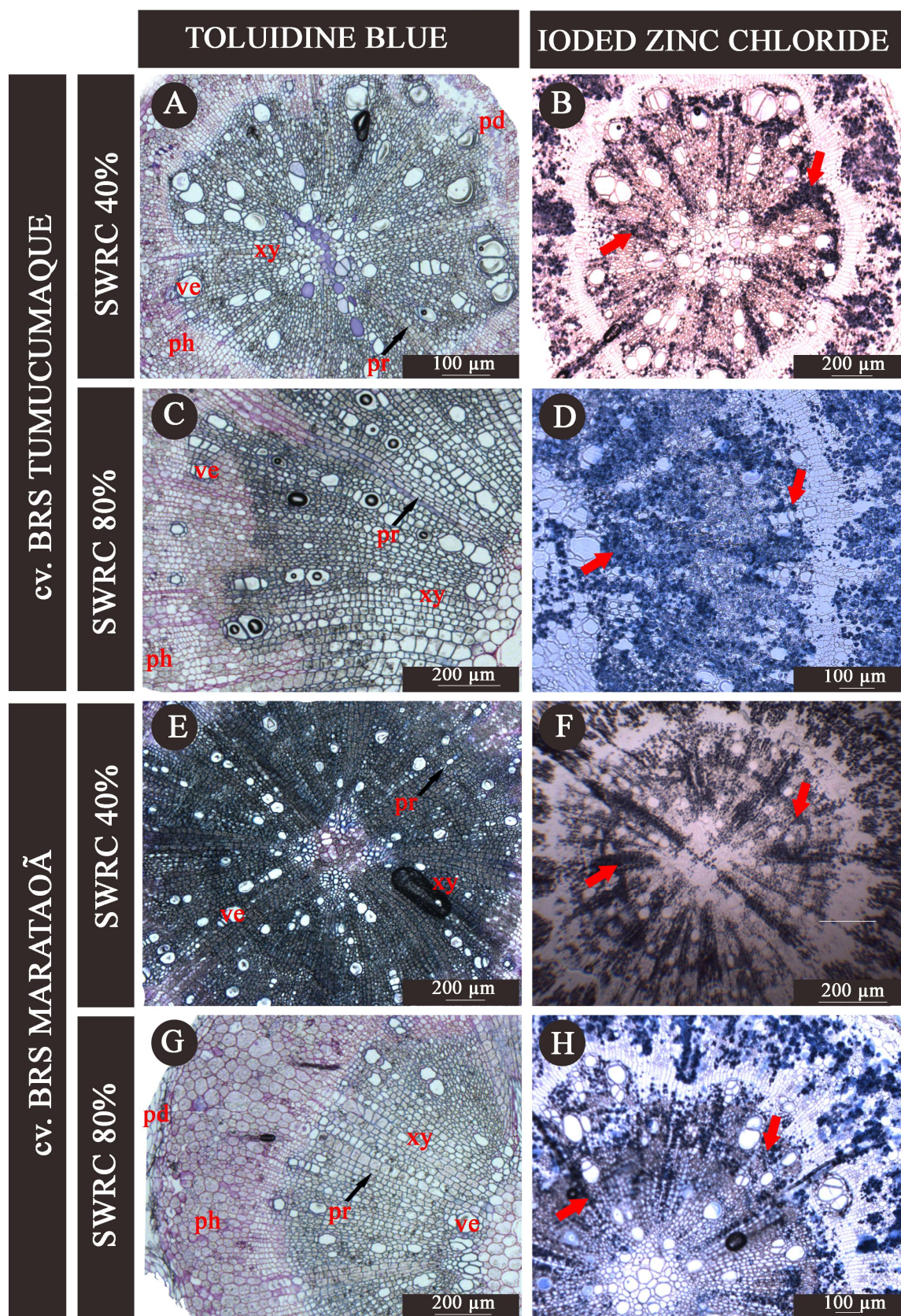


Figura 1. Cortes transversais de raízes de diferentes genótipos de Feijão-caupi. pd – periderme, pr – raio parenquimático, ve – elemento de vaso, xy – xilema secundário, ph – floema secundário.

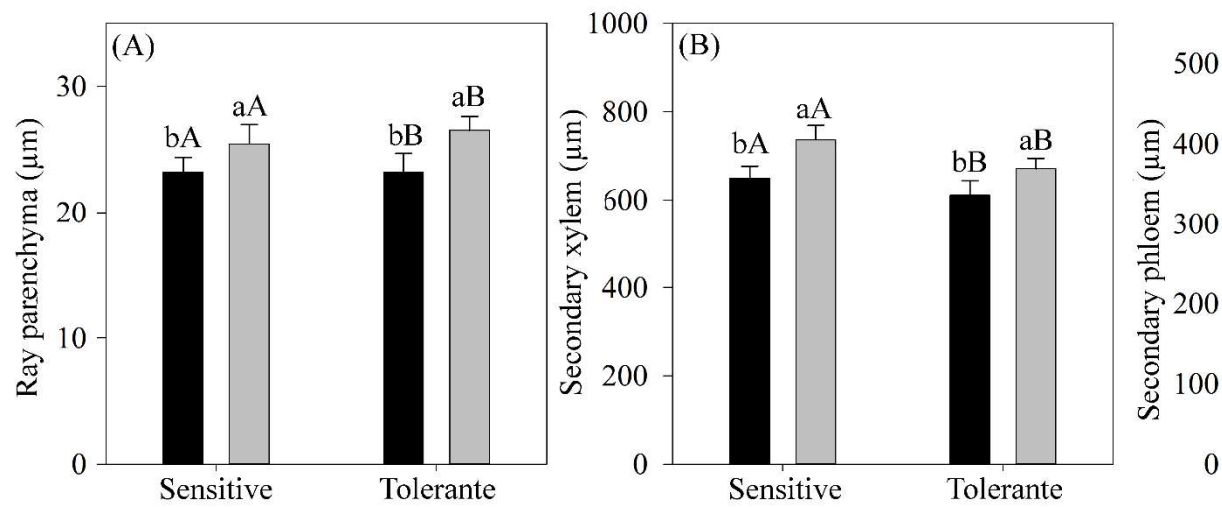


Figura 5. Efeito do estresse hídrico na anatomia de raiz de feijão-caupi, onde; Diâmetro a célula do raio parenquimatoso (A), espessura do xilema secundário (B), espessura do floema secundário (C). As barras de erro indicam o erro padrão da média ($n = 4$). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As letras maiúsculas correspondem aos genótipos do feijão-caupi e as letras minúsculas correspondem às condições de crescimento (SWRC).

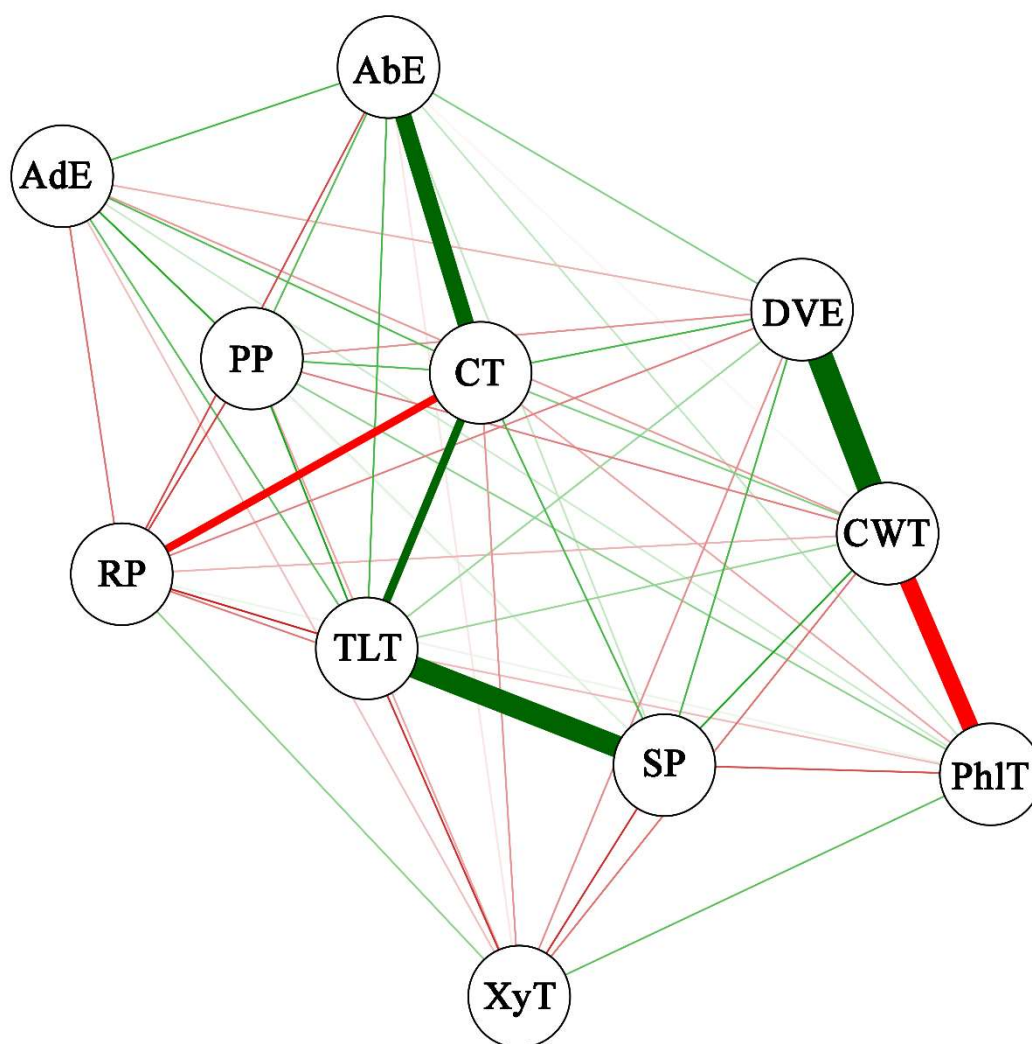


Figura 6. Rede de correlação Pearson. Coloração azul significa correlação positiva significativa ($p < 0,05$), coloração vermelha significa correlação negativa. Espessura de linhas indicam a intensidade de correlação, onde: Espessura de epiderme adaxial (AdE), espessura de parênquima paliçádico (PP), espessura de parênquima lacunoso (SP) espessura de epiderme adaxial (AbE), espessura foliar total (TLT), espessura de cutícula (CT), espessura de parede celular (CWT), Diâmetro a célula do raio parenquimático (RP), espessura do xilema secundário (XyT), espessura do floema secundário (PhIT).